Farmakogenetičko testiranje CYP3A5 u optimizaciji početne doze takrolimusa kod primatelja bubrežnog presatka

Bilić-Pavlinović, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:925354

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Matea Bilić-Pavlinović

FARMAKOGENETIČKO TESTIRANJE *CYP3A5* U OPTIMIZACIJI POČETNE DOZE TAKROLIMUSA KOD PRIMATELJA BUBREŽNOG PRESATKA

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Matea Bilić-Pavlinović

FARMAKOGENETIČKO TESTIRANJE *CYP3A5* U OPTIMIZACIJI POČETNE DOZE TAKROLIMUSA KOD PRIMATELJA BUBREŽNOG PRESATKA

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je osmišljen kao teorijska tema koja daje uvid u mogućnost primjene rezultata određivanja polimorfizma *CYP3A5* s ciljem prilagodbe doze imunosupresiva takrolimusa u transplantaciji bubrega.

Mentor rada: doc. dr. sc. Saška Marczi

Rad ima 21 list, 2 tablice i 1 sliku.

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Saški Marczi, na uloženom trudu i pomoći u izradi rada.

Zahvaljujem obitelji na podršci tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD *1*

1.1. Pojam farmakogenetike i farmakogenomike 1

1.2. Odnos genotipa i metaboličkog fenotipa 1

1.3. Metabolizam lijekova 2

1.4. Primjena farmakogenomike u personaliziranoj medicini 4

1.5. Molekularne dijagnostičke metode u farmakogenomici 6

2. TRANSPLANTACIJA BUBREGA *8*

2.1. Farmakoterapija bolesnika s presađenim bubregom 9

2.2. Farmakogenomika u transplantaciji bubrega 10

3. TAKROLIMUS *11*

3.1. Mehanizam djelovanja takrolimusa 11

3.2. Metabolizam takrolimusa 12

4. GEN CYP3A5 ..... *13*

4.1. Utjecaj polimorfizma *CYP3A5*3* na farmakokinetiku takrolimusa 14

5. ZNAČAJ FARMAKOGENETIČKOG TESTIRANJA CYP3A5 KOD PRIMATELJA BUBREŽNOG PRESATKA *16*

6. SAŽETAK *17*

7. SUMMARY *18*

8. LITERATURA *19*

9. ŽIVOTOPIS *21*

KRATICE

ABC	superporodica membranskih transportnih proteina (engl. *ATP-binding cassette*)
ABO	sustav krvnih grupa
CPIC	Klinički konzorcij za implementaciju farmakogenomike (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementaton Consortium*)
CPNDS	Kanadska farmakogenomička mreža za sigurnu primjenu lijekova (engl. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*)
CYP	skupina enzima citokrom P450
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DPWG	Nizozemska farmakogenetička radna skupina (engl. *Dutch Phamacogenetic Working Group*)
DPYD	dipirimidin dehidrogenaza
EM	fenotip normalnog brzog metabolizma (engl. *extensive metabolizer*)
FK506	takrolimus
FKBP	FK vežući protein (engl. *FK binding protein*)
GVHD	reakcija presatka protiv primatelja (engl. *graft-versus-host disease*)
HIV	virus humane imunodeficijencije
HLA	sustav glavnih antigena tkivne snošljivosti u ljudi (engl. *human leukocyte antigen*)
IFNγ	interferon gama
IL-2	interleukin 2
IL-4	interleukin 4
IM	fenotip srednje brzog metabolizma (engl. *intermediate metabolizer*)
mTOR	engl. *mammalian target of rapamycin*
MALDI-TOF	engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*
NF-AT	nuklearni čimbenik aktiviranih T-stanica (engl. *nuclear factor of activated T-cells*)
OX	ksantin oksidaza
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
PM	fenotip sporog metabolizma (engl. *poor metabolizer*)
RFLP	engl. *restriction fragment length polymorphism*

SLC	superporodica transportnih proteina (engl. *colute carrier*)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)
TBZ	terminalni stadij kroničnog bubrežnog zatajenja
TDM	terapijsko praćenje lijeka (engl. *therapeutic drug monitoring*)
TNF-α	čimbenik nekroze tumora alfa
TPMT	tiopurin-metiltransferaza
UEM	fenotip izrazito brzog metabolizma (engl. *ultraextensive metabolizer*)

1. UVOD

1.1. Pojam farmakogenetike i farmakogenomike

Farmakogenetika i farmakogenomika znanstvene su discipline koje proučavaju interindividualne genetičke varijacije uslijed kojih se javljaju razlike u učinku terapije lijekovima. Farmakogenetika najčešće ispituje jednu ili nekoliko genskih inačica koje utječu na odgovor pojedinca na lijek, dok farmakogenomika procjenjuje međudjelovanje više gena ili cjelokupnog genoma na učinak lijeka te na interakcije među lijekovima kod primjene politerapije (1). Farmakogenomika se bavi proučavanjem veze između genske predispozicije pojedinca i njegove sposobnosti metaboliziranja nekog lijeka ili stranog spoja te pomaže razumijevanju zašto neki bolesnici odgovaraju ili ne odgovaraju na pojedine lijekove. Neki bolesnici trebaju više, a neki niže doze za postizanje optimalnog terapijskog odgovora. Kod određenog broja bolesnika izostaje odgovor na terapiju, dok će neki imati toksične nuspojave (2). Interindividualna varijabilnost u odgovoru na farmakoterapiju jedan je od vodećih problema u kliničkoj praksi jer može uzrokovati neuspjeh terapije ili nuspojave kod pojedinaca ili određene skupine bolesnika. Svrha primjene farmakogenetike/farmakogenomike u kliničkoj je praksi postizanje željenog povoljnog učinka lijeka uz najmanje moguće nuspojave (3).

1.2. Odnos genotipa i metaboličkog fenotipa

Farmakogenomika povezuje višegenski uvjetovan učinak lijeka s farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima njegovog djelovanja (3). Varijabilnost individualnog odgovora na lijek posljedica je genskih polimorfizama koji mogu utjecati na farmakokinetske parametre posredovane metaboličkim enzimima i transportnim proteinima (apsorpcija, dispozicija, metabolizam, izlučivanje), kao i na farmakodinamiku lijeka određenu ciljnim molekulama.

Genske varijabilnosti metaboličkih enzima koji sudjeluju u biotransformaciji lijekova prepoznate su kao glavni izvor farmakokinetskih varijabilnosti. Pronalazak genskih biljega koji sudjeluju u odgovoru na farmakoterapiju te poznavanje odnosa između genotipa i metaboličkog fenotipa važni su za procjenu djelotvornosti i sigurnosti lijeka (4).

Na temelju svojstava biotransformacije lijeka jedna ili više genskih promjena, polimorfizama, povezuje se s nekoliko kategorija metaboličkih fenotipova (2).

Fenotip normalnog ili brzog metabolizma (engl. *extensive metabolizer*, EM) predstavlja fiziološki normalnu biotransformaciju lijeka i pokazuje očekivani učinak kod primjene prosječnih doza lijeka. Brzi metabolizatori imaju dva potpuno aktivna alela. Očekivano je da će najveći dio populacije biti EM.

Fenotip sporog ili slabog metabolizma (engl. *poor metabolizer*, PM) zbog smanjene ili nepostojeće aktivnosti enzima rezultira nagomilavanjem lijeka-supstrata u organizmu. Fenotip sporog metabolizatora jest autosomno recesivno svojstvo kod kojeg su mutacije prisutne na obama alelima. Spori metabolizatori pri prosječnim dozama lijeka mogu imati nuspojave zbog njegove povećane koncentracije u organizmu, a ako spori metabolizator prima prolijek, terapijski odgovor može izostati zbog smanjene koncentracije aktivnog metabolita.

Fenotip srednje brzog metabolizma (engl. *intermediate metabolizer*, IM) može iskusiti nuspojave u nešto manjem obimu u odnosu na spore metabolizatore. IM mogu biti homozigoti za oba alela reducirane aktivnosti ili heterozigoti s jednim aktivnim i jednim inaktivnim alelom.

Fenotip izrazito brzog metabolizma (engl. *ultraextensive metabolizer*, UEM) autosomno je dominantno svojstvo koje rezultira ubrzanom razgradnjom lijeka. Kod osoba koje su UEM, pri primjeni prosječnih doza može izostati učinkovitost lijeka zbog toga što nije postignuta terapijska koncentracija, a u slučaju primjene prolijeka može doći do razvoja nuspojava zbog nastajanja viših koncentracija aktivnog metabolita. Osobe UEM fenotipa imaju dvije kopije gena povećane aktivnosti ili više od dvije kopije aktivnog odgovornog gena uslijed njegove amplifikacije (2, 3).

1.3. Metabolizam lijekova

Biotransformacija velikog broja endogenih i egzogenih spojeva, uključujući i lijekove, složeni je proces kojim ih organizam prevodi u spojeve veće topivosti u vodi, zbog čega se lakše izlučuju. U nekim slučajevima uključen je u aktivaciju prolijekova u aktivne spojeve ili u pretvorbu lijekova u toksične metabolite. Većina lijekova relativno je topiva u lipidima, što im omogućava apsorpciju kroz membrane te je smanjenje njihove topivosti u lipidima također jedan od procesa olakšavanja njihove eliminacije.

Metaboličke reakcije dijele se na reakcije I. i II. faze. Reakcije I. faze uključuju oksidaciju uglavnom pomoću skupine enzima citokroma P450 (oksidaze mješovite funkcije), redukciju,

delaminaciju i hidrolizu. Oni nisu visokoselektivni za supstrate te relativno mali broj izoformi P450 enzima može metabolizirati na tisuće lijekova. Sustav P450 uključen u I. fazu metabolizma lijekova obuhvaća enzime CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1. Oko 75 % lijekova koji se metaboliziraju putem I. faze biotransformacije metabolizirano je izoformama CYP3A4/5 ili CYP2D6. Enzimi CYP3A4 i CYP3A5 odgovorni su za biotransformaciju približno 50 % lijekova (4). Fiziološki supstrati te superobitelji enzima uključuju steroide, masne kiseline, prostaglandine, leukotriene i biogene amine, a ksenobiotici uključuju lijekove, biljne toksine i toksine iz okoliša. Citokromi uglavnom kataliziraju reakcije oksidacije, gdje djeluju kao monooksigenaze, oksidaze i peroksidaze, ali mogu sudjelovati i u redukcijskim reakcijama. Iako se enzimi sustava citokroma P450 mogu pronaći u gotovo svim tkivima i organima, najveće koncentracije enzima uključenih u biotransformaciju nalaze se u membranama endoplazmatskog retikuluma stanica jetre (5). Uključeni su u procese sinteze i razgradnje hormona, sintezu vitamina D, sintezu kolesterola i metabolizam potencijalno toksičnih spojeva (6).

Jetreni P450 enzimi svrstani su unutar triju glavnih genskih obitelji, koje čine *CYP1, CYP2* i *CYP3*, a u jetri postoji i *CYP4* genska obitelj čiji su supstrati neke masne kiseline, eikosanoidi i manji broj ksenobiotika (5). Individualni enzimi kategorizirani su prema sličnostima u slijedu aminokiselina. Svaki je enzim imenovan prema broju obitelji, slovu podobitelji i individualnom broju enzima te zvjezdicom (*) i brojem za svaku alelnu varijantu (6). Količina i aktivnost enzima pokazuje interindividualnu varijabilnost zbog genetičkih i vanjskih čimbenika. Smanjena aktivnost enzima može biti posljedicom genske mutacije koja blokira sintezu enzima ili genske mutacije koja uzrokuje sintezu katalitički slabije aktivnog ili inaktivnog enzima, zatim izlaganje vanjskim čimbenicima kao što su infektivne bolesti ili ksenobiotici koji suprimiraju ekspresiju ili aktivnost citokroma. Inhibitorno djelovanje jednog lijeka na citokrom P450 može poremetiti biotransformaciju drugog lijeka, što posljedično može voditi ka povećanom farmakološkom ili toksičnom djelovanju drugog lijeka. U tom slučaju inhibicija citokroma P450 ima isti učinak kao i genetički uzrokovana insuficijentna ekspresija citokroma P450. Induciranjem enzima citokroma P450 jedan lijek može stimulirati metabolizam drugog i tako smanjiti ili povećati njegov terapijski učinak.

Alelne varijante koje su posljedica mutacija u divljem genu drugi su izvor interindividualnih varijabilnosti P450 enzima. Supstitucije aminokiselina mogu povećati ili smanjiti enzimsku aktivnost, dok vanjski čimbenici poput nekih lijekova, hrane, društvenih navika i bolesti mogu utjecati na količinu enzima citokroma P450 (5).

Podobitelj CYP3A posebno je važna jer se preko tih enzima odvija metabolizam većine lijekova. Identificirana su četiri različita CYP3A izoenzima: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 i CYP3A43. Kod odraslih osoba, izoenzim CYP3A4 nalazi se u jetri i crijevima, dok se CYP3A5 nalazi i u prostati i bubrezima. CYP3A7 predominantan je kod novorođenčadi, ali se njegova ekspresija nakon rođenja smanjuje te je njegova uloga u metabolizmu lijekova kod odraslih zanemariva (6). 85 % sekvence gena jednako je genima *CYP3A4* i *CYP3A5*, tako da im se interakcije koje uključuju supstrate, inhibiciju i indukciju u velikoj mjeri preklapaju. Većina spojeva koji su supstrati za enzim CYP3A4 također su i metabolizirani enzimom CYP3A5, obično s većom katalitičkom učinkovitošću (7).

Reakcije II. faze biotransformacije sintetske su reakcije adicije (konjugacije) glukuronatne, acetatne, glutation, glicin, sulfatne i metilne skupine na -OH, -NH2 i -SH funkcionalne skupine lijeka. Produkti reakcija konjugacije polarni su te su manje topivi u lipidima. Enzimi II. faze jesu UDP glukuronoziltransferaza, tiopurin S-metiltransferaza (TPMT), N-acetiltransferaza i dipirimidin dehidrogenaza (DPYD) (4).

Uz metaboličke enzime I. i II. faze , važnu ulogu u moduliranju bioraspoloživosti te učinkovitosti lijeka čine transportni proteini koji se još nazivaju III. fazom biotransformacije. Polimorfizmi gena transportnih proteina utječu na regulaciju apsorpcije, raspodjele i izlučivanja raznih lijekova, posebice lijekova koji su supstrati transportnih proteina iz superobitelji ABC i SLC (3).

1.4. Primjena farmakogenomike u personaliziranoj medicini

Ciljevi koncepta personalizirane medicine jesu prevencija, što ranije otkrivanje bolesti i primjena odgovarajuće farmakoterapije prilagođene pojedincu. Identifikacija genskih polimorfizama može pomoći u predviđanju individualnog odgovora pojedinca na primijenjeni lijek (3).

S ciljem primjene farmakogenomike u personaliziranoj medicini osnovane su brojne stručne organizacije kao što su Klinički konzorcij za implementaciju farmakogenomike (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementaton Consortium*, CPIC), Nizozemska farmakogenetička radna skupina (engl. *Dutch Phamacogenetic Working Group*, DPWG), Kanadska farmakogenomička mreža za sigurnu primjenu lijekova (engl. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*, CPNDS) i dr. Konzorcij CPIC osnovan je u suradnji s opsežnom internetskom bazom podataka o genskim varijacijama i njihovom utjecaju na terapijski odgovor te internetskom mrežom farmakogenomskih istraživanja.

Do danas je tako CPIC autorizirao smjernice za 47 kombinacija gena i lijekova za koje se preporučuje farmakogenetsko testiranje (https://cpicpgx.org/guidelines/), DPWG za 93 para gen-lijek, CPDS za 8 parova gen-lijek. Sve se te smjernice za doziranje lijekova utemeljene su na rezultatima znanstvenih istraživanja, recenzirane su i određena im je kategorija razine značajnosti farmakogenetičkog testiranja te kategorija kliničke razine dokaza.

Navedene kategorije proizlaze iz jasnih kriterija koji obuhvaćaju usporedbu kvalitete provedenih znanstvenih studija (2, 8).

Prema CPIC-u utemeljene su četiri kategorije preporuka: A, B, C, D (Tablica 1).

Tablica 1. Kategorije preporuka prema CPIC-u (2).

Kategorija	Dokazi	Preporuke
A	snažni ili umjereni dokazi	genetske informacije o odnosu gen-lijek dobivene farmakogenetičkim testiranjem, treba koristiti za prilagodbu doziranja lijeka (alternativna doza ili lijek)
B	slabiji i proturječni dokazi	genetske informacije o odnosu gen-lijek mogu se koristiti za prilagodbu doziranja lijeka
C	nema dovoljno dokaza	nema dovoljno dokaza za farmakogenetičko testiranje i ne postoje preporuke za promjene u propisivanju lijeka
D	nema dovoljno dokaza	

PharmGKB razine dokaza gen-lijek svrstava u šest kategorija: 1A, 1B, 2A, 2B, 3, 4 (Tablica 2.).

Tablica 2. Razine dokaza gen-lijek prema PharmGKB-u (2).

Razina dokaza	Preporuke
1A	Prije početka terapije tražiti genetičko testiranje. Nakon dobivenih rezultata postupiti prema smjernicama relevantnih izvora (PGx ili CPIC).
1B	Preporučuje se tražiti genetičko testiranje jer postoje dokazi najmanje jedne kohortne studije sa statistički relevantnom značajnosti. Preporuka se može koristiti za sve ili samo određenu podskupinu bolesnika, a klinička korist testiranja je vjerojatna.
2A	Genetičko testiranje ne smatra se nužnim, ali informacija dobivena testiranjem može biti značajna za učinkovitost liječenja, doziranje ili toksičnost kod svih ili kod skupine bolesnika.
2B	Polimorfan gen/protein uključen je u metabolizam ili farmakodinamiku lijeka, no postoji mogućnost utjecaju na terapijski odgovor.
3	Nema dostupnih dostatnih informacija za preporuku o farmakogenetskom testiranju.
4	

1.5. Molekularne dijagnostičke metode u farmakogenomici

Za identifikaciju farmakogenetičkih polimorfizama koriste se metode molekularne biologije. Odabir molekularne metode ovisi o cilju i željenoj razini razlučivanja rezultata. Za identifikaciju alelnih varijanti polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) najčešće se koristi metoda lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), odnosno jedna od varijanti PCR-a – PCR u stvarnom vremenu (engl. *real-time* PCR). Moguća je i primjena standardnog PCR-a uz naknadno uočavanje polimorfizama npr. pomoću gel elektroforeze i cijepanja DNA restrikcijskim enzimima (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) ili pomoću metode hibridizacije. Skeniranje gena i određivanje polimorfnih mjesta moguće je pomoću MALDI-TOF spektrometrije te DNA čip tehnologije

(engl. *microarray*), a u primjeni je i sekvenciranje pojedinih egzona ili cijelog gena koji je u središtu promatranja.

Farmakogenetičko testiranje velikih panela gena tehnologijom mikročipova ili sekvenciranja zasad je znatno skuplje u odnosu na testiranje pojedinačnih ciljanih gena, no zahvaljujući razvoju tehnologije i stalnom padu cijena velikih platformi sve je izglednija njihova široka primjena u budućnosti. Zasad, zbog ekonomičnosti molekularna se analiza farmakogenetičkih polimorfizama u kliničkoj praksi provodi većinom za određene gene ili manje panele gena, i to za alelne varijante koje su u određenoj populaciji najučestalije (2).

2. TRANSPLANTACIJA BUBREGA

Metode liječenja završnog stadija oštećenja bubrega obuhvaćaju peritonejsku dijalizu, hemodijalizu i transplantaciju bubrega. Transplantacija omogućuje najbolju fizičku i psihičku rehabilitaciju te smanjuje rizik od smrti u odnosu na bolesnike koji se liječe dijalizom. Primatelji bubrežnog presatka neovisni su o dijalizi, imaju slobodu kretanja i mogu se baviti fizičkom aktivnošću te postoji mogućnost povratka na radno mjesto (9).

Transplantacija bubrega postupak je kojim se bubreg darivatelja smješta u donji dio trbušne šupljine primatelja tako da se bubrežna arterija i bubrežna vena spajaju na primateljevu veliku zdjeličnu arteriju i venu. Mokraćovod transplantata spaja se na mokraćni mjehur primatelja (10). Tretman je izbora kod bolesnika s terminalnim stadijem kroničnog bubrežnog zatajenja (TBZ). TBZ najčešće nastaje kao posljedica arterijske hipertenzije ili šećerne bolesti, a ostali su uzroci kronični glomerulonefritis, policistična bolest bubrega i kronični pijelonefritis (10, 11).

Mogući primatelji kandidati za presađivanje moraju dobiti sve potrebne informacije o samoj metodi, a svoju odluku o prihvaćanju ili neprihvaćanju izražavaju putem obrasca o informiranom pristanku. Ako bolesnik odluči prihvatiti presađivanje, obavlja se detaljna obrada i procjena s ciljem prijave na listu čekanja. Bolesnicima koji boluju od teških kardiovaskularnih bolesti preporučuje se nastavak liječenja dijalizom. Kontraindikacije presađivanju predstavljaju: proširena maligna bolest, aktivna infektivna bolest te bilo koja bolest s očekivanim trajanjem života manjim od dvije godine. U relativne kontraindikacije ubrajaju se infekcija, HIV pozitivnost, aktivni hepatitis, aktivna ulkusna bolest, periferna okluzivna arterijska bolest, aktivno konzumiranje opojnih tvari, slabo kontrolirana psihoza i dokazana nesuradljivost bolesnika (9). Kandidati su najčešće bolesnici koji su zbog zatajenja bubrega na dijalizi. Kod bolesnika koji imaju živog darivatelja dobro je transplantaciju planirati prije nego se započne s dijalizom (10). Darivatelj može biti umrla ili živa osoba. Živi darivatelji najčešće su članovi obitelji bolesnika koji mogu biti krvno srodni ili nesrodni. Darivatelji mogu biti i nesrodne osobe, ali je važno da imaju dobru podudarnost tkiva s primateljem. Postoji i mogućnost primanja bubrega preminulog darivatelja, ali bubrezi živog darivatelja funkcioniraju bolje i duže (9, 10).

Ako je tkivo bubrežnog presatka nepodudarno tkivu primatelja, pokrenut će se imunosna reakcija odbacivanja presatka koja je posredovana nizom tkivnih antigena, među kojima najveći utjecaj imaju antigeni sustava ABO i HLA. Strategija koja se u kliničkoj praksi koristi za prevenciju odbacivanja bubrežnog presatka i poboljšanje vjerojatnosti dobrog ishoda presađivanja uključuje imunološku obradu primatelja i darivatelja bubrega. Imunološka obrada prije transplantacije obuhvaća određivanje krvne grupe i HLA tipizaciju primatelja i darivatelja bubrega, test autokrižne reakcije i redoviti probir antitijela HLA primatelja bubrega. Neposredno prije presađivanja provodi se test križne reakcije te nakon presađivanja bubrega probir antitijela HLA (9).

2.1. Farmakoterapija bolesnika s presađenim bubregom

Pacijentima koji se podvrgavaju transplantaciji solidnih organa potrebna je doživotna imunosupresija kako bi se spriječilo odbacivanje presatka (12). Imunosupresivi su lijekovi čija je svrha supresija imunoloških mehanizama, a koriste se u slučajevima reakcija preosjetljivosti, autoimunih bolesti te reakcija odbacivanja transplantiranog tkiva, tj. organa. Imunosupresivne tvari čine različite grupe lijekova kao što su kortikosteroidi, antimetabolički antineoplastični lijekovi te lijekovi koji djeluju selektivnije na ciljane stanice imunološkog sustava. Rezultat djelovanja imunosupresivnih lijekova uklanjanje je T-limfocita, kočenje funkcije T-limfocita ili inhibicija njihovih signalnih puteva (4).

Osim imunosupresiva, primateljima bubrežnog presatka često su potrebni i dodatni lijekovi koji pomažu boljem ishodu transplantacije: stimulatori eritropoeze, anti-virusni lijekovi, antidijabetici, antikoagulansi.

S imunosupresivnom terapijom započinje se u trenutku transplantacije. Najčešće primjenjivani imunosupresivi u transplantaciji solidnih organa obuhvaćaju inhibitore kalcineurina (ciklosporin, takrolimus), mTOR inhibitore, antimetabolite, antilimfocitna antitijela, protuupalne lijekove (12).

Postoji nekoliko skupina imunosupresivnih lijekova. Prvu skupinu čine kortikosteroidi, a u imunosupresiji koristi se podskupina glukokortikoida koji na biokemijskoj razini djeluju na gensku ekspresiju smanjujući sintezu prostaglandina, leukotriena, citokina i drugih signalnih molekula koje sudjeluju u imunološkom odgovoru. Inhibitori kalcineurina i mTOR-a (engl. *mammalian target of rapamycin*) skupina su imunosupresiva koja interferira s T-staničnom

funkcijom vežući se na imunofiline. U tu skupinu ubrajaju se ciklosporin, takrolimus i sirolimus. Iduća je skupina imunosupresiva mikofenolat mofetil, lijek koji se brzo pretvara u mikofenolnu kiselinu koja inhibira inozin monofosfat dehidrogenazu. Među imunosupresive ubraja se i talidomid, sedativni lijek koji ima kompleksan učinak na imunološki sustav, ali je poznat i po svom teratogenom učinku (4).

2.2. Farmakogenomika u transplantaciji bubrega

Lijekovi koje primatelji presatka primaju nakon transplantacije imaju uski terapijski raspon s interindividualnom varijabilnošću koja se djelomično može objasniti genetskim odrednicama. Za neke od lijekova koji se primjenjuju u posttransplantacijskom režimu propisane su farmakogenetičke smjernice, a one koje se temelje na najvišoj razini dokaza i ubrajaju se u najvišu kategoriju preporuke odnose se na azotioprin, vorikonazol i takrolimus.

Azotioprin je antimetabolit za dugotrajno održavanje imunosupresivne terapije. Radi se o prolijeku koji se metabolizira u merkaptopurin koji zatim podliježe metilaciji do inaktivnih metabolita uz pomoć polimorfne tiopurin-metiltransferaze (TPMT) (11). Enzimi važni u metabolizmu azatioprina jesu TPMT i ksantin oksidaza (OX) te se prilikom njihove smanjene aktivnosti stvaraju toksični metaboliti. Lijek se nalazi u 1. kategoriji preporuka CPIC-a te u 1A razini dokaza PharmGKB-a (14). Na aktivnost tiopurin-metiltransferaze utječe polimorfizam gena *TPMT*. Preporuke za doziranje dostupne su kako bi se ublažili potencijalni toksični učinci.

Vorikonazol je triazolni antifugalni lijek koji je namijenjen primateljima bubrežnog presatka i kod invazivnih gljivičnih infekcija (11). Lijek djeluje na sintezu ergosterola koji je bitna sastavnica stanične membrane gljiva. Vorikonazol ima široku interindividualnu varijabilnost i uski terapijski raspon te je potrebno terapijsko praćenje lijeka (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM) zbog potencijalnih neželjenih učinaka na živčani sustav i hepatotoksičnost (15). Za metabolizam vorikonazola predominantno je odgovoran enzim CYP2C19 čiji metabolički fenotip ovisi o *CYP2C9* genotipu (11). Lijek se nalazi u 1. kategoriji dokaza prema CPIC-u i u 1A razini dokaza PharmGKB-a (14).

3. TAKROLIMUS

Takrolimus je djelotvorna terapija u prevenciji od odbacivanja presatka organa. Kao standardna terapija u profilaksi reakcije presatka protiv primatelja (engl. *graft-versus-host disease*, GVHD) takrolimus se kombinira s metotreksatom ili mikofenolat mofetilom. Može se primijeniti oralno ili intravenski, a poluvrijeme eliminacije takrolimusa nakon intravenske primjene iznosi 9 – 12 sati. Dnevni režim doziranja takrolimusa ovisi o tome je li formulacija s trenutnim ili produljenim oslobađanjem (4).

Kliničku uporabu takrolimusa odlikuje njegov uski terapijski raspon, što znači da nedovoljna koncentracija takrolimusa može dovesti do povećanog rizika od odbacivanja presatka, dok je prekomjerno doziranje povezano s neželjenim toksičnim učincima (11). Neželjeni toksični učinci takrolimusa jesu nefrotoksičnost, neurotoksičnost, hiperglikemija, hipertenzija, hiperkalijemija i gastrointestinalni poremećaji (4). Zato se vrši rutinsko terapijsko praćenje lijeka te se po potrebi doza prilagođava. Ograničenje takvog pristupa nemogućnost je optimizacije početne doze lijeka (16).

3.1. Mehanizam djelovanja takrolimusa

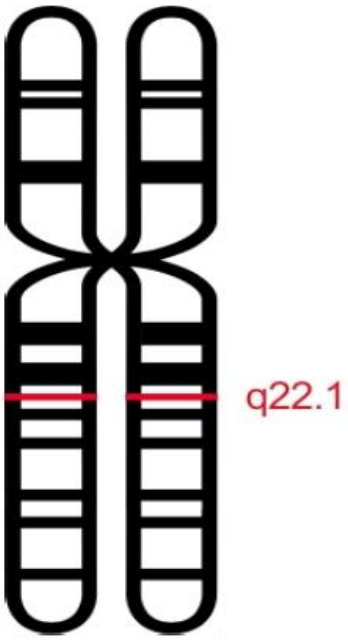
Takrolimus (FK506) je imunosupresivni makrolidni antibiotik koji produciraju *Streptomyces tsukubaensis*. Kemijski nije srodan ciklosporinima, ali ima vrlo sličan mehanizam djelovanja. Oba lijeka vežu se za citoplazmatske peptidil-prolil izomeraze. Mehanizam djelovanja inhibitora kalcineurina jest inhibicija prijenosa signala unutar stanice, što posljedično smanjuje proizvodnju citokina i aktivaciju T-limfocita. Takrolimus se veže za citoplazmatski receptor FK-vežući protein (engl. *FK-binding protein*, FKBP) koji se ubraja u skupinu imunofilina. Kompleks takrolimus-FKBP veže se na kalcineurin te time inhibira kalcineurinsku fosfataznu aktivnost. Rezultat je nemogućnost defosforilacije transkripcijskog čimbenika NF-AT (engl. *nuclear factor of activated T cells*) specifičnog za T-limfocite, čime se onemogućava njegov ulazak u jezgru (4). Tako takrolimus inhibira ekspresiju nekoliko gena za citokine ključne u aktivaciji T-limfocita uključujući interleukin-2 (IL-2) interleukin-4 (IL-4), interferon gamma (IFNγ) i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF-α) (17).

3.2. Metabolizam takrolimusa

Takrolimus se apsorbira iz distalnih dijelova gastrointestinalnog trakta s visokom varijabilnošću bioraspoloživosti u rasponu od 5 – 93 %. Velik broj čimbenika modificira njegovu bioraspoloživost, primjerice visok udio masti u prehrani i dijabetes reduciraju apsorpciju lijeka. Intestinalni enzimi također utječu na apsorpciju, a radi se pretežito o CYP3A enzimima preko kojih se već u tankom crijevu lijek metabolizira prije nego dospije u cirkulaciju. P-glikoprotein prisutan u membrani stanica stijenke crijeva aktivno pumpa lijek iz intracelularnog prostora stanica mukoze natrag u crijevni lumen. Lijek odlikuje mali volumen raspodjele (Vd = 1 – 1,5 L/kg) jer se ekstenzivno (99 %) veže za eritrocite i proteine krvne plazme (6). U stanicama jetre i tankog crijeva dolazi do demetilacije i hidroksilacije takrolimusa pomoću enzima CYP3A5 i CYP3A4. Takrolimus podliježe oksidativnom metabolizmu prvenstveno putem CYP3A5 enzima, manje preko CYP3A4, koji ga prevodi u AM9 inaktivni metabolit (18).

4. GEN *CYP3A5*

Gen *CYP3A5* smješten je na dugom kraku 7. kromosoma, na 22. lokusu (chr7 : q22.1 - q22.1) (19). Gen ima 13 egzona koji kodiraju 502 aminokiseline (20). Točkasta mutacija, supstitucija adenina gvaninom u egzonu 3 na položaju 6986 (6986A>G, rs776746), polimorfizam je koji se označava *CYP3A5*3,* a posljedica mutacije stvaranje je krnjeg proteina bez enzimske aktivnosti (2).



Slika 1. Položaj gena *CYP3A5* na kromosomu. Sliku izradila autorica.

Osim navedene dvije alelne varijante, poznato ih je još 7, ukupno 9. Alelne varijante *6 i *7, isto kao i *3, nemaju funkciju, dok za preostale varijante još uvijek nema mnogo podataka.

Odsutnost funkcionalnog CYP3A5 enzima prisutna je u mnogim populacijama. Kod bjelačke populacije 80 – 85 % populacije su homozigoti za alelnu varijantu *CYP3A5*3* (16). Frekvencije alelnih varijanti gena *CYP3A5* proučavane su u brojnim etničkim skupinama. Tako je učestalost funkcionalnog alela *CYP3A5*1* najveća u populacijama Afrikanaca (47 %), zatim Azijaca (22 – 28 %) te Europljana (8 – 11 %) (21).

Adler G. i suradnici proveli su istraživanje frekvencije varijanti *CYP3A5* gena na populaciji srednje i južne Europe. U istraživanju je sudjelovalo 469 zdravih odraslih osoba, a osobe su po etničkoj pripadnosti bili Bjelorusi, Bošnjaci i Poljaci, od kojih je bilo 241 žena i 228 muškaraca prosječne dobi 50,6 godina. Dobivena frekvencija za *CYP3A5*3* alelnu varijantu kod Bjelorusa iznosila je 98,44 %, kod Bošnjaka 97,89 % i kod Poljaka 94,56 %. Frekvencija *CYP3A5*1* varijante alela kod Bjelorusa iznosila je 1,56 %, kod Bošnjaka 2,11 % i kod Poljaka 5,44 % (22).

4.1. Utjecaj polimorfizma *CYP3A5*3* na farmakokinetiku takrolimusa

Učinak alelnih varijanti *CYP3A5*1* i *CYP3A5*3* na farmakokinetiku takrolimusa doveo je do velikog interesa za primjenu genotipizacije *CYP3A5* u svrhu optimizacije doziranja takrolimusa (6).

Divlji tip, alel *CYP3A5*1* povezan je s boljom produkcijom funkcionalnog CYP3A5 enzima i njegovom većom metaboličkom aktivnošću (2).

Tri su moguće kombinacije alelnih varijanti *1 i *3 u genotipu *CYP3A5* svakoga od nas, *CYP3A5*1/*1*, *CYP3A5*1/*3* i CYP3A5*3/*3. Genotip *CYP3A5*3/*3* ne daje funkcionalni enzimski produkt, on je neekspresor, odnosno predstavlja fenotip sporog metabolizma (PM). Genotip *CYP3A5*1/*3* je ekspresor i daje fenotip intermedijarnog metabolizma (IM). Genotip *CYP3A5*1/*1* također je ekspresor i daje fenotip brzog metabolizma (EM). Genotip *CYP3A5*1/*1* ima znatno bolji klirens takrolimusa u odnosu na *CYP3A5*1/*3* genotip, dok genotip *CYP3A5*3/*3* ima 48 % niži klirens pri oralnoj primjeni lijeka u odnosu na CYP3A5 ekspresore (6).

Frekvencija brzih metabolizatora, odnosno genotipa *CYP3A5*1/*1* razlikuje se među etničkim skupinama. U afro-američkoj populaciji najčešći je brzi metabolički fenotip s udjelom 45 – 80 %, dok je najslabije zastupljen u bjelačkoj populaciji s frekvencijom od samo 5 – 30 %.

Čini se da je zadržavanje ekspresije *CYP3A5* pod pritiskom evolucijske selekcije u populacijama koje su blizu ekvatora, a da do gubitka ekspresije dolazi s migracijama dalje od ekvatora. Smatra se da je taj proces vjerojatno vezan za zadržavanje natrija u organizmu u toplim klimatskim uvjetima (23).

Skupini ekspresora pripada 10 % bjelačke populacije, što znači da su oni nositelji alela *CYP3A5*1*. Kod takvih pacijenata potrebne su više doze takrolimusa u odnosu na skupinu neekspresora koji su nositelji alela *CYP3A5*3*. Homozigotni nositelji *CYP3A5*1/*1* klasificiraju se kao brzometabolizirajući fenotip (EM), a heterozigotni *CYP3A5*1/*3* kao intermedijarni metabolizatori (IM), te su takvim pacijentima potrebne više početne doze takrolimusa u odnosu na fenotip sporog metabolizatora *CYP3A5*3/*3* koji trebaju standardnu preporučenu dozu. Terapijski je potrebno pratiti koncentracije takrolimusa za daljnju prilagodbu doze. Prema smjernicama CPIC-a, s ocjenom najviše kliničke evidencijske razine (A) i stupnja PharmGKB dokaza (1A) primatelje bubrežnog presatka na imunosupresivnom liječenju takrolimusom potrebno je farmakogenetski testirati na točkastu mutaciju *CYP3A5**3 prije početka terapije (2). Smjernice preporučuju modifikaciju inicijalnog doziranja takrolimusa ovisno o genotipu *CYP3A5*, odnosno o metaboličkom fenotipu. Kod pacijenata koji pokazuju ekspresiju jedne ili dviju funkcionalnih kopija *CYP3A5* gena, tj. za primatelje koji imaju fenotip brzog ili intermedijarnog metabolizma, smjernice preporučuju početnu dozu koja je 1,5 – 2 puta veća od uobičajene inicijalne doze, ali ne preko 0,3 mg/kg/dan, te svakako daljnje praćenje koncentracije takrolimusa (11).

5. ZNAČAJ FARMAKOGENETIČKOG TESTIRANJA *CYP3A5* KOD PRIMATELJA BUBREŽNOG PRESATKA

Presađivanje bubrega znatno poboljšava kvalitetu života kod pacijenata sa završnim stadijem bubrežnog zatajenja. Kako ne bi došlo do odbacivanja presatka, važna je primjena imunosupresiva. Takrolimus je imunosupresiv koji se koristi u terapiji protiv odbacivanja presatka, ali uz uzak terapijski raspon teško je bez genotipizacije odrediti granicu između preniske koncentracije koja će uzrokovati odbacivanje presatka i previsoke koja će dovesti do neželjenih toksičnih učinaka. Takrolimus se metabolizira putem *CYP3A5* enzima. Zbog interindividualnih varijacija, uskog terapijskog raspona, mogućih toksičnih nuspojava ili odbacivanja presatka, testiranje gena *CYP3A5* ima veliki značaj kod primatelja bubrežnog presatka.

Genetičko testiranje *CYP3A5* treba izvesti prije primjene takrolimusa s ciljem optimizacije početne doze terapije takrolimusom. Početna korekcija doze takrolimusa prema genotipu *CYP3A5* utječe na ranije postizanje terapijske koncentracije lijeka.

6. SAŽETAK

Gen *CYP3A5* ima važnu ulogu u farmakokinetici takrolimusa, lijeka koji se koristi kao osnovna imunosupresivna terapija za bolesnike koji se podvrgavaju transplantaciji solidnih organa. Takrolimus je makrolidni antibiotik koji djeluje na principu inhibicije kalcineurinskog puta prijenosa signala. Cilj imunosupresivnog liječenja smanjenje je neželjenog imunosnog odgovora, ali ga prate i komplikacije. Pacijenti koji su ekspresori imaju izražen alel *CYP3A5*1* te trebaju višu dozu takrolimusa u odnosu na neekspresore koji imaju izražen alel *CYP3A5*3*. Homozigoti *CYP3A5*1/*1* i heterozigoti *CYP3A5*1/*3* klasificiraju se kao brzometabolizirajući fenotip, odnosno intermedijarni metabolizatori. Takvi pacijenti zahtijevaju višu početnu dozu takrolimusa u odnosu na fenotip sporog metabolizatora *CYP3A5*3/*3* koji trebaju standardnu preporučenu dozu. Prema smjernicama CPIC konzorcija, bolesnike na imunosupresivnom liječenju takrolimusom treba farmakogenetski testirati na točkastu mutaciju *CYP3A5*3* prije početka terapije.

KLJUČNE RIJEČI: *CYP3A5* gen*;* takrolimus; transplantacija bubrega

7. SUMMARY

Pharmacogenetic testing of *CYP3A5* in optimization of initial tacrolimus dose for kidney transplant recipients

The *CYP3A5* gene plays an important role in the pharmacokinetics of tacrolimus, a drug used as primary immunosuppressive therapy for patients undergoing solid organ transplantation. Tacrolimus is a macrolide calcineurin inhibitor. Immunosuppressive therapy is intended to reduce the unwanted immune response, but also there are side-effects. It is important to minimize toxicity without risk of GVHD. Patients who are expressors have expressed *CYP3A5*1* allele and need a higher dose of tacrolimus than non-expressors who have *CYP3A5*3* allele expressed. Homozygotes *CYP3A5*1/*1* and heterozygotes *CYP3A5*1/*3* are classified as a rapidly metabolizing phenotype or intermediate metabolizers, respectively. These patients require a higher starting dose of tacrolimus compared to the phenotype of the slow metabolizer *CYP3A5*3/*3*, which need a standard dose. According to the guidelines of the CPIC consortium, patients on immunosuppressive therapy with tacrolimus should be pharmacogenetically tested for the *CYP3A5*3* polymorphism prior to initiating the therapy.

KEY WORDS: *CYP3A5* gene; tacrolimus; kidney transplant

8. LITERATURA

1. Božina N., Pejnović.L. Farmakogenetika u kliničkoj praksi – preporuke i smjernice. Smjernice za kliničku praksu. Paediatr Croat. 2013;57:318-30.
2. Topić E, Primorac D. Farmakogenomika: značenje za medicinu u sljedećim desetljećima. Zbornik sveučilišta Libertas. 2019;4(4):231-251.
3. Božina N. Farmakogenomika i farmakovigilancija. Medicus .2017;26:13-22.
4. Katzung BG., Masters SB. i Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 2.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
5. Božina N. Uloga farmakogenetičkih varijacija u terapiji depresije. Doktorska disertacija. Zagreb; 2005. Dostupno na adresi: https://medlib.mef.hr/249/1/bozina.pdf Datum pristupa: 28.07.2020.
6. Chen L, Prasad GVR. CYP3A5 polymorphisms in renal transplant recipients: influence on tacrolimus treatment. Pharmgenomics Pers Med. 2018;11:23-33.
7. PHARMGKB. Very Important Pharmacogene: CYP3A4. 2017. Dostupno na adresi: https://www.pharmgkb.org/vip/PA166169915/overview Datum pristupa: 03.09.2020.
8. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC®). Dostupno na adresi: https://cpicpgx.org/ Datum pristupa: 31.07.2020.
9. 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; 2016.
10. Devčić B. Transplantacija bubrega kao najbolja metoda nadomještanja bubrežne funkcije – prikaz slučaja. Sestrinski glasnik. 2013;18(3):245-249.
11. Adams S. M., Crisamore K. R., Empey P. E. Clinical Pharmacogenomics: Applications in Nephrology. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. 2018;13(10), 1561–1571.
12. BC transplant. Clinical guidelines for transplant medications. 2019.
13. Bardek I, Milavec-Puretic V, Lipozencic J. Azathioprine in Dermatology. Acta Dermatovenerol Croat. 2007;15(4):0-0.
14. Genes-Drugs. CPIC. Dostupno na adresi: https://cpicpgx.org/genes-drugs/ Datum pristupa: 05.09.2020.

15. Voriconazole Pathway, Pharmacokinetics. PharmGKB. Dostupno na adresi: https://www.pharmgkb.org/pathway/PA166160640 Datum pristupa 04.09.2020.
16. Andrews, L. M., De Winter, B. C., Van Gelder, T., & Hesselink, D. A. Consideration of the ethnic prevalence of genotypes in the clinical use of tacrolimus. Pharmacogenomics. 2016 ;17(16), 1737–1740.
17. Karahmenić J., Izetbegović S., i sur. Imunosupresivna terapija i njena primjena u transplataciji organa. 1.izd. Sarajevo: Svjetlost; 2012.
18. Tacrolimus/Cyclosporine Pathway, Pharmacokinetics. PharmGKB. Dostupno na adresi: https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165986114 Datum pristupa: 05.09.2020.
19. CYP3A5. PharmGKB. Dostupno na adresi: https://www.pharmgkb.org/gene/PA131/overview Datum pristupa: 10.08.2020.
20. Op den Buisch R. Pharmacokinetics and pharmacogenomics of tacrolimus in renal transplant patients. Disertacija. Maastricht: 2007.
21. Khan A.R., Raza A., Firasat S. et al. CYP3A5 gene polymorphisms and their impact on dosage and trough concentration of tacrolimus among kidney transplant patients: a systematic review and meta-analysis. Pharmacogenomics J 2020;20, 553–562.
22. Adler G. et al. Landscape of CYP3A5 Variants in Central-Eastern and South European Populations. CMBEBIH 2019. Springer, Cham, 2020;73:527-531.
23. Birdwell KA., Decker B., Barbarino JM., et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. Clin Pharmacol Ther. 2015;98(1):19-24.

9. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Matea Bilić-Pavlinović

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 6. 9. 1996., Vinkovci, Republika Hrvatska

ADRESA: Petra Preradovića 94b, 32100 Vinkovci

KONTAKT: matea.vk96@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2017. – 2020.: Sveučilište J. J. Strossmayera, Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2011. – 2015.: Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2003. – 2011.: Osnovna škola Antuna Gustava Matoša, Vinkovci