

## **Streszczenie rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Kotowskiej**

**„Wpływ polimorfizmów genów kodujących białko wiążące witaminę D DBP rs2282679 oraz hydroksylazę CYP2R1 rs10741657 na terapię przy użyciu inhibitorów kalcyneuryny”.**

**Promotor pracy: prof. dr hab. Jerzy Sieńko**

**Promotor pomocniczy prof. dr hab. Grzegorz Trybek**

Większość chorych osiągających końcowe stadium przewlekłej choroby nerek poddawana jest hemodializie lub dializie otrzewnowej. Szacuje się, że około 56% osób dializowanych aktywnie oczekuje na przeszczep, ale popyt przewyższa dostępność, więc tylko 25% otrzyma narząd, podczas gdy w oczekiwaniu na transplantację 6% chorych umiera każdego roku.

Jedynym skutecznym sposobem leczenia przewlekłej niewydolności nerek jest jej przeszczepienie. Po udanym zabiegu, nagromadzone metabolity i elektrolity są wydalane, zaś za pomocą mechanizmów regulatorowych powracają do normy. Porównując wyniki biorców i chorych dializowanych, uzyskano zmniejszoną śmiertelność oraz spadek zdarzeń sercowo-naczyniowych a przede wszystkim wzrost oceny jakości życia. Jednak zaburzenia metabolizmu kostnego nadal występują u większości pacjentów. Zaawansowanie tych zmian jest zależne od stanu zdrowia chorego przed zabiegiem jak i sytuacji klinicznej po transplantacji. Stan ten w dużej mierze kształtowany jest przez terapię immunosupresyjną stanowiącą integralną część opieki nad chorym. Leki te muszą być stosowane przez całe życie i mogą powodować szereg działań niepożądanych, których nasilenie jest zależne od wrażliwości osobniczej chorego. Wysokie dawki wpływają na inhibicję osteoblastogenezy oraz osłabiają wchłanianie wapnia z przewodu pokarmowego. Wraz z utrzymującą się nadczynnością przytarczyc skutkują zaburzeniami metabolizmu kostnego i mineralnego w długoterminowej opiece biorców. Najszybsza utrata tkanki kostnej występuje w okresie od sześciu do dwunastu miesięcy po transplantacji. Powszechnie wiadomo, że witamina D odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu kostnego a poprzez bezpośredni oraz pośredni wpływ na ekspresję genów utrzymuje homeostazę ustroju w na każdym etapie życia. Z biochemicznego punktu widzenia jej znaczenie wykracza poza encyklopedyczną definicję słowa „witamina”. Organizm jest zdolny do jej samodzielnej syntezy a w warunkach homeostazy stanowi niemal jej główne źródło. Proces ten jest wieloetapowy i rozpoczyna się w komórkach warstwy ziarnistej skóry a postacią wyjściową szlaku jest 7-dehydrocholesterol. Pomimo, że w skórze powstanie prewitaminy D zachodzi na drodze nieenzymatycznej to w dalsze reakcje zaangażowanych jest kilka istotnych substancji regulatorowych. Dzięki badaniom z zakresu genetyki molekularnej ustalono ich lokalizację w genomie oraz dowiedziono, że istnieją polimorfizmy, które mogą mieć wpływ na metabolizm witaminy D u biorców oraz modulować działanie leków immunosupresyjnych. Niniejsza praca bada wpływ polimorfizmów dwóch genów szlaku biosyntezy na terapię przy użyciu inhibitorów kalcyneuryny: białka wiążącego witaminę D DBP rs2282679 oraz hydroksylazy CYP2R1 rs10741657. Analizę zależności pomiędzy

współczynnikiem C/D (Concentration/Dose ratio) a profilem genetycznym przeprowadzono przy pomocy metodologii data mining. Zastosowano algorytm Random Forest, a następnie Classification and Regression Trees — C&RT (Statistica 13.1). Analizę uzupełniono testami ANOVA wraz z testem post-hoc Tukeya dla różnych n, w przypadku zmiennych spełniających warunek rozkładu normalnego oraz testem Kuskala-Wallisa dla zmiennych niespełniających warunku rozkładu normalnego. Do oceny normalności rozkładu zastosowano test Szapiro-Wilka. Wykazano, że warianty polimorficzne genu dla białka wiążącego witaminę D (rs2282679) mają znaczenie w ustalaniu dawkowania cyklosporyny A w grupie pacjentów po przeszczepieniu nerki. Analiza algorytmem drzew decyzyjnych nie wykazała predykcyjnego znaczenia polimorfizmu CYP2R1 (rs10741657) genu dla 25-hydroksylazy w badanym modelu. Zmienności genetyczne mające wpływ na stężenie osoczowe witaminy D mogą mieć pośredni wpływ na wielkość dawki leczenia immunosupresyjnego przy użyciu inhibitorów kalcyneuryny.

## Abstract

The most of patients whose suffer from the end stage of chronic kidney disease is treated by hemodialysis or peritoneal dialysis. It is estimated than about 56% of dialised patients are still waiting for kidney transplant but demand exceeds supply, than only 25% will receive an organ, while 6% of patients die each year while waiting for a transplant. The only effective treatment for chronic kidney disease is kidney transplantation. After a successful operation accumulated metabolites and electrolytes are excreted by the regulatory mechanisms, finally they return to the correct concentrations. In comparison to patients treatment by dialysis, patients after transplantation have reduced mortality and decrease number of cardiovascular events but most of all increase them quality of life. However, in this group of patients, disorders of bone metabolism still occur. The advancement of these changes depends of the patient's health before procedure and the statement of health after the transplantation. In a great sense it is shaped by immunosuppressive therapy, what is the integral part of patient care. Immunosuppressants must be used throughout life and may cause a number of side effects, which severity depends on the individual sensitivity of the patient. High doses cause the inhibition of osteoblastogenesis and decrease the absorption of calcium from the gastrointestinal tract. Together with persistent hyperparathyroidism, contributes to disorders of bone and mineral metabolism in the long-term care of patients. Within 6 to 12 months after transplantation is the fastest bone loss. It is well known that vitamin D is important in the normal functioning of the skeletal system, by the direct and indirect effects on gene expression, maintains the homeostasis at every stage of life. From a biochemical point of view, its meaning goes beyond the 'vitamin' encyclopedic definition. The body is able to synthesize vitamin D on its own- in homeostasis it is the almost main source. This process is multistage and begins in the cells of the granular layer of the skin, and the basic form of the pathway is 7-dehydrocholesterol. Although the skin reaction of the synthesis previtamin D is non-enzymatic, several important regulatory substances are involved in the next reactions. molecular genetics research determined their location in the genome, showed that there are polymorphic variants, which can change vitamin D metabolism in kidney transplant recipients and also can modify the effect of immunosuppressants. This publication focused on the two genes polymorphisms in the biosynthesis pathway, in concern to the calcineurin inhibitors therapy: vitamin D binding protein DBP rs2282679 and CYP2R1 hydroxylase rs10741657. The analysis of the relationship between the C/D ratio (concentration/dose ratio) and the genetic profile was developed by using data mining methodology. The Random Forest algorithm was used followed by Classification and Regression Trees - C&RT (Statistica 13.1). The analysis was supplemented with ANOVA tests together with Tukey's post-hoc test for various n, in the case of variables meeting the condition of normal distribution, and the Kuskal-Wallis test for variables not meeting the condition of normal distribution. The Szapiro-Wilk test was used to assess the normality of the distribution. Polymorphic variants of the vitamin D binding protein gene (rs2282679) have been shown to be important in determining the dosage of cyclosporin A in the group of patients after kidney transplantation. Decision trees analysis showed no predictive significance of the CYP2R1 polymorphism (rs10741657) of the 25-hydroxylase gene on the research model. Polymorphic variants which can modify vitamin D plasma levels, may have an indirect effect on the calcineurin inhibitors dose used in immunosuppressive treatment.