

Thiết lập quy trình xác định kiểu gen của điểm đa hình ABCB1 3435C>T bằng kỹ thuật PCR-RFLP và phân tích ảnh hưởng của đa hình gen đối với liều, nồng độ thuốc tacrolimus ở bệnh nhân ghép thận

Development of an in-house method for genotyping of ABCB1 3435C>T and its association with dose, concentration of tacrolimus in renal transplant patients

Hoàng Xuân Sứ*, Nguyễn Giang Hòa***,
Hà Thanh Bình**, Đinh Thị Thu Hằng*,
Nguyễn Hữu Bền*, Phạm Quốc Toàn***

*Học viện Quân y,
**Quân chủng Hải Quân,
***Bệnh viện Quân y 103

Tóm tắt

Mục tiêu: Thiết lập được quy trình xác định kiểu gen tại điểm đa hình ABCB1 3435C>T (rs1045642) bằng phương pháp PCR-RFLP và khảo sát sự ảnh hưởng của đa hình gen ABCB1 đối với liều, nồng độ tacrolimus ở bệnh nhân ghép thận. *Đối tượng và phương pháp:* 100 bệnh nhân sau ghép thận được điều trị bằng tacrolimus tại Khoa Thận, lọc máu - Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y. Các mẫu máu được thu thập để xác định đa hình di truyền của ABCB1 và theo dõi nồng độ tacrolimus. Thiết kế mỗi và lựa chọn enzyme giới hạn cho thiết lập quy trình xác định kiểu gen tại điểm đa hình ABCB1 3435C>T (rs1045642). Phân tích mối liên quan giữa các kiểu gen thu được với liều và nồng độ TAC tại các thời điểm khảo sát. *Kết quả:* Một đoạn gen kích thước 244bp chứa điểm đa hình ABCB1 3435C>T (rs1045642) được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu. Enzym *Mbol* nhận diện trình tự cắt sản phẩm PCR tạo ra các đoạn có kích thước lần lượt là 172bp và 68bp đối với điểm đa hình là allele C hay kiểu gen đồng hợp CC. Khi điểm đa hình là allele T thì enzyme *Mbol* cắt sản phẩm PCR tạo ra đoạn có kích thước tương ứng là 244bp hay kiểu gen đồng hợp TT. Kiểu gen dị hợp CT tương ứng với các đoạn có kích thước lần lượt là 244, 172, 68bp. Khảo sát sự ảnh hưởng kiểu gen ABCB1 3435C>T (rs1045642) đối với liều nồng độ tacrolimus ở bệnh nhân sau ghép thận tại các khoảng thời gian 1 tuần, 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng và 12 tháng cho thấy chưa có sự ảnh hưởng của đa hình gen này đến chuyển hoá thuốc tacrolimus. *Kết luận:* Chúng tôi đã lập được quy trình đơn giản, dễ thực hiện cho xác định kiểu gen ABCB1 3435C>T (rs1045642). Chưa thấy có sự ảnh hưởng của đa hình ABCB1 3435C>T (rs1045642) đến liều, nồng độ tacrolimus ở bệnh nhân sau ghép thận.

Ngày nhận bài: 11/4/2023, ngày chấp nhận đăng: 4/5/2023

Người phản hồi: Hoàng Xuân Sứ, Email: hoangxuansu@vmmu.edu.vn - Học viện Quân y

Từ khóa: ABCB1, PCR-RFLP, tacrolimus, ghép thận.

Summary

Objective: To develop an in-house method for genotyping of ABCB1 genetic polymorphism and analyze its impact on the concentration and dose of tacrolimus in renal transplant patients. **Subject and method:** A total of 100 patients after kidney transplant were treated with tacrolimus at the Department of Nephrology and Dialysis - 103 Military Hospital, Military Medical University. Blood samples were collected to identify ABCB1 genetic polymorphisms and monitor Tacrolimus levels. Primer design and restriction enzyme selection for setting up the genotyping of the polymorphism at 3435C>T (rs1045642). Analyzing the relationship between ABCB1 genotypes obtained with doses and concentrations of TAC at the time points of follow up. **Result:** In this study, a fragment 244bp containing ABCB1 3435C>T (rs1045642) genetic polymorphism was amplified by PCR. Enzyme *MboI* recognize the PCR product cutting sequence which generates 2 fragments of 172bp and 68bp, respectively, for the C allele or CC homozygous genotype. When the polymorphism is the T allele, the *MboI* enzyme cuts the PCR product to create a fragment with the corresponding size of 244bp or homozygous genotype TT. The CT heterozygous genotype corresponds to fragments with sizes of 244, 172, 68bp, respectively. There was no significant difference between ABCB1 3435C>T (rs1045642) genotypes and concentrations and doses of tacrolimus at different time points investigated. **Conclusion:** We have established a simple and reliable method for genotyping ABCB1 3435C>T (rs1045642). No effect of the polymorphism ABCB1 3435C>T (rs1045642) has been found in relation to the dose and concentration of tacrolimus in patients after kidney transplantation.

Keywords: ABCB1, PCR-RFLP, tacrolimus, renal transplant.

1. Đặt vấn đề

Tacrolimus, một thuốc ức chế miễn dịch có khoảng điều trị hẹp và sự biến thiên lớn về dược động học cũng như đáp ứng điều trị trong cùng một cá thể và giữa các cá thể [1]. Theo dõi nồng độ thuốc Tacrolimus đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa thải ghép và tránh độc tính của thuốc khi sử dụng lâu dài. Tacrolimus được vận chuyển ra khỏi tế bào thông qua P-glycoprotein được mã hoá bởi gen đa kháng thuốc (MDR1), còn được gọi là ABCB1 "ATP binding cassette subfamily B member 1" và được chuyển hóa thông qua các enzyme họ CYP3A. Các nghiên cứu đã chỉ ra các đa hình di truyền ABCB1 có thể

liên quan đến số lượng hoặc hoạt động của các protein vận chuyển dẫn đến mất vai trò sinh lý của các protein này và làm thay đổi các chức năng của chất vận chuyển thuốc gây ảnh hưởng dược động học của tacrolimus [2]. Biến thể được nghiên cứu rộng rãi nhất của ABCB1 ở vị trí nucleotide 3435 trong exon 26 (3435C>T). Mặc dù, sự chuyển đổi này không làm thay đổi axit amin được mã hóa của nó với Ile ở vị trí 114522, nhưng biến thể TT có liên quan đáng kể đến việc giảm biểu hiện mRNA và độ ổn định của protein và có thể làm giảm khả năng vận chuyển thuốc [9]. Cho đến nay đã có nhiều phương pháp xác định kiểu gen của điểm đa hình ABCB1 3435C>T (rs1045642), tuy nhiên phương

pháp chuẩn vẫn là giải trình tự gen, các phương pháp khác như realtime PCR, PCR với cặp mỗi đặc hiệu allele, PCR-RFLP cũng được sử dụng rộng rãi ở nhiều phòng thí nghiệm [3]. Các phương pháp như giải trình tự gen, realtime PCR có hạn chế là cần có trang thiết bị hiện đại, chi phí cao và nhân viên cần phải được đào tạo chuyên môn kỹ thuật tốt. Chính vì vậy, để khắc phục những hạn chế đó, chúng tôi tiến hành thiết lập một phương pháp cho xác định điểm đa hình ABCB1 3435C>T và khảo sát sự ảnh hưởng đa hình ABCB1 3435C>T đối với nồng độ, liều lượng tacrolimus ở bệnh nhân ghép thận.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Gồm 100 bệnh nhân sau ghép thận được điều trị bằng tacrolimus tại Khoa Thận, lọc máu - Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y từ tháng 3 đến tháng 9/2019. Mẫu máu ngoại vi được thu thập bằng ống EDTA-K2. Huyết tương được tách bằng ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút. Mẫu huyết tương và máu toàn phần được bảo quản tủ -20°C cho đến khi tách ADN.

2.2. Phương pháp

Nghiên cứu theo phương pháp thực nghiệm labo có đối chứng phân tích so sánh. Thu thập thông tin bệnh nhân và các chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng tại các thời điểm khảo sát từ hồ sơ bệnh án điện tử.

2.3. Quy trình nghiên cứu

Tách ADN: Tổng số 100 mẫu máu thu thập được tách chiết ADN từ máu toàn phần sử dụng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các mẫu DNA được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng cho phản ứng PCR.

Thiết kế mỗi: Chúng tôi sử dụng phần mềm Primer3 software và trình tự tham chiếu thu được từ ngân hàng gen (FJ158815.1). Trình tự mỗi xuôi và mỗi ngược lần lượt là 5'-GATCTGTGAAGACTCTTGTTTTCA-3' và 5'-GAAGAGAGACTTACATTAGGC-3'. Cặp mỗi sử dụng cho phản ứng PCR và giải trình tự gen được đặt tổng hợp bởi hãng IDT (Mỹ).

Lựa chọn enzyme giới hạn: Chúng tôi sử dụng phần mềm SNP cutter và REBASE database để lựa chọn enzyme *Mbol* với trình tự cắt GATC cho phản ứng RFLP cho xác định kiểu gen của đa hình ABCB1 3435C>T.

PCR khuếch đại đoạn gen: Có chứa điểm đa hình ABCB1 3435C>T.

Thành phần phản ứng PCR nhân gen: Master mix: 12,5µl; primers (5µM): 1µl; nước khử ion: 6,5µl; mẫu: 5µl, tổng thể tích 25µl.

Chu trình nhiệt phản ứng PCR: 94°C trong 5 phút; tiếp theo 35 chu kỳ: 94°C trong 30 giây, 54°C trong 30 giây, 72°C trong 45 giây. Cuối cùng 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2%, phân tích kết quả.

Thực hiện phản ứng RFLP: Sử dụng enzyme giới hạn để thực hiện phản ứng cắt sản phẩm PCR gồm các thành phần như sau:

Thành phần hỗn hợp xử lý enzyme tối ưu: Buffer 10X: 1µl; Sản phẩm PCR: 5µl; enzyme *Mbol*: 1 unit và thêm nước cho tới tổng thể tích 10µl.

Chu trình nhiệt xử lý enzyme: Ủ phản ứng ở 37°C trong 1 giờ, biến tính enzym ở 65°C trong 15 phút. Sử dụng 8µl sản phẩm cắt thu được điện di trên gel agarose 3%, với hiệu điện thế 100V, trong 70 phút để kiểm tra.

Giải trình tự Sanger: Sản phẩm nhân gen được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, Mỹ), giải

trình tự trực tiếp trên hệ thống Beckman Coulter CEQ 2000.

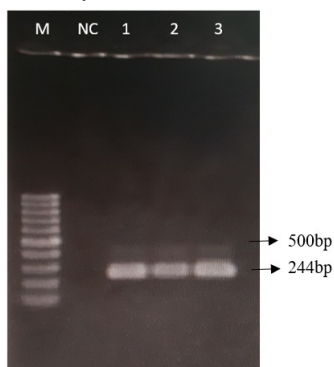
Định lượng tacrolimus: Nồng độ đáy tacrolimus (ng/mL): Định lượng nồng độ thuốc tacrolimus trong máu toàn phần của bệnh nhân ở các thời điểm khác nhau bằng phương pháp miễn dịch hóa phát quang trên hệ thống máy Architect i2000 của hãng Abbott, Hoa Kỳ. Ngưỡng định lượng là 0,5ng/ml và dải định lượng Tacrolimus với nồng độ từ 0,5-15ng/ml.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm xử lý số liệu SPSS 22.0.

3. Kết quả

3.1. Kết quả nhân gen ABCB1 3435C>T

Chúng tôi tiến hành phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen ABCB1 (3435C>T) từ DNA tổng số sau khi được tách từ tế bào máu ngoại vi của bệnh nhân sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho sản phẩm PCR đúng kích thước mong đợi, sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2% trong vòng 50 phút (Hình 1).



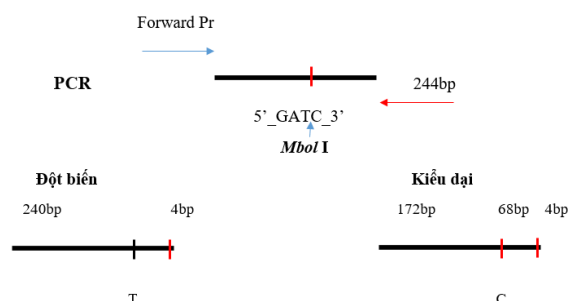
Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm nhân đoạn gen ABCB1 3435C>T

(M: Marker 100bp, NC: Đối chứng âm, 1-3: Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen đích)

Kết quả cho thấy băng xuất hiện khi điện di sản phẩm nhân gen đều rõ ràng, phù hợp với kích thước thiết kế và không xuất hiện băng phụ. Như vậy, điều kiện cho phản ứng nhân gen được tối ưu. Sản phẩm

nhân gen sử dụng cho phản ứng RFLP với enzyme cắt giới hạn *MbolI*.

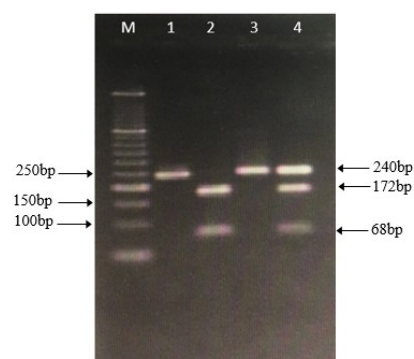
3.2. Kết quả xử lý enzym cắt giới hạn để phát hiện ABCB1 3435C>T



Sơ đồ 1. Sơ đồ cắt của enzyme *MbolI*

Theo sơ đồ cắt được minh họa ở trên trình tự cắt của enzyme *MbolI* là 5'_GATC_3' với đoạn trình tự khuếch đại bằng cặp mồi nhóm nghiên cứu thực hiện mang trình tự trùng với trình tự cắt của enzyme tại đầu mồi ngược và có một điểm cắt tại vị trí 173 nên sẽ tạo băng kích thước khoảng 172bp, 68bp và 4bp khi thực hiện trên trình tự hoang dại. Với trình tự đột biến C>T sẽ tạo băng kích thước 240bp và 4bp.

Sản phẩm nhân gen ABCB1 3435C>T được xử lý cùng enzyme *MbolI* cho các đoạn có kích thước khác nhau được phân biệt trên điện di trên gel agarose 3%.



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm phân biệt kiểu gen ABCB1 3435C>T

M: Marker 50bp; 1: Mẫu đối chứng không cắt (không xử lý enzyme *MbolI*), 2: Kiểu hoang dại; 3: Kiểu đột biến; 4: Kiểu dị hợp tử

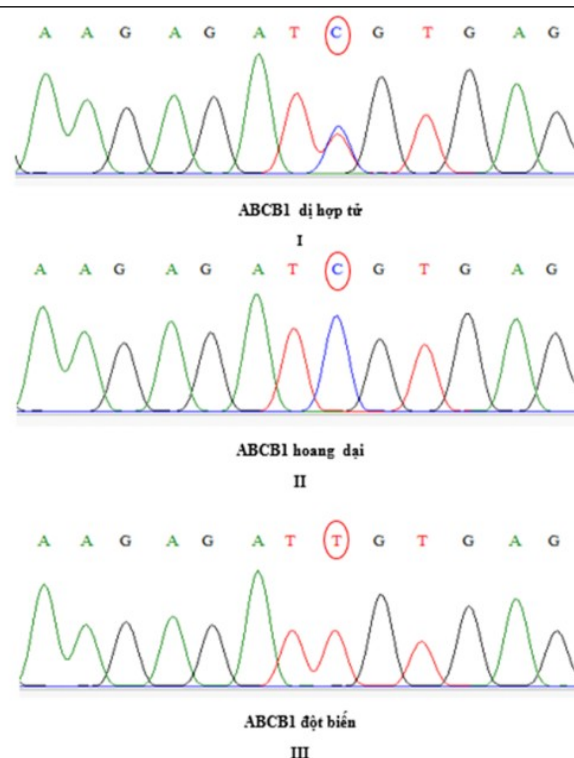
Dựa vào kích thước băng thu được trên điện di sản phẩm xử lý enzym *MbolI*, có thể xác định được kiểu gen:

Những mẫu xuất hiện 2 băng 172bp, 68bp và 4bp (không quan sát được trên bản gel) mang kiểu gen ABCB1 3435C>T đồng hợp CC, do đó mang kiểu gen hoang dại.

Những mẫu xuất hiện 3 băng 240bp; 172bp; 68bp và 4bp (không quan sát được trên bản gel) có kiểu gen ABCB1 3435C>T dạng dị hợp tử CT, do đó mang kiểu gen dị hợp tử.

Những mẫu chỉ xuất hiện 1 băng 240bp và 4bp (không quan sát được trên bản gel) có kiểu gen ABCB1 3435C>T dạng đồng hợp tử TT, mang kiểu gen đột biến.

3.3. Kết quả giải trình tự Sanger



Hình 3. Kết quả giải trình tự các các mẫu đa hình kiểu gen ABCB1(3435C>T)

I: Kiểu gen ABCB1 dị hợp tử (CT); II: Kiểu gen ABCB1 hoang dại (CC); III: Kiểu gen ABCB1 đột biến (TT)

Tổng số 100 mẫu được xác định kiểu gen ABCB1 bằng cả hai phương pháp PCR-RFLP và giải trình tự có độ tương đồng 100%.

Tần số alen và tỷ lệ kiểu gen ABCB1 3435C>T ở bệnh nhân ghép thận

Bảng 1. Tần số alen và kiểu gen của ABCB1 3435C>T ở bệnh nhân ghép thận

Gen	SNP	Tên theo danh pháp	Alen	Số bệnh nhân	Tần số kiểu gen, n (%)	Alen	Tần số alen
ABCB1	rs104564 2	ABCB1 3435C>T	CC	46	46 (46%)		
			CT	42	42 (42%)	C	67%
			TT	12	12 (12%)	T	33%

Nhận xét: Đa hình của ABCB1 3435C>T với các kiểu gen CC, CT, TT thu được kết quả lần lượt tương ứng với 46 (46%), 42 (42%), 12 (12%) trong tổng số 100 bệnh nhân. Tần số alen C là 67%, trong khi tần số alen T là 33% (Bảng 1). Sự phân bố kiểu gen tuân theo nguyên lý Hardy-Weinberg, trạng thái cân bằng.

Ảnh hưởng của đa hình ABCB1 3435C>T đến nồng độ, liều tacrolimus ở bệnh nhân ghép thận

Bảng 2. Mối liên quan giữa nồng độ tacrolimus với kiểu gen ABCB1

Nồng độ tacrolimus (ng/ml) TB ± SD	Kiểu gen ABCB1 3435C>T			p
	Kiểu dại CC (n = 46)	Dị hợp CT (n = 42)	Đột biến TT (n = 12)	
Sau ghép 1 tuần	4,40 ± 2,22	4,52 ± 2,68	6,08 ± 4,55	0,669
Sau ghép 1 tháng	8,69 ± 3,71	9,47 ± 4,13	9,64 ± 5,30	0,729
Sau ghép 3 tháng	7,92 ± 2,81	8,53 ± 3,31	7,98 ± 2,82	0,689
Sau ghép 6 tháng	7,16 ± 3,23	7,97 ± 2,23	8,07 ± 3,41	0,085
Sau ghép 12 tháng	6,59 ± 1,83	7,06 ± 2,40	6,68 ± 1,72	0,656
C ₀ trung bình	6,95 ± 2,04	7,51 ± 1,96	7,69 ± 2,67	0,250

Nhận xét: Nồng độ tacrolimus trung bình và nồng độ tacrolimus tại các thời điểm sau ghép giữa các nhóm kiểu gen ABCB1 3435C>T không có sự khác biệt với p>0,05.

Bảng 3. Mối liên quan giữa liều tacrolimus với kiểu gen ABCB1

Liều tacrolimus (mg/24 giờ) TB ± SD	Kiểu gen ABCB1 3435C>T			p
	Kiểu dại CC (n = 46)	Dị hợp CT (n = 42)	Đột biến TT (n = 12)	
Sau ghép 1 tuần	5,89 ± 0,60	5,98 ± 0,81	5,67 ± 0,78	0,652
Sau ghép 1 tháng	6,44 ± 1,16	6,49 ± 1,13	6,42 ± 1,38	0,987
Sau ghép 3 tháng	6,19 ± 1,56	6,25 ± 1,51	5,17 ± 2,22	0,303
Sau ghép 6 tháng	5,76 ± 1,88	5,89 ± 1,75	5,25 ± 1,83	0,640
Sau ghép 12 tháng	5,62 ± 2,08	5,66 ± 1,83	4,96 ± 2,18	0,611
C ₀ Trung bình	5,98 ± 1,22	6,05 ± 1,18	5,49 ± 1,34	0,428

Nhận xét: Liều tacrolimus trung bình và liều tacrolimus tại các thời điểm sau ghép giữa các các nhóm kiểu gen ABCB1 3435C>T không có sự khác biệt với p>0,05.

4. Bàn luận

Hiện nay đã có nhiều phương pháp được phát triển cho xác định kiểu gen của điểm đa hình ABCB1 3435C>T, tuy nhiên các phương pháp đòi hỏi giá thành cao, trang thiết bị hiện đại, nhân viên được đào tạo kỹ thuật tốt. Để khắc phục hạn chế đó ở các phòng thí nghiệm chưa có trang thiết bị đầy đủ chúng tôi đã phát triển phương

pháp đơn giản và chính xác cho xác định kiểu gen của điểm đa hình ABCB1 3435C>T. Chúng tôi đã sử dụng các phần mềm miễn phí để thiết kế môi và lựa chọn enzyme giới hạn để thiết lập được quy trình cho xác định kiểu gen của điểm đa hình ABCB1 3435C>T. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy độ tương đồng 100% khi đối chiếu so sánh với phương pháp giải trình tự gen. Tuy nhiên, phương pháp RFLP cũng có một số nhược điểm thời gian thực hiện lâu, nguy cơ nhiễm chéo khi xử lý sản phẩm PCR và điện di, chỉ xác định được các điểm đa hình đã biết không phát hiện được các điểm đa hình mới xuất hiện, đặc biệt

khi xuất hiện điểm đa hình trong trình tự cắt của enzyme có thể khó xác định chính xác kiểu gen.

Trong nghiên cứu này, khi phân tích tính đa hình của ABCB1 ở vị trí 3435 với các kiểu gen CC, CT, TT thu được kết quả lần lượt tương ứng với 46 (46%), 42 (42%), và 12 (12%) trong tổng số 100 bệnh nhân ghép thận được khảo sát và tần số alen C là 67%, tần số alen T là 33% (Bảng 1). Dữ liệu này của chúng tôi tương tự với một số dữ liệu được công bố trong các nghiên cứu ở Hàn Quốc với kiểu gen CC, CT, TT lần lượt tương ứng với 29 (41,4%), 33 (47,1%), 8 (11,4%) và tần số alen C là 65%, alen T là 35% [4]. Tỷ lệ kiểu gen ABCB1 đột biến 3435 TT (12%) thấp hơn so với nghiên cứu của Zhang và cộng sự (19,5%) [5].

Khi tiến hành phân tích sự ảnh hưởng của đa hình kiểu gen ABCB1 3435C>T với nồng độ, liều và tỷ số nồng độ/liều tacrolimus chúng tôi không tìm thấy mối liên hệ nào giữa các nhóm kiểu gen ABCB1 3435C>T với tỷ lệ nồng độ, liều tacrolimus ở bất kì thời điểm nào sau ghép thận. Tương tự trong một nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của đa hình di truyền CYP3A và ABCB1 lên dược động học của tacrolimus ở người ghép thận tại Nhật Bản cho thấy các đa hình ABCB1 C3435T không ảnh hưởng đến bất kì thông số dược động học nào của tacrolimus [6]. Nghiên cứu tại một số quốc gia như Hàn Quốc, Trung Quốc cũng chưa cho thấy có tác động đáng kể nào của đa hình gen ABCB1 3435C>T tới nồng độ tacrolimus [4], [7]. Trong khi đó, một nghiên cứu tác động của đa hình di truyền ABCB1 trên 92 bệnh nhân ghép thận điều trị bằng tacrolimus ở Thổ Nhĩ Kỳ cho thấy bệnh nhân mang kiểu gen 3435 TT nhận được liều hàng ngày thấp hơn ở tháng thứ 1 (0,14 so với 0,17 và 0,19) và tháng thứ 6 (0,08 so với 0,11 và 0,11) sau ghép. Tuy nhiên, bệnh nhân mang kiểu gen đồng hợp

3435 CC có nồng độ đáy được điều chỉnh theo liều thấp hơn so với bệnh nhân mang kiểu gen 3435 TT và CT ở tháng thứ 6 (127,32 so với 135,11 và 155,06) và tháng thứ 12 (110,37 so với 128,32 và 143,61) sau ghép [8]. Điều này có thể giải thích rằng các nghiên cứu thực hiện trên chủng tộc khác nhau, cỡ mẫu nhỏ và cần có nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để làm sáng tỏ sự liên quan của đa hình di truyền trong gen ABCB1 với nồng độ của tacrolimus ở bệnh nhân ghép thận.

5. Kết luận

Chúng tôi đã thiết lập được quy trình đơn giản, chính xác cho xác định kiểu gen của điểm đa hình ABCB1 3435C>T (rs1045642) dựa trên phương pháp PCR-RFLP. Phương pháp này cho xác định đa hình của ABCB1 3435C>T giúp cung cấp thêm thông tin cho các bác sĩ lâm sàng trước khi lựa chọn liều điều trị Tacrolimus phù hợp cho từng bệnh nhân ghép thận.

Chưa tìm thấy mối liên hệ nào giữa đa hình ABCB1 3435C>T (rs1045642) với tỷ lệ nồng độ, liều và tỷ lệ nồng độ/liều tacrolimus ở bất kì thời điểm nào sau ghép thận.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 04/2020/TN.

Tài liệu tham khảo

1. Brunet M, van Gelder T, Åsberg A, Haufroid V, Hesselink DA, Langman L et al (2019) *Therapeutic drug monitoring of tacrolimus-personalized therapy: Second consensus report*. Ther Drug Monit 41(3): 261-307.
2. Zawadzka I, Jeleń A, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M, Michalska K, Szmajda-Krygier D et al (2020) *The impact of ABCB1 gene polymorphism and*

- its expression on non-small-cell lung cancer development, progression and therapy - preliminary report. Sci Rep 10(1): 6188.*
3. Shi Y, Li Y, Tang J, Zhang J, Zou Y, Cai B et al (2013) *Influence of CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and early renal dysfunction in liver transplant recipients. Gene 512(2): 226-231.*
 4. Cho JH, Yoon YD, Park JY, Song EJ, Choi JY, Yoon SH, et al (2012) *Impact of cytochrome P450 3A and ATP-binding cassette subfamily B member 1 polymorphisms on tacrolimus dose-adjusted trough concentrations among Korean renal transplant recipients. Transplant Proc 44(1): 109-114.*
 5. Zhang X, Liu Z hong, Zheng J min, Chen Z hong, Tang Z, Chen J song, et al (2005) *Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. Clin Transplant 19(5): 638-643.*
 6. Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, Sato K, Miura M, Suzuki T, Kato T, Habuchi T (2005) *Impact of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. Transplant Proc 37(4): 1730-1732. doi: 10.1016/j.transproceed.2005.02.073.*
 7. Rong G, Jing L, Deng-Qing L, Hong-Shan Z, Shai-Hong Z, Xin-Min N (2010) *Influence of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients. Transplant Proc (9): 3455-3458.*
 8. Akbas SH, Bilgen T, Keser I, Tuncer M, Yucetin L, Tosun O et al (2006) *The effect of MDR1 (ABCB1) polymorphism on the pharmacokinetic of tacrolimus in Turkish renal transplant recipients. Transplant Proc 38(5): 1290-1292.*