Učestalost polimorfizma A6986G gena CYP3A5 u skupini primatelja transplantiranog bubrega

Domazet, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:404754

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Ivana Domazet

UČESTALOST POLIMORFIZMA A6986G GENA *CYP3A5* U SKUPINI PRIMATELJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Ivana Domazet

UČESTALOST POLIMORFIZMA A6986G GENA *CYP3A5* U SKUPINI PRIMATELJA TRANSPLANTIRANOG BUBREGA

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva, Odjela laboratorijske dijagnostike i kliničke transfuzijske medicine, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Saška Marczi

Rad ima 28 listova, tri (3) tablice i četiri (4) slike.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Saški Marczi koja je pratila proces pisanja završnog rada i koja me je svojim znanjem savjetovala i usmjeravala k završetku studija. Zahvaljujem i svojoj obitelji koja mi je pružala podršku i omogućila školovanje te završetak studija.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Metabolizam lijekova 1

1.1.1. Citokrom P450 3A5 2

1.1.2. Gen *CYP3A5* 2

1.2. Značaj ispitivanja genskog polimorfizma A6986G u genu *CYP3A5* kod bolesnika s transplantiranim bubregom 3

1.2.1. Transplantacija bubrega 3

1.2.2. Imunosupresivni lijekovi u kliničkoj praksi transplantacije bubrega 4

1.2.3. Gen *CYP3A5* u metabolizmu takrolimusa 6

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 8

3. ISPITANICI I METODE 9

3.1. Ustroj istraživanja 9

3.2. Ispitanici i uzorci 9

3.3. Metode 9

3.3.1. Ekstrakcija genomske DNA 10

3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA 11

3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR) 11

3.3.4. Analiza krivulje taljenja DNA visoke rezolucije (*high resolution melting*) 13

3.3.5. Statistička obrada podataka 14

4. REZULTATI 15

4.1. Analiza rezultata genotipizacije A6986G u genu *CYP3A5* 15

4.2. Raspodjela genotipova i učestalost alelnih varijanti polimorfizma A6986G u genu *CYP3A5* u skupini primatelja transplantiranog bubrega 17

4.3. Usporedba genotipova i učestalosti alelnih varijanti polimorfizma A6986G u genu *CYP3A5* između skupina primatelja transplantiranog bubrega u različitim populacijama .. 19

5. RASPRAVA 21

6. ZAKLJUČAK 23

7. SAŽETAK 24

8. SUMMARY 25

9. LITERATURA 26

10. ŽIVOTOPIS 28

POPIS KRATICA

ABO	krvne grupe
ATP	adenozin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)
AUC_{0-12}	područje koncentracija ispod krivulje vrijeme/koncentracija (engl. *area under the curve*)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. *body mass indeks*)
C_0	početna koncentracija
CD145	engl. *cluster of differentiation 145*
CD40L	engl. *cluster of differentiation 40*
Cmax	maksimalna koncentracija (engl. *maximum concentration*)
c-myc	engl. *celullar myc*
Cp	engl. *crossing point*
CYP	citokrom
Cγ1	fosfolipaza
DAG	diacilglicerol
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
$dnAUC_{0-12}$	engl. *dose-normalized area under the curve*
dnC_0	engl. *dose-normalized trough levels*
dnCmax	engl. *dose-normalized maximum concentration*
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
dsDNA	dvostruko zavijena DNA (engl. *double stranded*)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
FK506	takrolimus
FKBP	engl. *FK binding protein*
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)
HLA	humani leukocitni antigen (engl. *human leukocyte antigen*)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)
H-ras	engl. *human ras*
HRM	taljenje DNA visoke rezolucije (engl. *high resolution melting*)

IFN-γ	engl. *interferon gamma*
IL	interleukin
IP_3	inozitol 1,4,5-trifosfat
LC	LightCycler
MDR-1	engl. *multidrug resistance 1*
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid
NFAT	(engl. *nuclear factor of activated T cells*)
pb	par baza
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
PIP_2	fosfatidilinozitol 4,5 bifosfonat
pre-mRNA	engl. *precursor mRNA*
t1/2	vrijeme poluživota (engl. *half-life time*)
TBZ	terminalno bubrežno zatajenje
Tmax	vrijeme kada je maksimalna koncentracija postignuta
TNF	engl. *tumor necrosis factor*
UDP	uridin difosfat
UV-Vis	engl. *ultraviolet-visible*
ZAP-70	ζ-vezana bjelančevina (engl. *zeta associated protein*)

1. UVOD

1.1. Metabolizam lijekova

Metabolizam lijekova odgovoran je za pretvaranje lijekova u spojeve koji su bolje topljivi u vodi i lakše se izlučuju, ali također mogu biti uključeni u pretvorbu prolijekova u aktivne spojeve ili pretvorbu lijekova u toksične metabolite. Postoje dva puta metabolizma lijekova: reakcije faze I (oksidacija, redukcija i hidroliza) i reakcije konjugacije faze II (glukuronidacija, acetilacija, sulfatacija i metilacija). Navedena je klasifikacija povijesna i ne mora se nužno odnositi na redoslijed reakcija u metabolizmu lijekova. Sve reakcije služe istoj općoj svrsi, pretvaranju lipofilnih lijekova u hidrofilne metabolite za izlučivanje. Popis genetskih varijanti koje utječu na funkciju enzima koji metaboliziraju lijekove i dovode do promijenjenog terapijskog učinka brzo se širi (1).

Većina reakcija faze I katalizirane su hemoproteinima superobitelji citokroma P450. Enzimi citokrom P450 proteinske su strukture koje sadrže prostetičku skupinu hem. Njihov kompleks s ugljikovim (II) oksidom (CO) ima maksimum apsorpcije na 450 nm. Citokromi P450 imaju hidroksilaznu ulogu. U ciklusu citokrom P450-hidroksilaza u redukciji tih citokroma sudjeluju NADH i NADPH, a aktivirani oblik citokroma zatim aktivira kisik O_2. Enzimi P450 koji su uključeni u fazu I metabolizma lijekova jesu CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6 i CYP2E1. Ostali enzimi uključeni u fazu I jesu glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, 5-fluorouracil, flavin monooksigenaza, alkoholna i aldehidna dehidrogenaza i monoaminooksidaze (1).

Enzimi faze II odgovorni su za konjugaciju raznih molekula, što rezultira metabolitima koji su bolje topljivi u vodi i koji mogu biti izlučeni u urinu ili stolici. Enzimi faze II podložni su, također, fenotipskim varijacijama. Enzimi uključeni u fazu II jesu *N*-acetiltransferaza 2, tiopurin metiltransferaza i UDP glukuroniltransferaza (1).

1.1.1. Citokrom P450 3A5

Podobitelj *CYP3A*, koja se sastoji od četiriju gena, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* i *CYP3A43*, i triju pseudogena, *CYP3AP1*, *CYP3AP2* i *CYP3AP3*, sastoji se od 231 para baza i smještena je na kromosomu 7q21-q22.1 (2).

Produkt gena *CYP3A5*, enzim citokrom P450 3A5, jedan je od metaboličkih enzima faze I metabolizma ksenobiotika, a tkivno je izrazito rasprostranjen u stanicama jetre i sluznice tankog crijeva. (3).

Zabilježeno je da je CYP3A5 izražen više nego li CYP3A4 u jetri kao i u tankom crijevu, debelom crijevu, plućima, jednjaku, bubregu, nadbubrežnoj žlijezdi, prednjem režnju hipofize, grudima, prostati i polimorfonuklearnim leukocitima. Interakcije koje uključuju inhibiciju CYP3A enzima vjerojatno su im više zajedničke nego li interakcije koje uključuju njihovu indukciju. Ekspresija *CYP3A5* gena može biti određena individualnom osjetljivošću na interakcije lijekova koje uključuju inhibiciju (2).

Većina spojeva koji su supstrati za enzim CYP3A4, također, su metabolizirani enzimom CYP3A5, obično s većom katalitičkom učinkovitošću (2). Mnogobrojni su supstrati za CYP3A4 i za CYP3A5. Među njima je i inhibitor kalcineurina, takrolimus (1).

1.1.2. Gen *CYP3A5*

Gen *CYP3A5* ima 13 egzona koji kodiraju proteinski produkt od 502 aminokiseline (2).

Alelna varijanta CYP3A5*3 (G), polimorfizma A6986G u intronu 3, najčešća je i funkcionalno važna varijanta u svim proučavanim etničkim populacijama (2). Samo je kod 10 % Europljana eksprimiran *CYP3A5*, uglavnom zbog varijante CYP3A5*3 koja predstavlja polimorfizam u G, tj. zamjenu adenina gvaninom na položaju 6986. Ta supstitucija rezultira defektnim prekrajanjem pre-mRNA (1). Alternativno prekrojena mRNA sadrži inserciju od 131 pb između egzona 3 i egzona 4. Umetanje uzrokuje pomak okvira čitanja i preuranjeni završni kodon (STOP kodon), tako da je kodirani protein okrnjen na aminokiselinskom ostatku 102, što za posljedicu ima gubitak enzimske aktivnosti. Također, identificirani su rijetki polimorfizmi koji utječu na aktivnost CYP3A5 kod pojedinaca kod kojih je

eksprimiran enzim. Prema nomenklaturi citokroma P450, bilo koji alel pozitivan za 6986A označen je kao CYP3A5*1, dok svaki alel pozitivan za 6986G ima oznaku CYP3A5*3. Alel CYP3A5*1 ima učestalost od 5 do 7 % kod europskih bijelaca u usporedbi s oko 40 % kod Afrikanaca i Afroamerikanaca te 25 % u raznim azijskim etničkim skupinama (2). Ostali polimorfizmi, CYP3A5*6 i CYP3A5*7, također rezultiraju nenormalnim spajanjem i dominantni su polimorfizmi kod Afroamerikanaca (1).

1.2. Značaj ispitivanja genskog polimorfizma A6986G u genu *CYP3A5* kod bolesnika s transplantiranim bubregom

1.2.1. Transplantacija bubrega

Metoda kojom se zdravi bubreg kirurškim putem vadi iz tijela darivatelja i prenosi u tijelo primatelja, gdje se smješta u donji dio trbušne šupljine primatelja (u zdjelicu) zove se transplantacijom, odnosno presađivanjem bubrega. „Stari“ bubrezi najčešće se ne odstranjuju. Darivatelj bubrega može biti živa ili umrla osoba. Najčešće su živi darivatelji krvno srodni ili nesrodni članovi obitelji bolesnika, ali to mogu biti i nesrodne osobe izvan obitelji koje imaju dobru podudarnost tkiva s bolesnikom. Bolesnik prijavljen na listu čekanja može dobiti bubreg od preminulog darivatelja, što je druga mogućnost. U prosjeku bolje i dulje funkcioniraju bubrezi živog darivatelja nego bubrezi umrlog darivatelja (4).

Pokretanje transplantacijske reakcije usmjerene na odbacivanje presatka u primatelja izaziva presađivanje tkivno nepodudarnog bubrežnog presatka. Tu imunosnu reakciju posreduje niz tkivnih antigena među kojima dominantan utjecaj na preživljavanje bubrežnog presatka imaju ABO i HLA podudarnost između primatelja i darivatelja (5). Stoga, kod transplantacije bubrega provodi se predtransplantacijski probir koji obuhvaća utvrđivanje krvne grupe i provođenje HLA tipizacije primatelja i darivatelja te utvrđivanje preosjetljivosti primatelja na antigene darivatelja (6).

Za liječenje bolesnika s terminalnim stadijem kroničnog bubrežnog zatajenja (TBZ) metoda izbora jest transplantacija bubrega. Ako nemaju apsolutnih kontraindikacija, mogući kandidati za presađivanje svi su bolesnici s terminalnim stadijem kroničnog bubrežnog zatajenja. Apsolutne su kontraindikacije proširena maligna bolest s predviđenim kratkim

trajanjem života, HIV pozitivnost i aktivna infektivna bolest i/ili bilo koja bolest s očekivanim trajanjem života manjim od dvije godine. Međutim, kandidati za presađivanje bubrega nisu svi bolesnici sa završnim oštećenjem funkcije bubrega, odnosno nisu osobe u visokoj dobi, one koje imaju tešku bolest srca i/ili krvnih žila te je za njih sigurnije da nastave liječenje dijalizom (4).

Prednosti su transplantacije bubrega neovisnost o dijalizi, sloboda kretanja, mogućnost povratka na radno mjesto, normalna tjelesna aktivnost i uravnotežena prehrana. Uspješno presađivanje bubrega znatno pridonosi poboljšanju kvalitete života i, u usporedbi s bolesnicima koji se liječe dijalizom, smanjuje rizik od smrti. Najučinkovitija metoda nadomještanja bubrežne funkcije presađivanje je bubrega, a dobru prognozu preživljavanja bolesnika s presađenim bubregom omogućuje primjena suvremenih lijekova protiv odbacivanja, a neki su od njih imunosupresivi (4).

1.2.2. Imunosupresivni lijekovi u kliničkoj praksi transplantacije bubrega

Uloga je imunosupresiva u transplantaciji prevencija odbacivanja transplantiranih organa i tkiva. Međutim, imunosupresivi mogu biti i uzrokom brojnih neželjenih posttransplantacijskih komplikacija (6). U svrhu moduliranja imunološke reakcije organizma kod bubrežne transplantacije primjenjuje se kombinirana terapija koja uključuje nekoliko imunosupresiva, obično klasificiranih prema mehanizmu djelovanja. Osnovne su skupine imunosupresiva prema mehanizmu djelovanja inhibitori kalcineurina (ciklosporin, takrolimus), inihibitori sinteze purina (mikofenolat mofetil/mikofenolna kiselina, azatioprin), rapamicini (sirolimus, everolimus). Navedeni se lijekovi često primjenjuju s glukokortikoidima (metilprednizolon, prednizolon) i, tijekom indukcije terapije, s monoklonskim ili poliklonskim protutijelima (npr. basiliksimab, timoglobulin) (7). Jednogodišnje preživljavanje bubrežnih presadaka uz navedene lijekove iznosi više od 90 %, a učestalost akutnih reakcija odbacivanja do 15 %. Primjenjuje se istovremeno više različitih imunosupresivnih lijekova jer pojedini lijekovi imaju različito mjesto djelovanja u imunosnom odgovoru. Također, omogućeno je smanjenje doze, a time i štetnog djelovanja, jer neki lijekovi pokazuju aditivni ili sinergijski učinak (8).

Takrolimus, jedan od inhibitora kalcineurina, blokira transkripcijske procese u limfocitima T koji su nužni za stvaranje citokina, te na taj način selektivno inhibira

proliferaciju i aktivaciju limfocita T. Takrolimus, kao i ciklosporin, smanjuje aktivaciju limfocita i proizvodnju citokina inhibiranjem kalcineurinskog puta prijenosa signala u stanici. Nakon što se antigen vezao za T stanični receptor, fosforilaciju fosfolipaze Cγ1 uzrokuje fosforilacija ZAP-70 (engl. *zeta associated protein*). Fosfolipaza Cγ1 hidrolizira membranski fosfolipid fosfatidilinozitol 4,5 bifosfonat (PIP_2) u inozitol 1,4,5-trifosfat (IP_3) i diacilglicerol (DAG). IP_3 uzrokuje porast koncentracije kalcija u stanici. Kalcij vezivanjem za kalmodulin tvori kompleks koji aktivira nekoliko enzima, uključujući fosfatazu kalcineurin (8), kalcij/kalmodulin ovisnu protein fosfatazu koja je eksprimirana u svim tkivima sisavaca (2). Takrolimus tvori kompleks koji inhibira aktivnost kalcineurina vezivanjem za citoplazmatski receptor FKBP (engl. *FK binding protein*), FK506 vezujući proteini FKBP-12 i FKBP-52, koji pripada skupini imunofilina. Na taj se način smanjuje defosforilacija regulacijskog proteina NFAT (engl. *nuclear factor of activated T cells*) i onemogućava se njezina translokacija u jezgru. Posljedično, izražaj nekoliko citokinskih gena značajnih za aktivaciju limfocita T, uključujući gene za IL-2, IL-4, IFN-γ i TNF-α, gen za CD154 (CD40L), kao i izražaj protoonkogena na H-ras i c-myc, ometa se (2).

Lijek takrolimus se najčešće koristi kod transplantacije bubrega, jetre, gušterače i crijeva. Može se početi primjenjivati u vrijeme transplantacije ili nakon zahvata. Ovisno o koncentraciji lijeka u krvi, koji je pod utjecajem interakcije s drugim lijekovima, treba prilagoditi doziranje (6). Takrolimus ima uski terapijski raspon i veliku farmakokinetičku varijabilnost, što komplicira uspostavljanje režima doziranja (9). S obzirom na to da mu je terapijski raspon unutar uskih granica, važno je odrediti optimalno individualizirano doziranje terapije (10) kako bi se prevenirao rizik subterapijskih ili toksičnih koncentracija u krvi. Subterapijska koncentracija takrolimusa u krvi uvelike povećava rizik od odbacivanja transplantata, dok visoka koncentracija takrolimusa u krvi može dovesti do ozbiljnih nuspojava kao što su nefrotoksičnost, neurotoksičnost, hiperglikemija, (9) dijabetogeneza, gastrointestinalni poremećaji, infekcije i malignitet (2).

Takrolimus je supstrat enzima CYP3A4 i CYP3A5 u jetri i stijenci crijeva te ATP-ovisne membranske pumpe P-glikoproteina (9). P-glikoprotein smanjuje unutarstaničnu koncentraciju takrolimusa pumpanjem apsorbiranog lijeka natrag u lumen crijeva. Također, P-glikoprotein može regulirati pristup takrolimusa enzimima CYP3A i sprječava da ti enzimi budu prezasićeni visokom koncentracijom lijeka u crijevu. Kako se takrolimus brzo

transportira iz mukoznih stanica crijeva te se zatim pasivno reapsorbira, kontinuirana ponovljena izlaganja trebala bi rezultirati učinkovitijim metabolizmom (2).

Raspoloživost i koncentracija takrolimusa u krvi pod utjecajem su polimorfnih genetičkih varijanti gena čiji produkti sudjeluju u metabolizmu takrolimusa (7).

1.2.3. Gen *CYP3A5* u metabolizmu takrolimusa

Veliki broj studija pokazao je utjecaj genotipa *CYP3A5* na doziranje i klirens često korištenih imunosupresiva, takrolimusa, ciklosporina i sirolimusa kod bolesnika s transplantiranim organima. Postupnim višestrukim regresijskim analizama utvrđeno je da genotip *CYP3A5* može objasniti približno 35 % varijacija promatranih u koncentracijama takrolimusa kod transplantiranih pacijenata (2). Bolesnici koji su homozigoti za CYP3A5*3 zahtijevaju približno 50 % nižu dozu takrolimusa za postizanje terapijske doze lijeka u plazmi u usporedbi s bolesnicima koji imaju barem jednu alelnu varijantu divljeg tipa, CYP3A5*1 (7). Osim prisutnosti određene alelne varijante CYP3A5*1 i/ili CYP3A5*3, ostali čimbenici poput spola, dobi, indeksa tjelesne mase (BMI), vremena proteklog od transplantacije i uzimanja steroida također mogu pridonijeti širokoj varijabilnosti u doziranju. Moguće je da genotipizacija *CYP3A5* može biti dio genetskog testa za predviđanje potrebne doze takrolimusa (2).

Nekoliko je studija pokazalo utjecaj alelne varijante CYP3A5*3 na koncentraciju C_0 (početna koncentracija) takrolimusa, farmakokinetičke parametre AUC_{0-12} (područje koncentracija ispod krivulje vrijeme/koncentracija), Cmax (maksimalna koncentracija), Tmax (vrijeme kada je maksimalna koncentracija postignuta), t1/2 (vrijeme poluživota) i dnevnu dozu takrolimusa u skupinama pacijenata s različitim transplantatom. Zbog nedostatka aktivnosti CYP3A5 uzrokovanog alelnom varijantom CYP3A5*3, pacijenti s transplantatom koji su homozigoti za alelnu varijantu CYP3A5*3 zahtijevaju gotovo dvostruko nižu dnevnu dozu takrolimusa i postižu čak više normalizirane doze dnC_0, $dnAUC_{0-12}$ i dnCmax u usporedbi s primateljima transplantata koji imaju barem jednu alelnu varijantu CYP3A5*1. Odnosno, pacijenti koji imaju barem jednu alelnu varijantu divljeg tipa, CYP3A5*1, pokazuju dvostruko manju dnC_0, $dnAUC_{0-12}$ i dnCmax za takrolimus i zahtijevaju dvostruko veću dozu takrolimusa za postizanje terapijske doze lijeka u plazmi u usporedbi s CYP3A5*3

homozigotima. Stoga, genotipizacija polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* može doprinijeti optimizaciji početne doze terapije takrolimusom kod transplantiranih pacijenata (9).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Genotipizacija polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* u skupini bolesnika s transplantiranim bubregom.

2. Određivanje učestalosti navedenog polimorfizma u skupini primatelja transplantiranog bubrega.

3. Usporedba učestalosti genotipova i alela polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* među skupinama primatelja transplantiranog bubrega u različitim populacijama.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Rad je osmišljen kao prospektivna presječna studija (11).

3.2. Ispitanici i uzorci

Skupinu ispitanika sačinjavalo je 30 primatelja transplantiranog bubrega, što je bio i kriterij za odabir ispitanika. Sudjelovanje ispitanika u istraživanju bilo je dobrovoljno. Svaki je ispitanik informiran o cilju, svrsi i metodologiji istraživanja, povjerljivosti podataka i pravu na informaciju o rezultatima testa. Ispitanici su pisanim putem u obrascu obaviještenog pristanka dali svoj pristanak za sudjelovanje u istraživačkom radu, s tim da su mogli slobodno u bilo kojoj fazi istraživanja opozvati svoj pristanak. Prilikom odabira sudionika nije bilo diskriminacije prema dobi, spolu, etničkoj pripadnosti, vjeri ili bilo kojem drugom kriteriju. Rezultati testiranja u prikupljenim uzorcima anonimnog su i agregiranog karaktera.

Prikupljanje uzoraka krvi ispitanika provedeno je od 29. ožujka do 4. travnja 2017. godine tijekom njihove redovite kontrole u Zavodu za nefrologiju KBC-a Osijek. Uzorkovana je puna periferna krv u standardizirane epruvete s antikoagulansom EDTA.

Istraživanje je odobrilo etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek.

3.3. Metode

Postupci izolacije DNA iz prikupljenih uzoraka krvi ispitanika i genotipizacije polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* izvođeni su od travnja do lipnja 2017. godine u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

3.3.1. Ekstrakcija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz uzorka pune periferne krvi s antikoagulansom EDTA prema uputama proizvođača komercijalnog seta za izolaciju humanog genomskog materijala iz krvi, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka).

Materijal: 200 µL uzorka krvi, High Pure PCR Template Preparation set, izopropanol, apsolutni etanol, destilirana H_2O

Pribor: mikropipete (20 µL, 200 µL, 1000 µL), nastavci (sterilni, nekorišteni), plastične tubice (1,5 mL i 2,0 mL, sterilne, nekorištene), mikrocentrifuga (2000 – 14200 o/min) s regulacijom temperature, grijač/*shaker* 20 × 2 mL tubice, zamrzivač (-20 ºC), hladnjak (+4 ºC), nitrilne zaštitne rukavice bez pudera

Postupak: U sterilnu tubicu volumena 1,5 mL, u kojoj se nalazi 200 µL uzorka pune krvi, doda se 200 µL pufera za razgradnju proteina (6 M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20 % Triton X-100 (v/v), pH 4,4 (+25 ºC)) i 40 µL vodene otopine proteinaze K. Sadržaj u tubici potrebno je odmah promiješati te inkubirati 10 minuta na 70 ºC. Nakon inkubacije doda se 100 µL izopropanola, dobro se promiješa i promiješani sadržaj prebaci se u tubicu sa staklenom mrežicom koja se nalazi smještena u kolektor tubici. Zatim je potrebno centrifugirati 1 minutu pri brzini 8000 × g. Nakon centrifugiranja tubica sa staklenom mrežicom prebaci se u novu kolektor tubicu te se doda 500 µL pufera za uklanjanje inhibitora (5 M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (+25 ºC)) te se ponovno centrifugira 1 minutu pri brzini 8000 × g. Dalje se kolektor tubica zamijeni novom te se doda 500 µL pufera za ispiranje (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (+25 ºC)). Ponovno se centrifugira 1 minutu pri brzini 8000 × g. Još jednom se ponovi postupak ispiranja. Zatim se centrifugiranjem 10 sekundi pri brzini 13000 × g dodatno uklanja ostatak pufera s mrežice. Dalje se DNA eluira tako što se tubica sa staklenom mrežicom stavi u nekorištenu, sterilnu tubicu volumena 1,5 mL te se doda 200 µL prethodno zagrijanog (70 ºC) eluacijskog pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (+25 ºC)) i centrifugira se 1 minutu pri brzini 8000 × g. Sada sterilna tubica sadrži eluiranu DNA. Takva eluirana DNA može se koristiti izravno ili se može na kraće razdoblje pohraniti na temperaturi od +2 do +8º C ili se može skladištiti na temperaturi od -15 do -25 ºC za kasnije analize.

3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Uzorci genomske DNA spektrofotometrijski su analizirani u svrhu određivanja koncentracije i provjere čistoće uzorka DNA. Određivanje koncentracije DNA omogućuje vrijednost apsorbancije mjerene pri valnoj duljini 260 nm. Informaciju o čistoći DNA, odnosno prisutnosti proteina u uzorku, daje omjer apsorbancija OD_{260}/OD_{280}. Kod čiste DNA taj je omjer između 1,8 i 2,0. Na kontaminaciju uzorka organskim spojevima i/ili kontaminaciju s TRIS, EDTA i drugim puferskim solima ukazuje povećana apsorbancija pri valnoj duljini 230 nm.

Materijal: pufer u kojem su otopljeni uzorci DNA (eluacijski pufer iz seta za izolaciju DNA), uzorci genomske DNA

Pribor: UV-Vis spektrofotometar (SpectraMax QuickDrop), mikropipeta volumena do 10 µL, nastavci (sterilni, nekorišteni), nitrilne rukavice bez pudera

Postupak: Na spektrofotometru odabere se opcija mjerenja koncentracije DNA. Volumen od 2 µL uzorka DNA nanese se pipetom na optičku podlogu uređaja. Nakon izvršenog mjerenja, uređaj prikaže vrijednosti apsorbancija pri valnim duljinama 260 nm, 280 nm i 230 nm te izračun koncentracije DNA. Umjesto uzorka, pri prvom mjerenju, mjerenje se izvrši za pufer u kojem su uzorci genomske DNA resuspendirani, što u daljnjim mjerenjima služi kao „slijepa proba“. Iznimno je važno da koncentracije uzoraka budu ujednačene za analizu rezultata genotipizacije metodom High Resolution Melting. Stoga je nakon mjerenja svakom uzorku DNA pomoću TE pufera prilagođena koncentracija na 15 ng/µL, što je, u postupku umnožavanja željenog odsječka gena *CYP3A5*, bila početna koncentracija.

3.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR)

Postupak umnažanja odsječka gena *CYP3A5* provođen je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time* PCR) modificiranoj prema radu Shi Yunying i sur. 2013 (12).

Real-time PCR modifikacija je standardnog PCR-a pri kojemu se prati količina umnožene DNA u određenom vremenu. U odnosu na standardni PCR u kojemu se umnožena DNA detektira na kraju analize, u *real-time* PCR-u umnožena DNA mjeri se kako reakcija

napreduje, u stvarnom vremenu, s kvantificiranjem produkta poslije svakog ciklusa. Podatci koji se dobiju daju informacije o identitetu, količini i slijedu uzorka nukleinske kiseline. Najjednostavniji način praćenja količine novonastale DNA jest interkaliranje specifičnih fluorescentnih boja u dvolančanu DNA (13).

Materijal: komercijalni set LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics), uzorci genomske DNA ispitanika, neobilježene početnice HPLC čistoće

Sastav LC480 HRM Master seta:
FastStart Taq DNA polimeraza, reakcijski pufer, smjesa dNTP, High Resolution Melting boja, $MgCl_2$ i H_2O PCR čistoće.

Slijed baza početnica:

CYP3A5-F: 5'-ACCACCCAGCTTAACGAATG-3'

CYP3A5-R: 5'-TTGTACGACACACAGCAACCT-3'

Oznaka F označava *forward* (5'→3'), a R označava *reverse* (3'→5') smjer slijeda baza.

Pribor: *Real-time* PCR uređaj LightCycler 480II (Roche Diagnostics), PCR kabinet za sterilni rad (Aura PCR, Bioair Euroclone Division), mikrotitarske ploče za LC 480 (bijele, 96 jažica, Roche), Centrifuga Multifuge® 3S/3S-R (Heraeus), *short-spin* centrifuga, mikropipete (2,5 µL, 10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL), filter nastavci (sterilni, nekorišteni), plastične tubice (0,5 mL i 2 mL), alu folija, zamrzivač (-20 ºC), nitrilne zaštitne rukavice bez pudera

Postupak: PCR reakcijska smjesa sadrži Master Miks (FastStart Taq DNA polimeraza, reakcijski pufer, smjesa dNTP, High Resolution Melting boja) konačne koncentracije 1 x, početnice konačne koncentracije 0,08 µM, 2 mM $MgCl_2$ i 1 ng/µL DNA kalupa. U ukupnom volumenu 20 µL PCR reakcijske smjese umnažan je specifični odsjek gena *CYP3A5*. Negativna kontrola, kada se umjesto DNA kalupa stavi voda PCR čistoće, vožena je uvijek zajedno s uzorcima.

Tablica 1. Program za *real-time* PCR i HRM analizu umnoženog produkta DNA

Temperatura (°C)	Trajanje (hh:mm:ss)	Brzina grijanja/hlađenja (°C/s)	
95	00:15:00	4,4	Preinkubacija
95	00:00:10	4,4	Amplifikacija
60	00:00:15	2,2	
72	00:00:20	4,4	
95	00:01:00	4,4	Krivulja taljenja
40	00:01:00	2,2	
65	00:00:01	0,01	
95	-	-	
40	00:00:10	2,2	Hlađenje

3.3.4. Analiza krivulje taljenja DNA visoke rezolucije (*high resolution melting*)

Analiza krivulje taljenja visoke rezolucije (engl. *high resolution melting,* HRM) metoda je koja se koristi nakon provedenog PCR-a za identificiranje varijacija u sekvencama nukleinskih kiselina. Metoda se temelji na detektiranju malih razlika u krivuljama taljenja. Omogućena je poboljšanom bojom koja se veže za dvostruko zavijenu DNA (engl. *double stranded,* dsDNA) koja se koristi u real-time PCR-u. Prednosti su metode niska potrošnja reagensa jer zahtjeva samo volumen PCR reakcijske smjese za analizu svakog uzorka te nije potrebna dodatna instrumentacija nakon PCR amplifikacije jer krivulja može biti dodana na kraju amplifikacije i može se analizirati odmah nakon završetka (14).

Pomoću računalnog programa LightCycler 480 Gene Scaning Software (Roche Diagnostics) provedena je analiza krivulja taljenja DNA visoke rezolucije (HRM). Prije same analize provjerene su Cp vrijednosti (engl. *crossing point*) krivulja PCR amplifikacije odsječka DNA uzoraka. Točka na krivulji u kojoj se intenzitet fluorescencije naglo povećava (nekoliko standardnih devijacija iznad bazne linije) je Cp vrijednost. Za dobre rezultate metode High Resolution Melting preduvjet je da sve Cp vrijednosti jedne vožnje budu manje od 30 ciklusa i da su u granicama 3 ciklusa. Prilikom daljnje analize rezultata vrši se: (1)

normalizacija krivulja taljenja, (2) pomak temperature krivulja fluorescencije (engl. *temperature shifting*) i (3) grupiranje krivulja s obzirom na kombinacije alelnih varijanti.

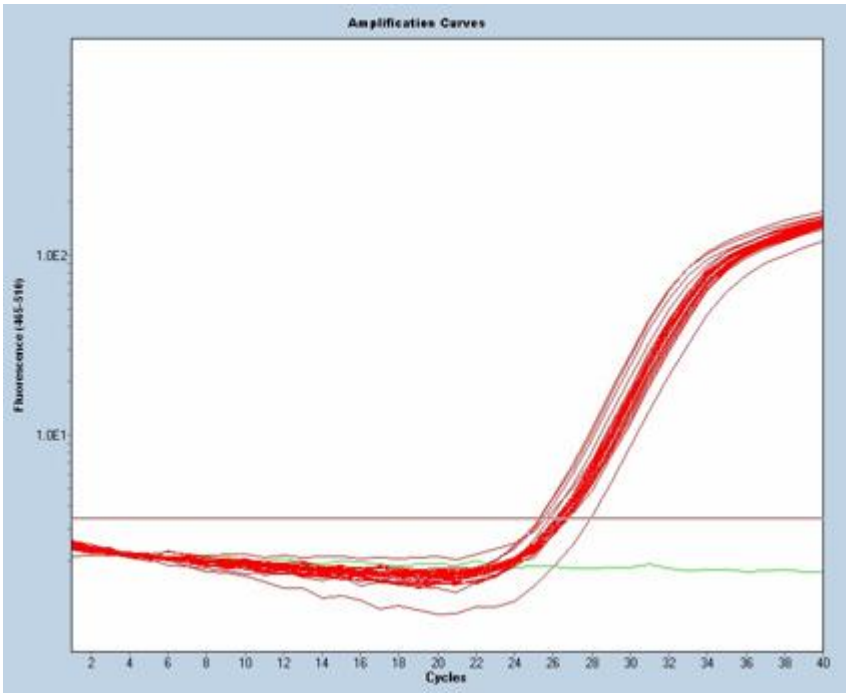
3.3.5. Statistička obrada podataka

Direktnim brojanjem određena je učestalost alelnih varijanti polimorfizma A6986G gena *CYP3A5*. Deskriptivna statistika rezultata učinjena je s obzirom na grupiranje podataka prema spolu ispitanika uz uporabu programa Microsoft Excel 2013. Usporedba učestalosti genotipova i alelnih varijanti učinjena je Fischerovim egzaktnim testom i tablicom 2 × 2 uporabom statističkog programa Statistica 12. *P* vrijednosti su dvostrane, s razinom značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI

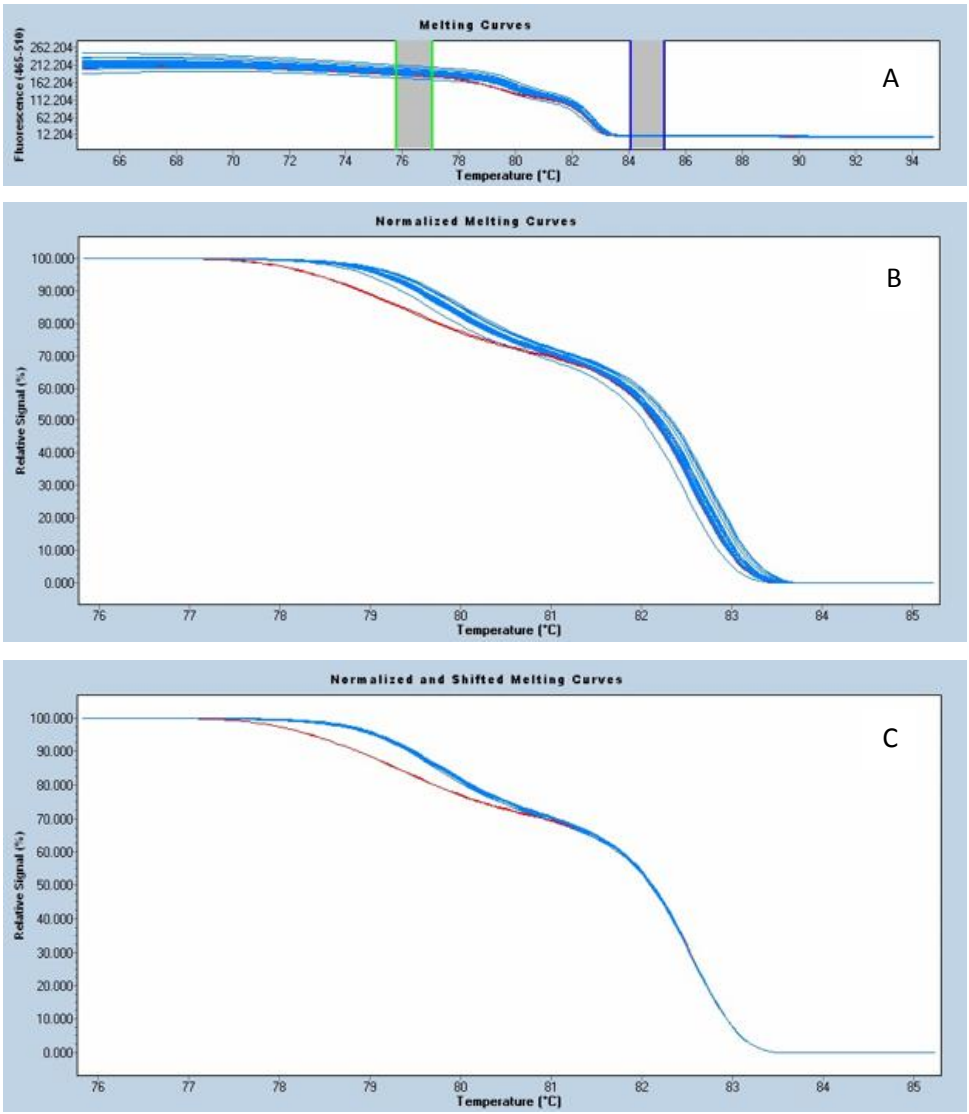
4.1. Analiza rezultata genotipizacije A6986G u genu *CYP3A5*

Zadovoljeni su uvjeti potrebni za analizu krivulje taljenja DNA visoke rezolucije zato što su sve Cp vrijednosti krivulja PCR amplifikacije bile između 25,34 i 27,92 (Slika 1.).



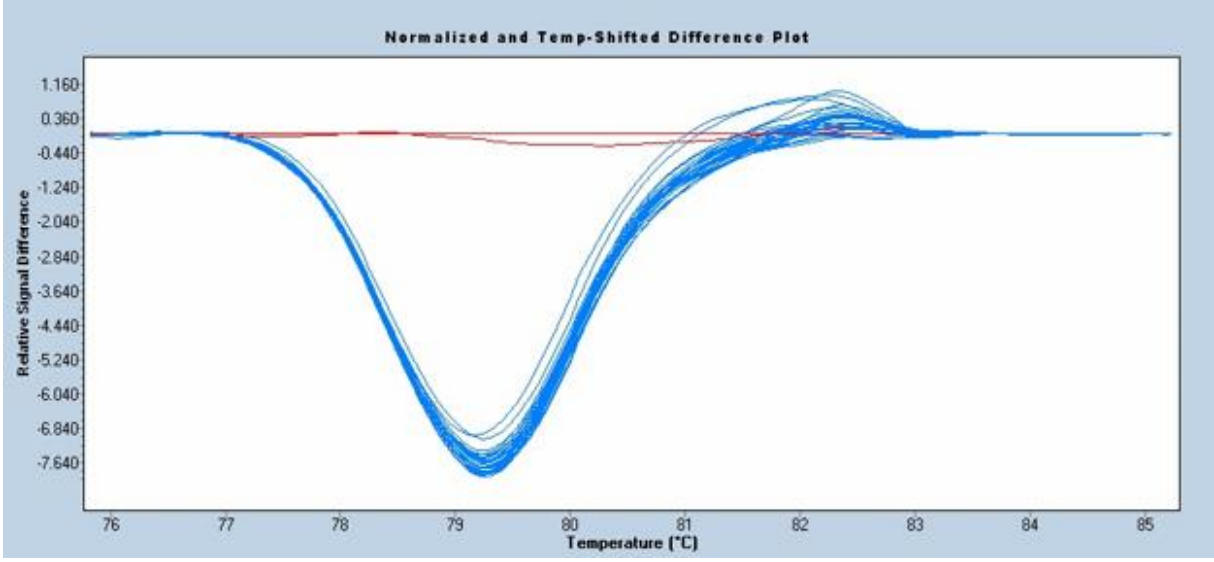
Slika 1. Prikaz krivulje PCR amplifikacije odsječka gena *CYP3A5*

Analiza rezultata vršena je pomoću LightCycler 480 Gene Scaning programa u tri koraka. Taljenjem umnoženog odsječka DNA uslijed povišenja temperature nastaje krivulja taljenja (Slika 2. A). Pomoću računalnog programa vrši se njezina normalizacija (Slika 2. B) te promjena po temperaturi (Slika 2. C).



Slika 2. Krivulje taljenja DNA umnoženog odsječka gena *CYP3A5* (A) u fazama normalizacije (B) i temperaturnog pomaka fluorescentnih krivulja (C)

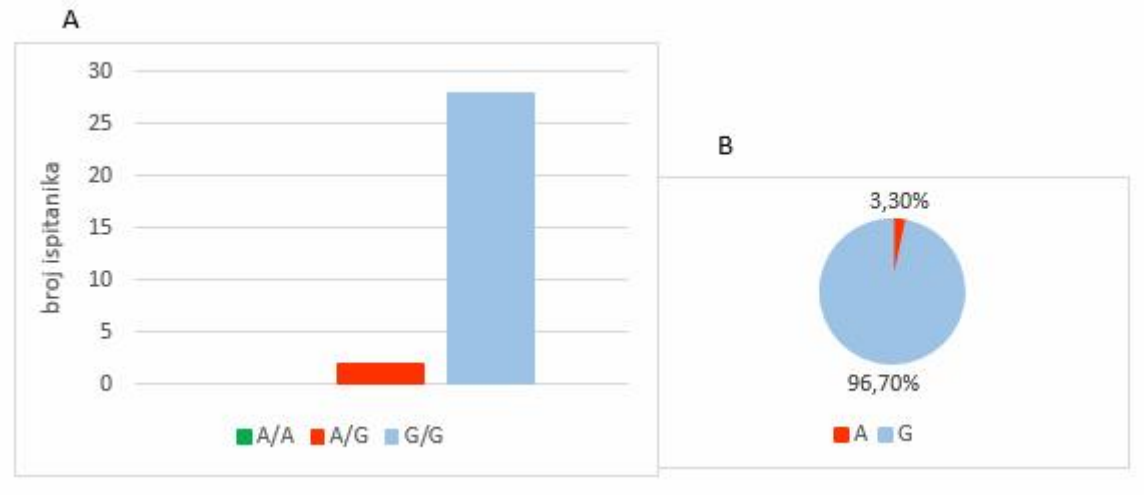
Daljnjim razdvajanjem krivulja na temelju relativne razlike signala fluorescencije ovisno o temperaturi specifično se razdvoje krivulje pojedinih genotipova. Ovisno o tome koji se genotip definira kao osnovna krivulja, rezultati mogu biti prikazani na različite načine.



Slika 3. Konačne krivulje alelnih varijanti polimorfizma A6986G gena *CYP3A5*. Kao osnovna krivulja odabrana je krivulja heterozigotnog genotipa A/G (crveno), a ostale krivulje su krivulje homozigota G/G (plavo)

4.2. Raspodjela genotipova i učestalost alelnih varijanti polimorfizma A6986G u genu *CYP3A5* u skupini primatelja transplantiranog bubrega

Ispitivana skupina sastojala se od ukupno 30 primatelja bubrega prosječne dobi 57 ± 11 godina. Od 30 ispitanika 16 (53,3 %) je bilo muškaraca prosječne dobi 57 ± 11 (raspon 34 – 78) godina i 14 (46,7 %) žena prosječne dobi 57 ± 10 (raspon 41 – 68) godina. Raspodjela genotipova i učestalosti alelnih varijanti polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* u ukupnoj skupini ispitanika prikazani su na Slici 4. 28 bolesnika (93,3 %) su homozigoti G/G, dok su 2 bolesnika (6,7 %) heterozigoti A/G. Nijedan ispitanik nije bio homozigot divljeg tipa A/A za ispitivani polimorfizam.



Slika 4. Rapodjela genotipova (A) i alelne frekvencije (B) polimorfizma A6986G u genu *CYP3A5* u skupini primatelja transplantiranog bubrega

U objema skupinama ispitanika, i muškoj i ženskoj, najzastupljeniji je genotip G/G (93,75 %, odnosno 92,86 %) (Tablica 2.). Nema statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alelnih varijanti između skupina ispitanika muškog i ženskog spola (razina statističke značajnosti $P < 0,05$).

Tablica 2. Raspodjela genotipova i alelne učestalosti polimorfizma A6986G u genu *CYP3A5* prema spolu ispitanika

spol	broj ispitanika	Genotip			Alelne frekvencije	
		A/A	A/G	G/G	A	G
M	16	0	1 6,25 %	15 93,75 %	1 3,12 %	31 96,88 %
Ž	14	0	1 7,14 %	13 92,86 %	1 3,57 %	27 96,43 %
P		-	1,00	1,00	1,00	1,00

4.3. Usporedba genotipova i učestalosti alelnih varijanti polimorfizma A6986G u genu *CYP3A5* između skupina primatelja transplantiranog bubrega u različitim populacijama

Usporedbom raspodjele genotipova i alelnih frekvencija polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* (Tablica 3.) možemo vidjeti da između primatelja bubrega iz istočne Hrvatske i primatelja bubrega iz Srbije (15, 16), Poljske (17) i Nizozemske (2, 18) nema značajne razlike. Statistički značajna razlika vidljiva je između primatelja bubrega iz istočne Hrvatske i primatelja bubrega iz Indije (19) i iz Kine (20, 12).

Tablica 3. Raspodjela genotipova i učestalosti alela polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* u skupinama primatelja transplantiranog bubrega u različitim populacijama

	raspodjela genotipova			**alelna frekvencija (%)**		**broj ispitanika**	**referenca br.**
	A/A *1/*1	**A/G *1/*3**	**G/G *3/*3**	**A**	**G**		
istočna Hrvatska	**0**	**2 6,7 %**	**28 93,3 %**	**3,3**	**96,7**	**30**	
Srbija	1 0,5 %	25 11,8 %	185 87,7 %	6,4	93,6	211	15
P	1,00	0,753	0,888	0,560	0,922		
Srbija	0	10 16,39 %	51 83,61 %	8,2	91,8	61	16
P	-	0,333	0,748	0,344	0,822		
Poljska	0	7 7 %	93 93 %	3,5	96,5	100	17
P	-	1,000	1,000	1,000	1,000		
Nizozemska	1 1,59 %	14 22,22 %	48 76,19 %	12,69	87,31	63	2
P	1,000	0,143	0,625	0,104	0,654		

Nizozemska	9 3,04 %	48 16,22 %	239 80,74 %	11,15	88,85	296	18
P	1,000	0,285	0,677	0,108	0,699		
Indija	2 10 %	17 85 %	1 5 %	52,5	47,5	20	19
P	0,174	**$2{,}9\times10^{-4}$**	**$3{,}8\times10^{-4}$**	**$5{,}3\times10^{-6}$**	**0,037**		
Kina	10 10 %	38 38 %	55 53 %	28	72	103	20
P	0,121	**0,010**	0,083	**$2{,}0\times10^{-4}$**	0,166		
Kina	15 6,9 %	92 42,6 %	109 50,5 %	28,24	71,76	216	12
P	0,230	**$3{,}1\times10^{-3}$**	**0,037**	**$9{,}4\times10^{-5}$**	0,135		

Razina statističke značajnosti $P < 0{,}05$

5. RASPRAVA

Otkrićem povezanosti polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* s takrolimusom, genotipizacija polimorfizma može doprinijeti optimizaciji početne doze terapije takrolimusom kod transplantiranih pacijenata.

U ovom istraživanju učinjena je genotipizacija polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* i određena je učestalost navedenog polimorfizma u skupini od 30 primatelja transplantiranog bubrega u Zavodu za nefrologiju KBC-a Osijek. Uočena su dva različita genotipa za gen *CYP3A5* kod tih pacijenata, odnosno 28 pacijenata (93,3 %) su homozigoti G/G, a 2 pacijenta (6,7 %) su heterozigoti A/G. Nijedan pacijent nije bio homozigot divljeg tipa A/A. U obama spolovima najzastupljeniji je genotip G/G (kod muškog spola 93,75 %, odnosno kod ženskog spola 92,86 %). U raspodjeli genotipova i alelnih varijanti između skupina ispitanika muškog i ženskog spola nema statistički značajne razlike (razina statističke značajnosti $P < 0,05$).

Istraživanja Stefanović N. i sur. (16) i Vavić N. i sur. (15) provedena na primateljima transplantiranog bubrega u srpskoj populaciji pokazuju veći postotak pacijenata s genotipom G/G u odnosu na učestalost genotipa A/G, što je u skladu s ovim istraživanjem, ali u odnosu na ovo istraživanje veći je postotak pacijenata s genotipom A/G, a posljedično je manji postotak pacijenata s genotipom G/G (15, 16). U istraživanju Vavić N. i sur. učestalost genotipa A/A iznosi 0,5 % (15).

Rezultati istraživanja na poljskim pacijentima koje su proveli Zochowska D. i sur. gotovo su identični rezultatima ovog istraživanja, odnosno znatno je veći postotak pacijenata koji imaju genotip G/G u odnosu na postotak pacijenata s genotipom A/G, a nijedan pacijent nema genotip A/A (17).

Istraživanje Op den Buijsch R. i sur. provedeno je na nizozemskim pacijentima koji su primatelji bubrežnog transplantata. Veći je postotak pacijenata koji imaju genotip G/G u odnosu na postotak pacijenata s genotipom A/G, kao što je slučaj i u ovom istraživanju. Međutim, u odnosu na ovo istraživanje, veći je postotak pacijenata s genotipom A/G. 1 pacijent ima genotip A/A, dok u ovom istraživanju nijedan pacijent nema navedeni genotip (2).

Još jedno istraživanje na nizozemskim pacijentima koje su proveli Moes D. J. A. R. i sur. pokazuje da je veći postotak pacijenata s genotipom G/G u odnosu na učestalost genotipa

A/G, što je u skladu s ovim istraživanjem, ali u odnosu na ovo istraživanje veći je postotak pacijenata s genotipom A/G, a posljedično je manji postotak pacijenata s genotipom G/G. U istraživanju nizozemskih pacijenata sudjelovao je veći broj ispitanika, 296, i njih 9 (3,04 %) ima genotip A/A (18).

Od navedenih europskih istraživanja u kojima je određena učestalost polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* s rezultatima ovog istraživanja rezultati istraživanja na poljskim pacijentima najviše se podudaraju, rezultati istraživanja na srpskim pacijentima se manje podudaraju, dok se najviše razlikuju rezultati istraživanja na nizozemskim pacijentima.

U istraživanju Ashavaid T. F. i sur. koje je provedeno na indijskim pacijentima sudjelovalo je 20 pacijenata među kojima većinu čine muškarci (17), dok su u ovom istraživanju oba spola podjednako zastupljena. Značajno je veći postotak pacijenata koji imaju genotip A/G u odnosu na postotak pacijenata s genotipom G/G, što je suprotno rezultatima ovog istraživanje. Samo 1 (5 %) pacijent ima genotip G/G, dok njih 17 (85 %) ima genotip A/G, a 2 (10 %) pacijenta imaju genotip A/A. Zapravo, rezultati istraživanja Ashavaid T. F. i sur. najviše se razlikuju od rezultata ovog istraživanja (19).

Istraživanje na kineskim pacijentima koje su proveli Cheung C. Y. i sur. pokazuje da je postotak pacijenata s genotipom G/G manji, a s genotipovima A/G i A/A veći nego li u ovom istraživanju (20).

U Kini su Shi Y. i sur. proveli istraživanje u kojem je sudjelovalo 216 primatelja transplantirane jetre među kojima prevladavaju muškarci (170). U odnosu na ovo istraživanje u kojem su ispitanici primatelji bubrežnog transplantata, postotak je pacijenata s genotipom G/G manji, a s genotipovima A/G i A/A veći (12).

U navedenim istraživanjima u azijskim državama, Indiji i Kini, rezultati nisu u skladu s ovim istraživanjem. Između primatelja bubrega iz istočne Hrvatske u ovom istraživanju i primatelja bubrega iz Indije i Kine vidljiva je statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova i alela polimorfizma A6986G gena *CYP3A*.

Rezultati ovog istraživanja (Tablica 3.) potvrđuju literaturne navode za europsku bjelačku populaciju o učestalosti alela CYP3A5*1, tj. alela A, od 5 do 7% (2).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata o učestalosti polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* u skupini primatelja transplantiranog bubrega mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U skupini od 30 pacijenata s transplantiranim bubregom 28 pacijenata (93,3 %) su homozigoti G/G, dok su 2 pacijenta (6,7 %) heterozigoti A/G, a nijedan pacijent nije bio homozigot divljeg tipa A/A za ispitivani polimorfizam.

2. Učestalost alela A iznosi 3,3 %, a alela G 96,7 %.

3. U objema skupinama ispitanika, i muškoj i ženskoj, najzastupljeniji je genotip G/G (93,75 %, odnosno 92,86 %) te nema statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alelnih varijanti između skupina ispitanika muškog i ženskog spola.

4. Između primatelja bubrega iz istočne Hrvatske i primatelja bubrega iz Srbije, Poljske i Nizozemske nema značajne razlike, dok je statistički značajna razlika vidljiva između primatelja bubrega iz istočne Hrvatske i primatelja bubrega iz Indije i Kine.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Genotipizacija polimorfizma A6986G gena *CYP3A5*, određivanje učestalosti navedenog polimorfizma u skupini primatelja transplantiranog bubrega i usporedba učestalosti genotipova i alela polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* među skupinama primatelja transplantiranog bubrega u različitim populacijama.

Ispitanici i metode: Skupinu ispitanika sačinjava 30 primatelja transplantiranog bubrega obaju spolova (14 ženskog spola, 16 muškog spola) kojima je uzorak krvi uzet tijekom redovite kontrole u Zavodu za nefrologiju KBC-a Osijek. Genomska DNA izolirana je iz uzorka pune periferne krvi s antikoagulansom. Prije genotipizacije, uzorci su genomske DNA spektrofotometrijski analizirani u svrhu određivanja koncentracije i provjere čistoće uzorka DNA. Genotipizacija polimorfizma A6986G gena *CYP3A5* učinjena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*) analizom krivulje taljenja visoke rezolucije.

Rezultati: U skupini od 30 pacijenata s transplantiranim bubregom, 28 pacijenata (93,3 %) su homozigoti G/G, dok su 2 pacijenta (6,7 %) heterozigoti A/G. U objema skupinama ispitanika, i muškoj i ženskoj, najzastupljeniji je genotip G/G (93,75 %, odnosno 92,86 %).

Zaključak: Nema statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova i alelnih varijanti između skupina ispitanika muškog i ženskog spola. Između primatelja bubrega iz istočne Hrvatske i primatelja bubrega iz Srbije, Poljske i Nizozemske nema značajne razlike, dok je statistički značajna razlika vidljiva između primatelja bubrega iz istočne Hrvatske i primatelja bubrega iz Indije i Kine.

KLJUČNE RIJEČI: polimorfizam A6986G gena *CYP3A5*; takrolimus; transplantirani bubreg

8. SUMMARY

Frequency of the *CYP3A5* A6986G polymorphism in the kidney transplant recipients

Objectives: Genotyping of the *CYP3A5* A6986G polymorphism, determination of the frequency of the specified polymorphism in the group of renal transplant recipients and comparison of the frequency of genotypes and alleles of the *CYP3A5* A6986G polymorphism between the kidney transplant recipients in different populations.

Patients and Methods: Group of participants consists of 30 kidney transplant recipients of both sexes (14 females, 16 males). Blood samples were collected during their regular control at the Institute of Nephrology at Clinical Hospital Centre Osijek. Genomic DNA was isolated from full peripheral blood with anticoagulant EDTA. Before genotyping, genomic DNA samples were analysed spectrophotometrically for purposes of determining the concentration and purity checks of DNA sample. Genotyping of the *CYP3A5* A6986G polymorphism was performed by real-time PCR method by high resolution melting analysis method.

Results: In group of 30 kidney transplant recipients, 28 patients (93.3%) were homozygotes G/G, while 2 patients (6.7%) were heterozygotes A/G for the analysed polymorphism. In both groups of participants, both male and female, the most common genotype was G/G (93.75% or 92.86%).

Conclusion: There are no statistically significant differences in the distribution of genotypes and alleles between groups of male and female participants. There is no significant difference between kidney transplant recipients from Eastern Croatia and kidney transplant recipients from Serbia, Poland and Netherland, while statistically significant difference is found between kidney transplant recipients from Eastern Croatia and kidney transplant recipients from India and China.

KEY WORDS: *CYP3A5* A6986G polymorphism; tacrolimus; renal transplant

9. LITERATURA

1. Pinto N, Dolan ME. Clinically Relevant Genetic Variations in Drug Metabolizing Enzymes. Curr. Drug Metab. 2011;12:487-497.

2. Op den Buijsch R. Pharmacokinetics and pharmacogenomics of tacrolimus in renal transplant patients. Disertacija. Maastricht: 2007.

3. Vahed SZ, Ardalan M, Samadi N, Omidi Y. Pharmacogenetics and drug-induced nephrotoxicity in renal transplant recipients. Bioimpacts. 2015;5(1):45-54.

4. Rački S, Bašić-Jukić N, Kes P, Sabljar-Matovinović M, Ratković-Gusić I, Bušić M, i sur. Nacionalne smjernice za obradu i procjenu primatelja i darivatelja bubrega. 2. izd. Zagreb: Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske; 2014.

5. Trobonjača Z, Živčić-Ćosić S, Lisjak J. Imunobiologija presađivanja bubrega. Medicina Fluminensis. 2010;46(4):424-433.

6. Novak S, Silobrčić V. Imunologija i alergije. U: Ivančević Ž, urednik. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Split: Placebo d.o.o.; 2010. str. 1365-1370.

7. Zaza G, Granata S, Tomei P, Gassa AD, Lupo A. Personalization of the Immunosuppressive Treatment in Renal Transplant Recipients: The Great Challenge in „Omics“ Medicine. Int J Mol Sci. 2015;16:4281-4305.

8. Živčić-Ćosić S, Trobonjača Z, Rački S. Imunosupresivno liječenje kod presađivanja bubrega. Medicina Fluminensis. 2010;46(4):413-423.

9. Op den Buijsch RAM, Christiaans MHL, Stolk LML, de Vries JE, Cheung CY, Undre NA, i sur. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. Fundam Clin Pharmacol. 2007;21:427-435.

10. Elens L, Bouamar R, Shuker N, Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RHN. Clinical implementation of pharmacogenetics in kidney transplantation: calcineurin inhibitors in the starting blocks. Br J Clin Pharmacol. 2013;77(4):715-728.

11. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.

12. Shi Y, Li Y, Tang J, Zhang J, Zou Y, Cai B, i sur. Influence of CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and early renal dysfunction in liver transplant recipients. Elsevier. 2013;512:226-231.

13. Štraus B, Čvorišćec D, Čepelak I., Barišić K, Dodig S, Đurić K, i sur. Štrausova medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.

14. Tevfik Dorak M, Scott Adams P, Bustion SA, Cakilci B, Chinnery PF, Dheda K, i sur. Real-time PCR. Newcastle: Taylor & Francis Group; 2006.

15. Vavić N, Rančić N, Cikota-Aleksić B, Magić Z, Cimeša J, Obrenčević K, i sur. Distribucija polimorfizma gena koji kodiraju CYP3A5, CYP3A4 i P-glikoprotein kod bolesnika podvrgnutih transplantaciji bubrega. Vojnosanit Pregl. 2016;73(7):663-667.

16. Stefanović N, Cvetković T, Veličković-Radovanović R, Jevtović-Stoimenov T, Stojanović D, Živković N. Significance of CYP3A5 gene polymorphism in Serbian renal transplant patients. Acta Medica Medianae. 2013;52(1):33-38.

17. Zochowska D, Wyzgal J, Paczek L. Impact of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. Ann Transplant. 2012;17(3):36-44.

18. Moes DJAR, Swen JJ, den Hartigh J, van der Straaten T, Homan van der Heide JJ, Sanders JS, i sur. Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A Combined Genotypes on Cyclosporine, Everolimus, and Tacrolimus Pharmacokinetics in Renal Transplantation. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. 2014;3:1-12.

19. Ashavaid TF, Raje HS, Shah BV, Shah SA. Design of Allele Specific PCR for Rapid Detection of CYP3A5 (A6986G) and Mdr-1 (C3435T) Polymorphisms. Ind J Clin Biochem. 2011;26(1):18-21.

20. Cheung CY, Op den Buijsch RAM, Wong KM, Chan HW, Chau KF, Li CS, i sur. Influence of different allelic variants of the CYP3A and ABCB1 genes on the tacrolimus pharmacokinetic profile of Chinese renal transplant recipients. Pharmacogenomics. 2006;7(4):563-574.

10. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Ivana Domazet

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 20. 2. 1996., München, Njemačka

ADRESA: Petra Zoranića 17, Tenja 31207

KONTAKT: ivana.brina@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2014. – 2017.: Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

2010. – 2014.: I. gimnazija, Osijek

2002. – 2010.: Osnovna škola Tenja, Tenja