

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Blanka Černá

Školitel: Doc. PharmDr. Martin Beránek, PhD.

Název diplomové práce: Thiopurin S-methyltransferasa – klinický význam genotypizace a fenotypizace

Thiopurin S-methyltransferasa (TPMT) katalyzuje S-methylaci thiopurinových léčiv jako jsou 6-merkaptopurin a thioguanin. Polymorfismy v genu pro TPMT představují důležitý fakt v oblasti klinické farmakogenetiky. Velké rozdíly ve stupni aktivity TPMT v lidské tkáni jsou důsledkem přítomnosti mutace v genu pro tento enzym. Tyto polymorfismy jsou tak důležitým faktorem v účinnosti léčby thiopuriny. Nízká hodnota aktivity enzymu se objevuje v přítomnosti mutace v genu pro tento enzym, vyšší hodnota aktivity enzymu naopak bez přítomnosti mutace.

Genotypizovali jsme TPMT gen pomocí metody real-time PCR u vybrané skupiny pacientů (n=55) s autoimunitními onemocněními. Pacienti byli v průměrném věku 16,7 roku. Z nesrážlivé krve sbírané do EDTA (n=55) byla izolována DNA pomocí QIAmp Mini Kitu (Qiagen, Německo) a použita pro genotypizaci enzymu TPMT. Genotypizace byla provedena metodou real time PCR metody v Light Cycleru (Roche, Německo). TPMT byla fenotypizována na Lékařské fakultě v Hradci Králové na Ústavu farmakologie. Pro fenotypizaci byl použit lyzát suspenze erytrocytů (krev byla sbírána do Li-heparinizovaných zkumavek) a pro stanovení aktivity enzymu TPMT byla použita RP-HPLC (C18) metoda s gradientovou elucí.

Bylo potvrzeno, že aktivita enzymu TPMT závisí na genotypu TPMT. Nízká hodnota aktivity enzymu byla nalezena u mutovaných alel, TPMT*3A. Vyšší hodnoty aktivit jsme potvrdili u pacientů s wild type alelou (TPMT*1). Retenční čas 6-methylmerkaptopuirnu (6-MMP) byl 8,5 min a aktivita enzymu byla vyjádřena jako koncentrace vzniklého 6-MMP za 1 hod na 1 ml suspenze erytrocytů.

