

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA MAJCEN (KRSNIK)

**VPLIV IZBRANIH POLIMORFIZMOV V GENIH *SLCO1B1*, *ABCBI* IN *NR1I2* NA
KONCENTRACIJO RIFAMPICINA V KRVNI PLAZMI PRI PACIENTIH Z
ORTOPEDSKIMI ENDOPROTEZAMI**

MAGISTRSKO DELO
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA MAJCEN (KRSNIK)

**VPLIV IZBRANIH POLIMORFIZMOV V GENIH *SLCO1B1*, *ABCB1* IN *NR1I2* NA
KONCENTRACIJO RIFAMPICINA V KRVNI PLAZMI PRI PACIENTIH Z
ORTOPEDSKIMI ENDOPROTEZAMI**

**IMPACT OF SELECTED POLYMORPHISMS IN *SLCO1B1*, *ABCB1* AND *NR1I2*
GENES ON PLASMA RIFAMPICIN CONCENTRATION IN PATIENTS WITH
ORTHOPAEDIC ENDOPROSTHESES**

MAGISTRSKO DELO
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.. Vse izolacije DNA in genotipizacije so bile opravljene na Katedri za klinično biokemijo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentoriciizr. prof. dr. Barbari Ostanek, mag. farm. za vso pomoč, nasvete in usmerjanje pri izdelavi naloge. Zahvaljujem se tudi Petri Ferkov, mag. lab. biomed. in ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo za pomoč pri izvedbi praktičnega dela naloge. Hvala Gregu, staršem in bratoma za potrpežljivost in vse vzpodbudne besede.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvomizr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm..

Ljubljana, 2017

Mateja Majcen

Vsebina

Seznami slik in preglednic.....	V
Povzetek	VII
Abstract.....	IX
Seznam okrajšav	XI
1 Uvod.....	1
1.1 Okužbe ortopedskih vsadkov	1
1.2 Zdravljenje okužb	3
1.3 Rifampicin	5
1.3.1 Farmakokinetika rifampicina.....	6
1.3.1.1 Indukcija presnovnih encimov	7
1.3.2 Farmakogenetika rifampicina	7
1.3.2.1 Gen <i>SLCO1B1</i>	7
1.3.2.1.1 Polimorfizmi v genu <i>SLCO1B1</i>	8
1.3.2.2 Gen <i>ABCB1</i>	10
1.3.2.2.1 Polimorfizmi v genu <i>ABCB1</i>	11
1.3.2.3 Gen <i>NR1I2</i>	12
1.3.2.3.1 Polimorfizmi v genu <i>NR1I2</i>	13
2 Namen dela.....	16
3 Materiali in metode	17
3.1 Preiskovanci in protokol raziskave.....	17
3.2 Uporabljeni reagenti in aparature	17
3.3 Izolacija DNA.....	19
3.3.1 FlexiGene® DNA Kit.....	19
3.3.2 QIAamp DNA mini kit	21
3.4 Določanje koncentracije in čistosti izolirane DNA	22
3.5 Genotipizacija z uporabo hidrolizirajočih sond.....	23
3.6 Statistična analiza	29
4 Rezultati in razprava.....	31
4.1 Izolacija DNA in določanje njene koncentracije in čistosti	31
4.2 Izvedba genotipizacije	32

4.3	Pogostost pojavljanja genotipov.....	33
4.4	Vpliv polimorfizmov na farmakokinetiko rifampicina	37
4.4.1	Polimorfizmi v genu <i>SLCO1B1</i>	38
4.4.2	Polimorfizmi v genu <i>ABCB1</i>	40
4.4.3	Polimorfizmi v genu <i>NR1I2</i>	41
4.5	Določanje haplotipov	43
4.6	Vpliv haplotipov na farmakokinetiko rifampicina	44
4.6.1	Haplotipi v genu <i>SLCO1B1</i>	48
4.6.2	Haplotipi v genu <i>NR1I2</i>	49
5	Sklepi	50
6	Literatura.....	52
7	Priloge	57

Seznami slik in preglednic

Slika 1: Nastanek biofilma	2
Slika 2: Sheme zdravljenja okužbe endoproteze pri različnih kirurških posegih.....	4
Slika 3: Strukturna formula rifampicina.....	5
Slika 4: Lokacija gena <i>SLCO1B1</i>	8
Slika 5: Lokacija gena <i>ABCB1</i>	11
Slika 6: Lokacija gena <i>NR1I2</i>	12
Slika 7: Princip detekcije s hidrolizirajočimi sondami.....	25
Slika 8: Primer rezultatov genotipizacije za polimorfizem rs1045642 G>A.	33
Slika 9: Prikaz vezavnega neravnovesja med polimorfizmi v genih <i>SLCO1B1</i> in <i>NR1I2</i> v naši populaciji.....	44
Preglednica I: Pogostost pojavljanja posameznih alelov v genu <i>SLCO1B1</i> v centralno evropski populaciji	9
Preglednica II: Prikaz haplotipov polimorfizmov rs2306283 in rs4149056	10
Preglednica III: Pogostost pojavljanja posameznih alelov v genu <i>ABCB1</i> v centralno evropski populaciji	12
Preglednica IV: Pogostost pojavljanja posameznih alelov v genu <i>NR1I2</i> v centralno evropski populaciji	14
Preglednica V: Nukleotidna zaporedja s polimorfnimi mesti, ki smo jih določali.....	26
Preglednica VI: Povezava med porastom fluorescence posameznega barvila glede na genotip pri posameznem polimorfizmu.....	27
Preglednica VII: Volumska sestava reakcijskih zmesi za genotipizacijo za oba protokola.28	
Preglednica VIII: Temperaturni program za genotipizacijo po protokolu 1	29
Preglednica IX: Temperaturni program za genotipizacijo po protokolu 2.....	29
Preglednica X: Ujemanje frekvenc genotipov s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem.	34
Preglednica XI: Pogostost pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi za gen <i>SLCO1B1</i>	35
Preglednica XII: Pogostost pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi za gen <i>ABCB1</i>	35

Preglednica XIII: Pogostost pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi za gen <i>NR1I2</i>	36
Preglednica XIV: p - vrednosti pri ugotavljanju vpliva polimorfizmov v genu <i>SLCO1B1</i> na farmakokinetiko rifampicina.	38
Preglednica XV: p - vrednosti pri ugotavljanju vpliva polimorfizmov v genu <i>ABCB1</i> na farmakokinetiko rifampicina.	40
Preglednica XVI: p - vrednosti pri ugotavljanju vpliva polimorfizmov v genu <i>NR1I2</i> na farmakokinetiko rifampicina.	41
Preglednica XVII: p - vrednosti za vpliv haplotipov na farmakokinetiko rifampicina v genu <i>SLCO1B1</i>	46
Preglednica XVIII: p - vrednosti za vpliv haplotipov na farmakokinetiko rifampicina v genu <i>NR1I2</i>	47

Povzetek

Pri ljudeh z ortopedskimi endoprotezami se na sklepu lahko pojavi okužba. Da bi se izognili odstranitvi okužene endoproteze, se, kadar je le mogoče, poslužujemo protimikrobnega zdravljenja okužbe. Za najbolj učinkovito terapijo se je izkazala kombinacija rifampicina z enim izmed fluorokinolonov. Kljub temu terapija ni vedno uspešna in je potreben operativen poseg, zato smo se odločili, da bomo preverili, če polimorfizmi v genih, ki sodelujejo pri farmakokinetiki rifampicina, vplivajo na koncentracije rifampicina v krvi.

Iz že objavljene literature smo ugotovili, da so pomembni geni za ta antibiotik *SLCO1B1*, *ABCB1* in *NR1I2*. Za gen *SLCO1B1* smo izbrali polimorfizme rs2306283, rs4149032, rs4149056 in rs11045819, za gen *ABCB1* polimorfizem rs1045642, za gen *NR1I2* pa polimorfizme rs3814055, rs2276707, rs6785049, rs7643645 in rs2472677. Najprej smo s FlexiGene® DNA Kitom izolirali DNA iz polne krvi 83 pacientov, izvedli genotipizacijo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času in detekcijo po principu hidrolizirajočih sond, nato pa genotipe primerjali s koncentracijami v dveh časovnih točkah (prva časovna točka je pred pojavom avtoindukcije, druga pa po vzpostavitvi ravnotežja pod vplivom avtoindukcije), z očistki v obeh točkah, volumnom porazdelitve in razpolovnim časom. Ugotavljali smo tudi vpliv haplotipov na že omenjene farmakokinetične parametre.

Značilne rezultate smo ugotovili pri polimorfizmih rs4149056 v povezavi z očistkom v prvi časovni točki ($p = 0,005$) v genu *SLCO1B1*, rs1045642 v povezavi z očistkom v obeh časovnih točkah ($p_1 = 0,024$; $p_2 = 0,026$) in razpolovnim časom ($p = 0,019$) v genu *ABCB1*, rs2276707 ($p = 0,027$) in rs6785049 ($p = 0,027$) v povezavi s koncentracijo v prvi časovni točki ter rs2472677 v povezavi z razpolovnim časom ($p = 0,027$) in porazdelitvenim volumnom ($p = 0,034$) v genu *NR1I2*. Pomembnost rezultatov smo potrdili s haplotipi GC iz polimorfizmov rs2306283 in rs4149056 v povezavi z očistkom v prvi časovni točki ($p = 0,027$), TA iz polimorfizmov rs4149032 in rs2306283 ($p < 0,001$) in AC iz polimorfizmov rs6785049 in rs2276707 ($p = 0,027$) v povezavi s koncentracijo v prvi časovni točki ter haplotipa TAC in CGC iz polimorfizmov rs3814055, rs6785049 in rs2276707 v povezavi s koncentracijo v prvi časovni točki ($p_1 = 0,021$; $p_2 < 0,001$).

Ti polimorfizmi so tudi primerni za nadaljnje raziskave, saj bi na njihovi podlagi v prihodnosti morda lahko vzpostavili personalizirano zdravljenje.

Ključne besede: okužbe ortopedskih endoprotez, rifampicin, genetski polimorfizmi

Abstract

Prosthetic joint infections which are caused by microorganisms that form biofilms may occur in patients with orthopaedic endoprostheses. In order to avoid removal of endoprostheses antimicrobial treatment is prescribed. As combination therapy composed of rifampicin and one of fluoroquinolones showed the best outcomes it is the one that is usually used to treat such infections. Often surgery needs to be performed anyway as the treatment is not successful. Therefore we decided to check the impact of polymorphisms in genes that participate in rifampicin pharmacokinetics on plasma rifampicin concentration.

According to literature data *SLCO1B1*, *ABCB1* and *NR1I2* genes are the most important regarding rifampicin pharmacokinetics therefore we chose to analyze rs2306283, rs4149032, rs4149056 and rs11045819 polymorphisms for *SLCO1B1* gene, rs1045642 polymorphism for *ABCB1* gene and rs3814055, rs2276707, rs6785049, rs7643645 and rs2472677 polymorphisms for *NR1I2* gene. Isolation of DNA was performed from whole blood of 83 patients with FlexiGene® DNA Kit, genotyping with real time polymerase chain reaction and detection with hydrolysis probes. Association of genotypes with rifampicin's concentration and clearance in two time points (first time point is before autoinduction appears and second time point is when balance after autoinduction appears), volume of distribution and half-life was examined. Possible haplotypes were also studied.

Following polymorphisms were found to be associated with rifampicin pharmacokinetics: rs4149056 in connection with clearance in first time point ($p = 0,005$) in *SLCO1B1* gene, rs1045642 in connection with both clearances ($p_1 = 0,024$; $p_2 = 0,026$) and half-life ($p = 0,019$) in *ABCB1* gene, rs2276707 ($p = 0,027$) and rs6785049 ($p = 0,027$) in connection with concentration in first time point, and rs2472677 in connection with half-life ($p = 0,027$) and volume of distribution ($p = 0,034$) in *NR1I2* gene. Haplotypes GC from rs2306283 and rs4149056 polymorphisms in connection with clearance in first time point ($p = 0,027$), TA from rs4149032 and rs2306283 polymorphisms ($p < 0,001$) and AC from rs6785049 and rs2276707 polymorphisms ($p = 0,027$) in connection with concentration in first time point, and haplotypes TAC and CGC from rs3814055, rs6785049 and rs2276707 polymorphisms in connection with concentration in first time point ($p_1 = 0,021$; $p_2 < 0,001$) confirmed importance of mentioned polymorphisms.

These polymorphisms should be studied in larger groups and represent possible candidates for personalized treatment in the future.

Key words: Prosthetic joint infections, Rifampicin, Genetic Polymorphisms

Seznam okrajšav

<i>ABCB1</i>	gen za prenašalca z ATP-vezavno kaseto, poddružina B, član 1
ACE	angiotenzin-konvertaza
ANOVA	analiza variance
ATP	adenozin trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A
<i>NR1I2</i>	gen za jedrni receptor poddružina 1, skupina I, član 1
OATP	organski anionski prenašalni protein
PCR	verižna reakcija s polimerazo
P-gp	P-glikoprotein
PXR	pregnanski receptor X
RNA	ribonukleinska kislina
<i>SLCO1B1</i>	gen za prenašalec organskih anionov poddružina 1, skupina B, član 1

1 Uvod

Ortopedska endoproteza ali vsadek je medicinski pripomoček, ki ga kirurško vstavimo v telo, da bi obnovili funkcijo okvarjenega tkiva. Pri tem lahko poškodovani predel okrepimo ali zamenjamo. Takih operacij je danes vedno več, saj uspešen poseg zmanjša bolečino, ohrani funkcijo sklepa in izboljša kakovost pacientovega življenja. Kljub upoštevanju priporočil za uspešnost posega, pa se pri 1-2 % operiranih v predelu vsadka pojavi okužba (1, 2).

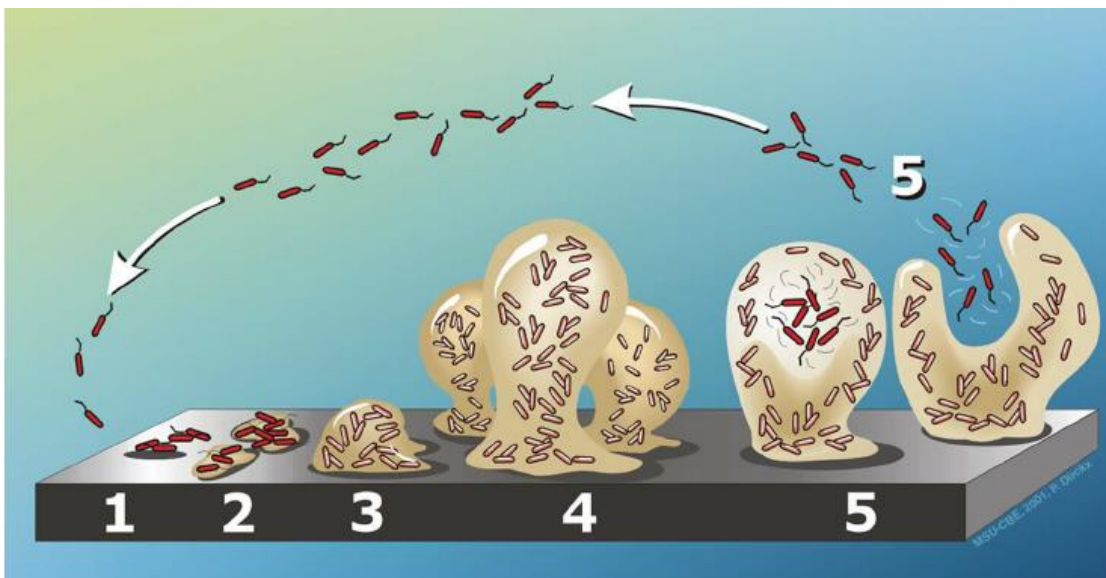
1.1 Okužbe ortopedskih vsadkov

O okužbi ortopedskih vsadkov govorimo, kadar se kadarkoli po vstavitvi umetnega sklepa pojavi periprostetična okužba, ki zaobjema vsadek in okoliška tkiva. Potek bolezni se razlikuje glede na virulenco povzročitelja, način začetka okužbe, imunski odziv okužene osebe, strukturo tkiva, ki obdaja vsadek, in glede na to, kateri sklep so zamenjali. Simptomi in znaki okužbe so bolečina, otekanje ali tekočina v sklepu, rdečica in topel občutek okoli le-tega, vročina in drenaža iz operacijske rane (2). Za potrditev okužbe mora biti prisoten vsaj še en izmed naslednjih znakov: rast enakih mikroorganizmov v vsaj dveh kulturah iz sinovijske tekočine ali periprostetičnega tkiva, prevladovanje nevtrofilcev v sinovijski tekočini, gnoj ob vsadku ali vidno akutno vnetje na histopatološki preiskavi periprostetičnega tkiva (3).

Okužbo lahko opredelimo glede na patogenezo – poznamo eksogene okužbe, do katerih pride med samim posegom ali v zgodnji pooperativni stopnji, kadar se rana ne celi po pričakovanjih, in hematogene okužbe, ki so posledica primarne okužbe na drugem delu telesa, povzročitelji pa do vsadka pridejo preko krvožilnega sistema. Taka okužba se lahko pojavi kadarkoli po operaciji, področje z vsadkom pa je zanjo bolj dovzetno, saj je lokalni imunski sistem na tem področju spremenjen. Glede na čas pojava okužbe pa jih razdelimo na zgodnje, ki se pojavijo v prvih dveh mesecih po posegu, zadržane, ki se pojavijo v obdobju med dvema in štiriindvajsetimi meseci, in pozne okužbe, ki se pojavijo več kot dve leti po operaciji. Zgodnje in zadržane so običajno eksogene narave, pozne pa hematogenega izvora (2, 3).

Mikroorganizmi, ki povzročajo okužbe, se pritrdijo na površino nato pa z razmnoževanjem tvorijo biofilm. Biofilm je kompleksna skupnost mikroorganizmov, ki so obdani z izvenceličnim matriksom. V začetnih stopnjah so nestabilni in tako dovzetnejši za

protimikrobne učinkovine in imunski odziv. S časom pa dozori v zrele biofilme, za katere je značilna nehomogena struktura, znotraj katere mikroorganizmi komunicirajo in imajo različne subpopulacije različne vloge. Znotraj biofilma zaradi koncentracijskega gradienta kisika in hranil nastajajo različni pogoji za rast, kar predvsem v centru, kjer je kisika in hranil najmanj, povzroči razvoj najmanj aktivnih mirujočih tipov mikroorganizmov, ki so dobro zaščiteni pred protimikrobnimi učinkovinami in imunskim odzivom. Imunski sistem na okuženem področju povzroča še več škode, kot bi jo povzročila sama okužba, saj se zaradi kroničnega vnetja aktivira prirojena in pridobljena imunost, kar povzroči tudi večjo pojavnost mutacij v mikroorganizmih iz biofilma. Večina jih je sicer škodljivih za mikroorganizme, nekatere pa jim pomagajo k boljši vitalnosti ali celo povzročijo razvoj odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (2, 3).



Slika 1: Nastanek biofilma. 1-začetno pritrjevanje mikroorganizmov, 2-ireverzibilno pritrjeni mikroorganizmi, 3-proliferacija, 4-dozorevanje biofilma, 5-razpršitev planktoničnih mikroorganizmov (4).

Mikroorganizmi, ki najpogosteje povzročajo težave, so: *Staphylococcus aureus*, koagulazno negativni stafilokoki, *Streptococcus species*, *Enterococcus species*, aerobni Gram negativni bacili in anaerobne bakterije. Zgodnje okužbe običajno povzročijo *S. aureus* ali aerobni Gram negativni bacili, zapoznele okužbe koagulazno negativni stafilokoki ali enterokoki, pozne pa so najpogosteje posledica okužbe na nekem drugem mestu, mikroorganizmi pa nato po krvi pridejo do vsadka; najpogosteje je povzročitelj *S. aureus* (2).

V sklopu diagnostike želimo ugotoviti, ali je vsadek okužen in, v primeru da je, kateri mikroorganizem povzroča okužbo in za katera zdravila je dovzeten. Opravimo lahko fizični pregled, periferne krvne teste, različne metode slikanja, analizo sinovijske tekočine ali periprostetičnega tkiva in molekularno diagnostiko (2).

1.2 Zdravljenje okužb

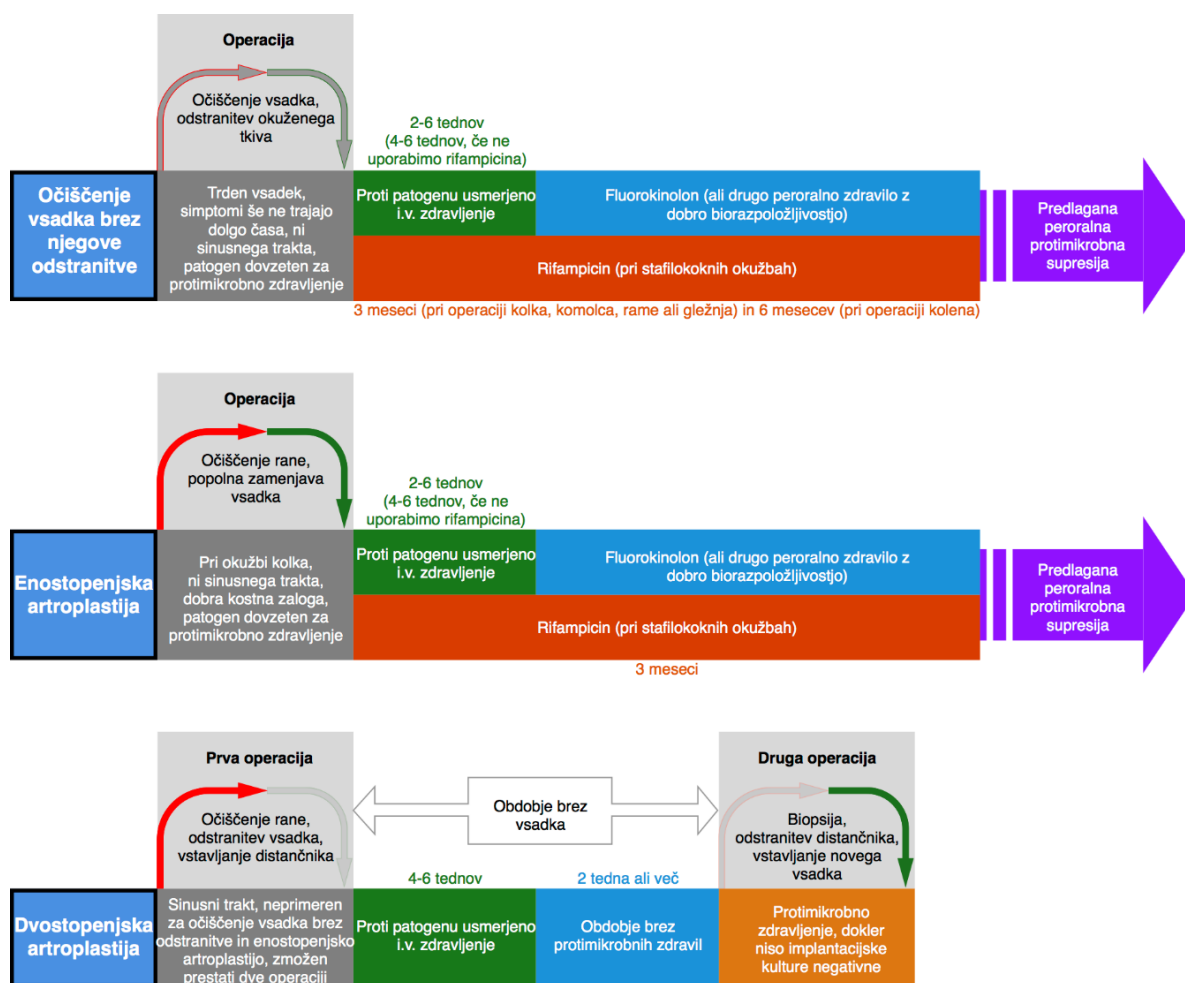
Okužbe, ki so povezane z ortopedskimi vsadki, se zaradi spremenjenega lokalnega imunskega odziva ne zdravijo spontano. Običajno je potrebno odstraniti vsadek ali vsaj okuženo okoliško tkivo in nadaljevati s protimikrobnim zdravljenjem (3). Cilji zdravljenja so odstraniti okužbo, obnoviti funkcionalnost sklepa, da omogočimo gibanje brez bolečin, poleg tega pa tudi zmanjšati obolevnost in smrtnost pri okužbah ortopedskih vsadkov (2, 5).

Pri izbiri zdravljenja je potrebno upoštevati kar nekaj kriterijev. Kadar je vsadek stabilen, simptomi še ne trajajo dolgo časa in je patogen dovzeten za številne protimikrobne učinkovine, se odločijo za očiščenje vsadka brez njegove odstranitve (3). Poteka tako, da se najprej odpre predel nad vsadkom, odstrani vse nekrotično in okuženo tkivo, hematome in gnoj, kvalitetno očisti in spere vsadek, nato pa rano zapre, iz nje pa pusti drenažo. Med procesom kirurg preveri tudi stabilnost vsadka in zamenja dele, pri katerih je to potrebno in mogoče (2).

Enostopenjsko artroplastiko opravijo pri pacientih, ki imajo rahlo okvarjeno mehko tkivo, njihova kostna gostota je ustrezna, patogen pa identificiran in odziven na protimikrobno zdravljenje. Pri tem posegu odstranijo vsadek, očistijo rano in takoj vstavijo nov vsadek (2, 3).

Za dvostopenjsko artroplastiko pa se lahko odločijo tudi kadar so povzročitelji okužbe odporni proti protimikrobnim učinkovinom (3). Opravijo dva kirurška posega, v prvem odstranijo vsadke in okuženo tkivo, naredijo tudi mikrobiološke kulture, da odkrijejo povzročitelja okužbe, nato pa na mesto vsadka namestijo distančnik, ki je lahko prevlečen s protimikrobnimi učinkovinami. Čez nekaj tednov, ko okužbe ne zaznajo več, opravijo še drugi poseg, med katerim vstavijo nov vsadek (2). Dvostopenjska artroplastika velja za najučinkovitejši kirurški postopek pri odstranjevanju okužbe in ohranitvi funkcije sklepa, vendar je povezana z dolgotrajnejšo imobilizacijo in okrevanjem, prav tako je povečana tudi možnost zapletov po posegu (6, 7).

Poleg kirurškega zdravljenja je pri okužbah vedno prisotno še protimikrobno zdravljenje. Ko ugotovijo, kateri patogen je odgovoren za okužbo, pripravijo zanj specifično zdravljenje. Prednostno izbirajo učinkovine, ki so manj toksične, bolj učinkovite in usmerjene proti povzročitelju. Pri vsakem kirurškem posegu je priporočena nekoliko spremenjena shema zdravljenja, kar je prikazano na sliki 2 (2).



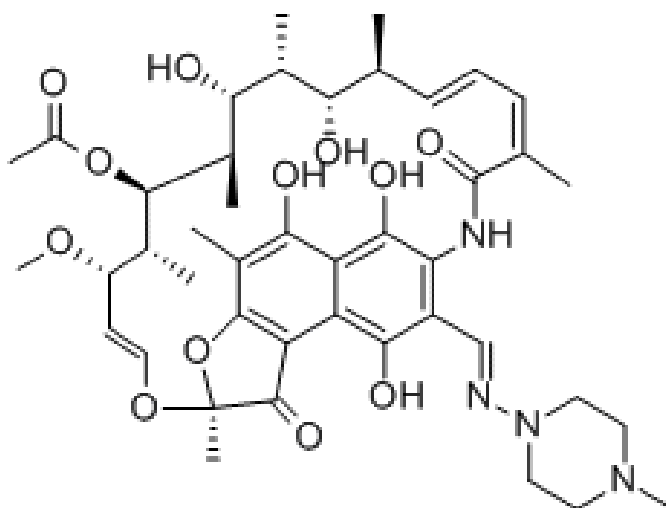
Slika 2: Shema zdravljenja okužbe endoproteze pri različnih kirurških posegih (prirejeno po (2)).

Kadar vsadek ostane v telesu in je povzročitelj okužbe eden izmed stafilokokov, kar se tudi najpogosteje zgodi, za zdravljenje uporabijo rifampicin, ki je primeren predvsem pri počasi rastočih mikroorganizmih in pri mikroorganizmih povezanih z biofilmi (6, 7). Poleg rifampicina pacient istočasno 2-6 tednov intravensko prejema proti patogenu usmerjeno protimikrobno zdravilo, nato pa do 3 mesece pri vsadku v kolku, rami, komolcu ali gležnju

in 6 mesecev pri vsadku v kolenu še peroralno enega izmed fluorokinolonov, najpogosteje ciprofloksacin (2, 5, 7). Pri odpornosti bakterij proti fluorokinolonom ali kadar jih pacient slabo prenaša, lahko dajo tudi fusidno kislino. Vedno pa se uporablja kombinirana terapija, saj se na tak način zmanjša možnost pojava odpornosti proti rifampicinu (2, 3, 5–8).

1.3 Rifampicin

Rifampicin je širokospektralni baktericidni antibiotik, ki deluje tako, da specifično inhibira bakterijsko od DNA odvisno RNA-polimerazo in tako zavre izražanje bakterijskih genov (9). Je polsintezni derivat rifamicina SV, ki so ga najprej izolirali iz bakterije *Streptomyces mediterranei*. Ameriška agencija za hrano in zdravila je njegovo uporabo odobrila leta 1971 in sicer za zdravljenje pacientov s tuberkulozo in asimptomatskih prenašalcev bakterije *Neisseria meningitidis* (10). Zaradi nizke toksičnosti so ga kmalu začeli uporabljati tudi za mnoga druga stanja, učinkovit je namreč proti večini Gram-pozitivnih in Gram-negativnih organizmov. Danes ga uporabljamo v kombinacijah za zdravljenje tuberkuloze, okužb in sumov na okužbo z *Neisseria meningitidis*, pri sumu na okužbo s *Haemophilus influenzae* tipa b, zdravljenje leprosijske, atipičnih netuberkuloznih okužb z mikobakterijo in okužb s *Staphylococcus species* (11). Zdravljenje v kombinacijah z drugimi protimikrobnimi zdravili je potrebno zato, ker bakterije v primeru monoterapije lahko hitro razvijejo odpornost. Odpornost je posledica sprememb v genu *rpoB*, ki kodira β -podenoto RNA-polimeraze (10).



Slika 3: Strukturna formula rifampicina (12).

Dobra lastnost antibiotika je, da ga lahko jemljemo peroralno, saj je stopnja absorpcije iz gastrointestinalnega trakta visoka, prav tako pa se zaradi svojih lipofilnih lastnosti dobro porazdeli po tkivih in telesnih tekočinah (13). To omogoča večjo učinkovitost, hkrati pa povzroči tudi obarvanje urina, blata, sputuma, pota in solz v rdeče-oranžni barvi, kar je eden izmed opaznejših stranskih učinkov. V prvem tednu jemanja se lahko pojavi tudi glavobol, omotica, motnje v koncentraciji, zmedenost, motnje vida, mišična šibkost, vročina, bolečine v mišicah in sklepih, najpogostejše pa so gastrointestinalne težave. Povzroči lahko dvig aktivnosti alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze in alkalne fosfataze ter dvig plazemskih koncentracij bilirubina, vendar se koncentracija bilirubina s časom normalizira. Uporabe v nosečnosti ne priporočamo, saj je teratogen in ga uvrščamo v skupino C, kamor spadajo učinkovine, pri katerih tveganje ni izključeno, vseeno pa se lahko uporablja, kadar so koristi zdravljenja večje od tveganja. Kadar se pojavita levkopenija ali trombocitopenija, je pacient bolj dovzeten za določene infekcije, zdravljenje se lahko upočasni, v ustni sluznici pa se pojavijo krvavitve. Možen je pojav hemolize, ki vodi v hemolitično anemijo, hemoglobinurije, hematurije in znižane serumske koncentracije hemoglobina. Pojavnost neželenih učinkov je večja pri aplikaciji zdravila manj kot dvakrat na teden ali pri odmerkih večjih od 1200 mg, ki povzročijo gripi podobno preobčutljivostno reakcijo (11).

1.3.1 Farmakokinetika rifampicina

Absorpcija rifampicina po per os aplikaciji je na splošno zelo dobra, najbolje prehaja v proksimalnem delu tankega črevesja preko organskih anionskih prenašalnih proteinov 1B1 (OATP1B1) in P-glikoproteina (P-gp) (14). Priporočeno je jemanje na prazen želodec, saj le tako omogočimo hitro in popolno absorpcijo učinkovine (10, 13–15). Koncentracija v plazmi doseže vrh dve uri po prejetem odmerku, razpolovni čas pa je dve do pet ur (10, 11, 13, 15, 16). Dobrih 80 % se ga veže na proteine, največ na albumine, nekaj pa tudi na γ -globuline in fibrinogen (10, 11, 13). Podvržen je enterohepatičnemu kroženju, kar omogoča daljše vzdrževanje terapevtskih koncentracij.

Presnova poteka v hepatocitih, kjer ga deacetilaze presnovijo do 25-*O*-deacetil-rifampicina, ki je mikrobiološko precej slabše učinkovit kot rifampicin. Presnovek se nato preko žolča izloči z blatom (13). V manjši meri nastajajo tudi 3-formil-rifampicin, kvinin-rifampicin, deacetil-rifampicin-kvinin in konjugati z glukuronsko kislino (13, 17).

1.3.1.1 Indukcija presnovnih encimov

Rifampicin je močan induktor citokromov P450, posebno še CYP3A4, ki se nahaja v jetrih, parenhimu gastrointestinalnega trakta in ledvic ter v prostati. Inducira tudi necitokromne encime, ki so odgovorni za presnovo učinkovin, zato moramo biti pri pacientih, ki sočasno jemljejo tudi druga zdravila, pozorni na morebitne interakcije. Pogoste so predvsem pri analgetikih, antidiabetkih, antiepileptikih, psihotropnih in protimikrobnih učinkovinah, hormonih, imunosupresivih, oralnih antikoagulantih in kardiovaskularnih učinkovinah. Ko pacient prične prejemati rifampicin, se novo ravnotežje pri omenjenih zdravilih vzpostavi po približno enem tednu jemanja, po končanju terapije z antibiotikom pa se stanje ponovno stabilizira v dveh tednih (18).

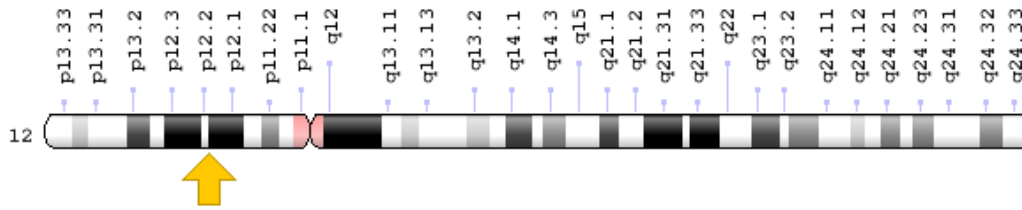
S CYP3A4 poteka tudi presnova samega rifampicina, zato pri ponavljajočih se aplikacijah zdravila zaznamo učinek avtoindukcije, ki ga vidimo preko zvišanih koncentracij izločenih presnovkov ali zmanjšane površine pod plazemsko krivuljo. Prve učinke avtoindukcije opazimo po šestih dneh, maksimalen učinek vidimo po enaindvajsetih dneh redne uporabe. Indukcijo povzroči pregnanski receptor X (PXR) (17, 18).

1.3.2 Farmakogenetika rifampicina

Rifampicin je pri nekaterih ljudeh manj učinkovit, kar je lahko posledica polimorfizmov. Kritične točke so predvsem na nivoju prenašalnih proteinov in encimov, ki presnavljajo učinkovino. Kot že omenjeno tu sodelujejo OATP1B1, ki ga kodira gen *SLCO1B1*, P-gp, ki ga kodira gen *ABCB1* in PXR, ki ga kodira gen *NR1I2*.

1.3.2.1 Gen *SLCO1B1*

Gen *SLCO1B1* (ang. Solute carrier organic anion transporter) se nahaja na dvanajstem kromosomu na kratki p ročici na lokaciji 12,1. Velik je 108,603 kb, orientiran pa na pozitivni verigi (19). Sestavlja ga 14 kodirajočih in 1 nekodirajoči ekson. Na nivoju mRNA se izraža predvsem v jetrih, manjše koncentracije pa so našli tudi v drugih tkivih, na primer v tankem črevesju (20).



Slika 4: Lokacija gena *SLCO1B1* (21).

OATP1B1 je eden izmed glavnih prenašalnih proteinov, ki se nahajajo na bazolateralni membrani hepatocitov in skrbijo za priliv snovi v celice. Sestavlja ga 691 aminokislin, ki tvorijo 12 transmembranskih domen. Njegova kristalna struktura še ni znana, predvidevajo pa, da so za prenos pomembne aminokislina arginin na mestu 57, lizin na mestu 361 in arginin na mestu 580. Tudi mehanizem prenosa ni povsem jasn; domnevajo, da je elektronevtralen in neodvisen od natrijevega, kloridnega in kalijevega gradienta, membranskega potenciala in količine ATP, substrati pa verjetno potujejo skozi pozitivno nabit centralni kanal, nekateri pa trdijo, da gre v primeru OATP za dvosmerni prenos, pri katerem naj bi v zamenjavo za substrat ven iz celice prenesel intracelularni bikarbonat (22).

Substrati za OATP so najpogosteje anionske amfifilne molekule z relativno molekulsko maso večjo od 350 Da in visoko stopnjo vezave na albumin pri fizioloških pogojih. Tako sodeluje pri hepatičnem privzemu mnogih endogenih substanc, kot so na primer žolčne kisline, konjugiran in nekonjugiran bilirubin, konjugirani steroidi, eikozanoidi in ščitnični hormoni, in privzemu zdravilnih učinkovin na primer inhibitorjev HMG-CoA reduktaze, ACE inhibitorjev, antagonistov angiotenzinskega II receptorja, diuretikov, antagonistov endotelnih receptorjev in nekaterih protimikrobnih, protirakavih in protivnetnih učinkovin.

Na aktivnost nekaterih predstavnikov iz naddružine OATP vpliva tudi sam rifampicin, ki v enkratnem odmerku povzroči močno inhibicijo OATP, pri kronični uporabi pa preko aktivacije jedrnega PXR pride do indukcije OATP (23).

1.3.2.1.1 Polimorfizmi v genu *SLCO1B1*

V kodirajočih regijah gena so odkrili veliko polimorfizmov, ki vplivajo na spremenjeno lokalizacijo in prenašalno funkcijo proteina (24). Na prenos rifampicina najbolj vplivajo polimorfizmi rs2306283, rs4149032, rs4149056 in rs11045819. Njihova pogostost pojavljanja v centralno evropski populaciji je prikazana v preglednici I.

Preglednica I: Pogostost pojavljanja posameznih alelov v genu *SLCO1B1* v centralno evropski populaciji (25).

Polimorfizem	Nemutiran alel	Mutiran alel
rs2306283	A 60 %	G 40 %
rs4149032	C 66 %	T 34 %
rs4149056	T 84 %	C 16 %
rs11045819	C 86 %	A 14 %

Polimorfizem rs2306283

Je eden najpogosteje preučevanih polimorfizmov v genu *SLCO1B1*. V DNA se nahaja na četrtem eksonu na mestu 388 in povzroči spremembo adenina v gvanin, na nivoju proteina pa ga najdemo na mestu 130, kjer spremeni aminokislino asparagin v aspartat (20, 26). Prisotnost gvanina povzroča predvsem spremenjeno farmakokinetiko statinov in doseganje nižjih maksimalnih koncentracij pri odmerku rifampicina (22, 27).

Polimorfizem rs4149032

Nahaja se v intronski regiji na mestu 85-7793, kjer povzroči spremembo citozina v timin. Pri afriških pacientih je povezan s slabšo biološko uporabnostjo rifampicina, pri indijskih pacientih vpliva polimorfizma niso našli, na ostalih populacijah pa še ni bilo opravljenih primernih študij (28, 29).

Polimorfizem rs4149056

Spada med boljše raziskane polimorfizme gena *SLCO1B1*. Nahaja se v petem eksonu, kjer na mestu 521 povzroči spremembo timina v citozin. Na nivoju proteina se sprememba izrazi kot prisotnost alanina namesto valina na mestu 174. Posledica polimorfizma je manjše izražanje OATP1B1 na membrani, v klinični študiji pa so ugotovili, da imajo novorojenčki s prisotnostjo citozina večje tveganje za razvoj resne hiperbilirubinemije (22). Serumski bilirubin je zvišan tudi pri odraslih, vendar se simptomi običajno ne izrazijo, poleg tega pa se lahko dvignejo tudi serumske koncentracije tiroksina in estron-3-sulfata. Kot posledica zmanjšane prenašalne aktivnosti OATP1B1 se zvišajo koncentracije mnogih učinkovin v krvi, med drugimi tudi rifampicina, metotreksata, nekaterih antidiabetikov, HIV proteaznih inhibitorjev in statinov. Pri uporabi statinov se posledično poveča tveganje za razvoj miopatije (20, 22). Razpolovni čas rifampicina ostaja pri enem odmerku nespremenjen ne

glede na genotip, pri ponavljajočih se odmerkih pa se pri prisotnosti citozina podaljša (23). Rifampicin pri prisotnosti polimorfizma povezujejo tudi s pogostejšimi poškodbami jeter, ki so posledica zdravil (30).

Polimorfizem rs11045819

Polimorfizem rs11045819 se prav tako kot polimorfizem rs2306283 nahaja v četrtem eksonu, kjer povzroči spremembo citozina v adenina na mestu 463 oziroma na mestu 155 v proteinu, kjer se namesto prolina nahaja treonin. Posledica prisotnosti adenina je manjša izpostavljenost rifampicinu, kar je najbolj opazno dve uri po administraciji zdravila, ko doseže maksimalno koncentracijo. Se pa ta sprememba pogosteje pojavlja pri afričanih kot pri belcih (20, 23, 27, 28).

Haplotipi

Polimorfizma rs2306283 in rs4149056 tvorita 4 haplotipe, ki so prikazani v preglednici II.

Preglednica II: Prikaz haplotipov polimorfizmov rs2306283 in rs4149056 (20).

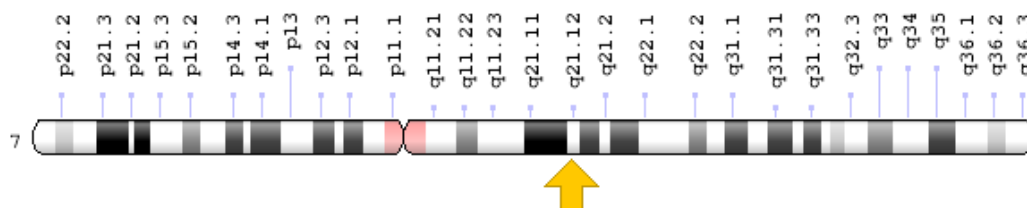
Ime haplotipa	Spremembe, ki so vključene v haplotip
<i>SLCO1B1*1A</i>	c.388A-c.521T
<i>SLCO1B1*1B</i>	c.388G-c.521T
<i>SLCO1B1*5</i>	c.388A-c.521C
<i>SLCO1B1*15</i>	c.388G-c.521C

Iz študij, ki so preiskovale haplotip *SLCO1B1*1B*, ni mogoče zaključiti, kakšen vpliv ima ta haplotip, saj so nekatere odkrile povečano, druge zmanjšano aktivnost OATP, v nekaterih pa spremenjene prenašalne aktivnosti niso zaznali. Haplotip *SLCO1B1*15* pa je vedno povezan z zmanjšano prenašalno aktivnostjo (20). Tako je odgovoren za zmanjšan privzem žolčnih kislin, v povezavi z rifampicinom pa pomeni večje tveganje za poškodbe jeter (30).

1.3.2.2 Gen *ABCB1*

Gen *ABCB1* (ang. ATP binding cassette subfamily B member 1) se nahaja na sedmem kromosomu na dolgi q ročici na mestu 21,12. Velik je 210 kb, orientiran pa na negativni verigi (19). Sestavlja ga 29 eksonov (26). Izraža se v šestinastih membranah zrelih enterocitov, kanalikularnih membranah hepatocitov, šestinastih membranah proksimalnih

jetrnih tubularnih celic, na luminalni strani endotelnih celic možganskih kapilar in v tumorskih celicah (31).



Slika 5: Lokacija gena *ABCB1* (21).

Kodira P-gp, ki je najbolj preučevan ATP – vezoč kasetni prenašalec in deluje kot biološka ovira, ki z aktivnim prenosom izloča ksenobiotike iz celic. Glede na lokacijo izražanja sodeluje pri absorpciji, porazdelitvi ali izločanju substratov iz telesa (32, 33).

Sestavlja ga 1280 aminokislin, molekulska masa pa je 141,479 kDa (19). Funkcionalen protein je sestavljen iz ene polipeptidne verige, ki tvori dve enoti, vsaka vsebuje nukleotid vezočo domeno in transmembransko domeno, ki obsega 6 hidrofobnih heliksov. Energijo, ki je potrebna za prenos substrata proti koncentracijskemu gradientu, pridobi iz hidrolize ATP, ki poteče na nukleotid vezoči domeni. Njegovi substrati so zelo raznoliki, skupno jim je le to, da so hidrofobni, veliki 300 do 2000 Da in je njihov naboj pri nevtralnem pH pri večini pozitiven (34, 35).

P-gp označujemo tudi s kratico MDR1 (ang. Multidrug resistance protein 1), saj sodeluje pri razvoju odpornosti rakavih celic na raznolike kemoterapevtike. Tako lahko poslabša izide zdravljenja predvsem akutne levkemije, raka na dojkah, jajčnikih, glavi in vratu ter ne-Hodgkinovega limfoma. Večje izražanje namreč povzroči pospešeno izločanje učinkovin iz celic, kar onemogoči njihovo popolno delovanje (34, 35).

1.3.2.2.1 Polimorfizmi v genu *ABCB1*

Nivo izražanja P-gp se med posamezniki lahko močno razlikuje, kar je posledica genetskih in okoljskih dejavnikov. Kadar se izražanje prenašalca zniža, se koncentracije substratov v krvi zvišajo. S koncentracijo rifampicina v krvi povezujemo polimorfizem rs1045642, njegova pogostost pojavljanja v centralno evropski populaciji pa je prikazana v preglednici III.

Preglednica III: Pogostost pojavljanja posameznih alelov v genu *ABCB1* v centralno evropski populaciji (25).

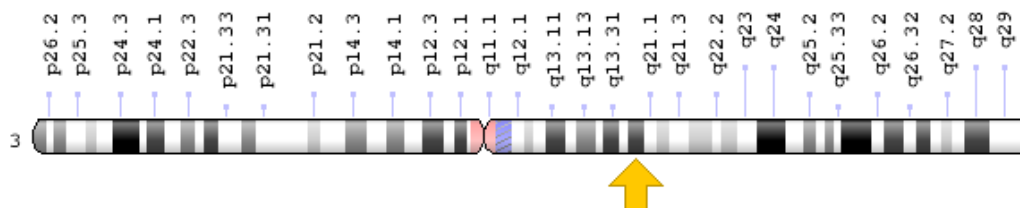
Polimorfizem	Nemutiran alel	Mutiran alel
rs1045642	C 57 %	T 43 %

Polimorfizem rs1045642

Polimorfizem se nahaja v šestindvajsetem eksonu na mestu c.3435, kjer povzroči spremembo citozina v timin. V proteinu na mestu 145 pride do tihe mutacije in tako ostaja aminokislina izolevcin nespremenjena, izražanje P-gp pa se spremeni. Posledica polimorfizma je tako nižje izražanje P-gp v črevesju, in zvišane koncentracije rifampicina v krvi. Povezava med spremembo v DNA in izražanjem prenašalnega proteina še ni povsem jasna, postavili pa so 4 teorije. Po prvi se citozin oziroma timin nahaja na nestabilnem mestu, po drugi tiha mutacija v *ABCB1* zmanjša učinkovitost translacije, tretja teorija govori o spremenjenem translacijskem procesu na nivoju mRNA, četrta pa o obstoju posttranskripcijskih modifikacij (31, 33).

1.3.2.3 Gen *NR1I2*

Gen *NR1I2* (ang. Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2) se nahaja na tretjem kromosomu na dolgi q ročici na mestu 13,33, velik je 38 kb in je orientiran na pozitivni verigi (19). Sestavlja ga 10 eksonov. Izraža se predvsem v jetrih, v manjši meri pa tudi v tankem in debelem črevesju.

Slika 6: Lokacija gena *NR1I2* (prirejeno po (21)).

Kodira protein PXR, ki je pomemben element obrambnega mehanizma našega telesa proti toksičnim snovem, saj uravnava delovanje mnogih genov, ki sodelujejo pri presnovi

ksenobiotikov. Kljub temu, da se je razvil za zaščito telesa, pa njegova aktivacija lahko predstavlja mehanizem za različne interakcije med zdravili (36).

Sestavlja ga 434 aminokislin, njegova molekulska masa pa je 49,762 kDa (19). Uvrščamo ga med jedrne hormonske receptorje, ki poleg uravnavanja transkripcije genov, ki so pomembni za presnovo ksenobiotikov in raznih endogenih snovi, sodelujejo tudi pri vitalnih celičnih procesih, kot na primer pri celični rasti in diferenciaciji, kondenzaciji kromatina, utišanju genov in fiziološki homeostazi. Pomembne strukturne enote vseh jedrnih receptorjev so ligand vezoča domena, DNA vezoča domena, in dve transaktivacijski domeni. Ligand vezoča domena ima pomembno vlogo pri vezavi lipofilnih ligandov na jedrni receptor, s čimer uravnava aktivnost jedrnega receptorja, DNA vezoča domena pa je odgovorna za vezavo na tarčne gene. Vezava liganda inducira konformacijsko spremembo znotraj ligand vezoče domene, pri čemer sodeluje tudi transaktivacijska domena 2, te konformacijske spremembe pa omogočajo transkripcijsko uravnavanje tarčnih genov (37).

PXR ima v vezavnem mestu velik žep, ki omogoča interakcije z velikim številom hidrofobnih molekul z molekulska masa med 250 in 850 kDa. Ob aktivaciji tvori heterodimer z receptorjem za retinojsko kislino, nato pa se veže na promotor ali ojačevalec tarčnega gena. Posledica je njihova transkripcijska aktivnost. Tarčni geni, kot že omenjeno, v glavnem sodelujejo pri celičnem odzivu na ksenobiotike, saj se aktivira transkripcija genov, ki kodirajo encime presnove prve stopnje, predvsem oksidaze, kot so CYP3A4, CYP3A5, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP4F12, aldo-keto reduktaze in karboksilesteraze, encime presnove druge stopnje kot se glukuronidaze UGT1A1, karboksilesteraze, sulfotransferaze in glutation-S-transferaze, in genov, ki kodirajo prenašalne proteine, na primer MDR1, OATP1, OATP2, MRP2. PXR je posledično vpleten v detoksifikacijo žolčnih kislin, očistek bilirubina, homeostazo steroidov, presnovo lipidov, homeostazo kosti, presnovo retinojske kisline in velikega števila rastlinskih ksenobiotikov, na primer hiperforina, in zdravilnih učinkovin, na primer rifampicina in tamoksifena. Kljub temu, da so ugotovili, da ga aktivira kar nekaj različnih ligandov, ga še vedno uvrščamo med jedrne receptorje sirote (37, 38).

1.3.2.3.1 Polimorfizmi v genu *NR1I2*

Genske variacije v genu *NR1I2* lahko vplivajo na veliko fizioloških poti in spremenijo farmakokinetiko mnogih zdravilnih učinkovin. Njihova posledica so lahko jetrna fibroza, steatoza in vnetje ali vnetna črevesna bolezen (38). Polimorfizmi, ki vplivajo na spremenjeno

farmakokinetiko rifampicina v telesu so rs3814055, rs2276707, rs6785049, rs7643645 in rs2472677. Njihova pogostost pojavljanja v centralno evropski populaciji je prikazana v preglednici IV.

Preglednica IV: Pogostost pojavljanja posameznih alelov v genu NR1I2 v centralno evropski populaciji (25).

Polimorfizem	Nemutiran alel	Mutiran alel
rs3814055	C 63 %	T 37 %
rs2276707	C 83 %	T 17 %
rs6785049	G 38 %	A 62 %
rs7643645	A 66 %	G 34 %
rs2472677	C 34 %	T 66 %

Polimorfizem rs3814055

Nahaja se v neprevedenem delu promotornega mesta 5705, kjer se citozin spremeni v timin. Povezan je z večjo pojavnostjo vnetne črevesne bolezni, Crohnove bolezni, ulceroznega kolitisa in nealkoholno maščobno jetrno boleznijo. Poveča biološko uporabnost ciklosporinov, zmanjša aktivnost PXR pri moških, poleg tega pa vpliva tudi na aktivnost CYP3A4 in sicer ga predvsem v prisotnosti rifampicina inducira (37–39).

Polimorfizem rs2276707

Nahaja se v šestem intronu na mestu g.8055, kjer povzroči spremembo citozina v timin. Povezujejo ga s pojavom Crohnove bolezni, ulceroznega kolitisa in raka na dojkah, povezali pa so ga tudi s spremenjeno aktivnostjo CYP3A4, saj prisotnost vsaj enega timina po jemanju rifampicina inducira dvakrat povečano izražanje črevesnih CYP3A4 glede na nemutirane homozigote (40). Vpliva na večjo biološko razpoložljivost ciklosporinov in povečano transkripcijsko aktivnost *NR1I2* (37, 38, 41).

Polimorfizem rs6785049

Lociran je v petem intronu na mestu g.7635, kjer povzroči spremembo gvanina v adenin. Pri prisotnosti gvanina so zaznali zmanjšano delovanje PXR in večjo stopnjo indukcije črevesnega CYP3A, ki jo je povzročil rifampicin (40). Večja je tudi pojavnost vnetne črevesne bolezni, Crohnove bolezni, ulceroznega kolitisa, nealkoholne maščobne jetrne bolezni, Barretovega ezofagusa in raka na dojkah (38, 40–42).

Polimorfizem rs7643645

Polimorfizem se nahaja v prvem intronu na mestu 69789, kjer povzroči spremembo adenina v gvanin. Povezujejo ga z indukcijo CYP3A, nižjo jetrno ekspresijo CYP3A4 in PXR, zmanjšanim izražanjem MDR1 mRNA in nealkoholno maščobno jetrno boleznijo (38, 39).

Polimorfizem rs2472677

Nahaja se v prvem intronu na mestu 63396, kjer povzroči spremembo citozina v timin. Vpliva na večji očistek atazanavira pri zdravljenju aktiviranega imunskega deficitnega sindroma, povečano aktivnost ter indukcijo CYP3A4 z rifampicinom in koncentracije mRNA za PXR, CYP3A4 in MDR1 (37–39).

Haplotipi

V genu NR1I2 so raziskovali že več možnih haplotipov. Pomembnejšega sestavljajo polimorfizmi rs3814055, rs6785049 in rs2276707, ki tvorijo osem haplotipov: CAC, CGT, TGT, TAC, CGC, TGC, CAT, in TAT. V študijah paciente pogosto delijo na TGT prenašalce in TGT neprenašalce, saj so v tem primeru odkrili največje spremembe v delovanju PXR (41, 42).

Med izbranimi polimorfizmi so odkrili povezavo tudi med: rs6785049 in rs2276707 ter rs2472677 in rs2276707 (37, 41–43).

2 Namen dela

Uporaba ortopedskih endoprotez je vedno pogostejša, saj ljudem z okvaro sklepa zmanjša ali celo odstrani bolečine in obnovi njegovo funkcionalnost, kar močno izboljša kakovost življenja. Upoštevanju vseh smernic dobre prakse navkljub pa včasih pride do okužbe ob vsadku, ki jo je potrebno čim hitreje odstraniti. Poleg kirurških posegov se vedno poslužujemo še protimikrobnega zdravljenja, ki ga predstavlja kombinirana protimikrobna terapija, ki jo sestavljata proti povzročitelju okužbe usmerjeno protimikrobno zdravilo in rifampicin.

Rifampicin je širokospektralni baktericiden antibiotik, ki inhibira bakterijsko od DNA odvisno RNA – polimerazo. Za doseganje baktericidnega učinka so na podlagi študij določili odmerke po 450 mg vsakih 12 ur, kar pa ni zagotovilo željenega učinka pri vseh pacientih. Namen magistrske naloge bo ugotoviti, ali polimorfizmi v genih, ki so vpleteni v farmakokinetiko rifampicina, pomembno vplivajo na njegove farmakokinetične parametre. S tem namenom bomo:

- Izbrali 10 najpomembnejših polimorfizmov glede na podatke iz objavljenih študij v genih *SLCO1B1*, *ABCB1* in *NR1H2*.
- Izolirali DNA iz krvnih celic pacientov z okužbo ortopedske endoproteze, zdravljenih z rifampicinom, s pomočjo FlexiGene® DNA Kita.
- Na pridobljenih vzorcih DNA izvedli genotipizacijo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času in detekcije po principu hidrolizirajočih sond.
- Pridobljene podatke uporabili za določanje haplotipov s programom PHASE in za ugotavljanje vpliva polimorfizmov in haplotipov na koncentracijo, očistek, porazdelitveni volumen in razpolovni čas s programom IBM SPSS statistics 22.

Naša hipoteza je, da izbrani polimorfizmi vplivajo na koncentracijo rifampicina v krvi, na njegov volumen porazdelitve, očistek in razpolovni čas.

3 Materiali in metode

3.1 Preiskovanci in protokol raziskave

V študijo (številka odobritve Komisije za medicinsko etiko: 48/06/11, izdana dne 5.1.2012) so bili vključeni pacienti, z ortopedskimi endoprotezami, na katerih je prišlo do okužbe, od tega je 25 pacientov imelo totalno endoprotezo kolka, 22 pacientov totalno endoprotezo kolena, 2 endoprotezo medvretenčne ploščice, 2 pacienta endoprotezo sprednje križne vezi, po en pacient pa je imel totalno endoprotezo gležnja in komolca ter endoprotezo golenice. Diagnozo so jim postavili na podlagi klinične slike ter mikrobioloških, citoloških in histoloških preiskav. Najpogostejše so bile stafilokokne okužbe, od tega je 33 pacientov okužbo imelo prvič, pri 20 pacientih pa se je ponovila. Povprečen indeks telesne mase je bil $28,82 \text{ kg/m}^2$, najnižji $20,00 \text{ kg/m}^2$, najvišji pa $41,78 \text{ kg/m}^2$.

Vsi pacienti so prejeli rifampicin v odmerku 450 mg vsakih 12 ur. Kri so jim odvzeli na tešče v različnih časovnih točkah v epruvete z antikoagantom EDTA, za poenotenje pogojev pa smo uporabili vzorce, ki so bili odvzeti tretji dan in po tridesetem dnevu od pričetka jemanja zdravila ob deseti uri dopoldne. S centrifugiranjem so ločili krvne celice od plazme in plazmo uporabili za farmakokinetične študije, iz krvnih celic pa smo izolirali DNA s pomočjo FlexiGene[®] DNA Kita. Glede na že objavljeno literaturo o vplivu polimorfizmov na farmakokinetiko rifampicina smo izbrali 10 polimorfizmov. Genotipizacijo smo opravili z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času z uporabo hidrolizirajočih sond. Nato smo s pomočjo statističnega orodja SPSS ugotavljali povezave med genotipi in sledečimi farmakokinetičnimi parametri: koncentracijo rifampicina v plazmi tretji dan in koncentracijo vsaj trideset dni po pričetku terapije, očistkom v obeh časovnih točkah, volumnom porazdelitve in razpolovnem času. Koncentracije so izmerili s pomočjo tekočinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo, ostale parametre pa so pridobili s pomočjo farmakokinetičnega modela. Poleg aditivnega modela smo uporabili tudi recisivni in dominantni model za ugotavljanje vpliva polimorfizmov na omenjene farmakokinetične parametre in vpliv haplotipov na le-te.

3.2 Uporabljeni reagenti in aparature

Uporabljeni reagenti:

- 70 % etanol,
- 3 % natrijev hipoklorit,

- FlexiGene[®] DNA Kit: pufer FG1 (pufer za lizo), pufer FG2 (pufer za denaturacijo), pufer FG3 (pufer za hidracijo) in proteinaza QIAGEN[®] (QIAGEN[®]),
- 100 % izopropanol,
- avtoklavirana ultra čista voda,
- reagenčni kompleti oligonukleotidnih začetnikov in sond za naslednjih 10 polimorfizmov (Thermo Fisher):
 - rs2306283: C__1901697_20
 - rs4149032: C__1901709_10
 - rs4149056: C__30633906_10
 - rs11045819: 0197493806
 - rs1045642: C__7586657_20
 - rs3814055: C__27504984_30
 - rs2276707: C__15882324_10
 - rs6785049: C__29280426_10
 - rs7643645: C__1834250_10
 - rs2472677: C__26079845_10
- TaqMan Genotyping Master Mix (Thermo Fisher)

Uporabljene aparature in pribor:

- nitrilne rokavice,
- avtoklav,
- sušilnik,
- zamrzovalna omara,
- hladilnik,
- aparatura za pridobivanje ultračiste vode,
- vodna kopel,
- centrifuga Centrifuge 5804 R (Eppendorf),
- centrifuga Centrifuge 5415 R (Eppendorf),
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica),
- vrtinčasto mešalo Mini centrifuge NG0023 (Kemomed) ,
- polavtomatske pipete 0,1-2,5 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L (Eppendorf), 500-5000 μ L (Biohit),

- škatle za avtoklavirane nastavke za pipete,
- kozarci za avtoklavirane plastične epruvetke s pokrovčkom,
- nastavki za pipete (10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, 5 mL),
- plastične epruvetke s pokrovčkom (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL),
- sterilne centrifugirke (15 mL, 50 mL),
- stojalo za centrifugirke,
- stojalo za epruvetke s pokrovčkom,
- sterilne vatrane palčke,
- brisačke,
- NanoDrop[®] Spectrophotometer ND-1000,
- papir za čiščenje glave na Nanodrop napravi,
- računalnik,
- analizator LightCycler[®] 480 II (Roche),
- delovna komora DNA/RNA UV-CLEAR UVT-S-AR (Biosan),
- UV – svetilka,
- mikrotitrna ploščica s 384 vdolbinami,
- folija za mikrotitrsko ploščico,
- ploščica za pritrditev folije na mikrotitrsko ploščico,

3.3 Izolacija DNA

3.3.1 FlexiGene[®] DNA Kit

Za izolacijo DNA smo uporabili FlexiGene[®] DNA Kit, ki vsebuje lizirni pufer FG1, denuracijski pufer FG2, hidratijski pufer FG3 in proteinazo QIAGEN[®]. Z lizirnim pufrom smo povzročili lizo krvnih celic in v peletki dobili celična jedra in mitohondrije, ki smo jih nato resuspenzirali v denuracijskem pufru s proteinazo. S proteinazo in kaotropnimi solmi iz denuracijskega pufra smo odstranili proteine, DNA pa smo oborili z izopropanolom. Sledilo je čiščenje DNA, njeno sušenje in raztapljanje v hidratijskem pufru (44).

Za ta postopek smo se odločili, ker izolacija ves čas poteka v eni centrifugirki, kar zmanjša možnost napake in količino odpadkov, poleg tega pa omogoča izolacijo tako iz polne krvi kot tudi iz levkocitov ali kultiviranih celic. Postopek je enostaven in hiter, pridobljena DNA pa visoke koncentracije in ustrezne čistosti.

Naši vzorci so bile epruvete s krvnimi celicami, saj je bila krvna plazma predhodno odstranjena za namene farmakokinetičnih analiz. Glede na podatke predhodnih raziskav smo se odločili, da bomo krvnim celicam dodali avtoklavirano ultra čisto vodo, ki je v analizi nadomestila predhodno odstranjeno krvno plazmo (45).

Sledili smo naslednjemu protokolu:

Pred izolacijo:

- Avtoklavirali smo vso potrebno plastikovino ter počakali, da se ohladi in posuši.
- S 70 % etanolom smo očistili delovne površine in vse pripomočke, ki smo jih za izolacijo potrebovali.
- Proteazo smo raztopili v pufru FG3 – v vialo s proteinazo smo po navodilih dodali 1,4 mL pufru FG3, dobro premešali in pred uporabo počakali vsaj 30 minut, da se je popolnoma raztopila (44). Raztopljeno proteinazo smo shranjevali v hladilniku.
- Zamrznjene vzorce smo za 10 minut postavili v vodno kopel na 37 °C, da so se odtalili. Med tem smo si pripravili potrebne epruvetke s pokrovčkom in sterilne centrifugirke in jih označili s številkami vzorcev, iz katerih smo izolirali DNA. Pripravili smo tudi nastavke za pipete. Nastavke in epruvetke s pokrovčkom smo predhodno avtoklavirali pri 121 °C in 1 baru nadtlaka.
- Izračunali smo volumne za pripravo mešanice pufru FG2 in raztopljene proteinaze. Za vsak mililiter krvi smo potrebovali 500 µL pufru FG2 in 5 µL raztopljene proteinaze. Sočasno smo izolirali DNA iz 6-ih vzorcev.

Izolacija:

- V označeno epruvetko s pokrovčkom smo odpipetirali 900 µL krvnih celic in dodali 600 µL ultra čiste vode. Nato smo premešali, da smo homogenizirali vzorec.
- V označeno centrifugirko smo odpipetirali 3250 µL pufru FG1, dodali 1300 µL homogeniziranega vzorca in petkrat premešali z intenzivnim obračanjem v rokah.
- Pripravljeno mešanico smo 9 minut centrifugirali pri 4 °C na 2500 x g.
- Med tem smo pripravili mešanico pufru FG2 in proteinaze. Pripravili smo jo lahko največ 1 uro pred uporabo.
- Po centrifugiranju smo supernatant previdno odlili in centrifugirke obrnjene navzdol položili na brisačke za 2 minuti.

- Nastali peleti smo dodali mešanico pufra FG2 in proteinaze (650 μ L / 6,5 μ L) in takoj dobro premešali na največji hitrosti na vorteksu, da se je peleta popolnoma homogenizirala.
- Nato smo centrifugirko trikrat obrnili v rokah in vsaj 10 minut inkubirali v vodni kopeli na 65 °C, da se je barva spremenila v zeleno.
- Dodali smo 650 μ L 100 % izopropanola in centrifugirko v rokah nežno obračali 20 – 40-krat, dokler se DNA ni oborila.
- Centrifugirali smo 6 minut pri 4 °C na 2500 x g.
- Po centrifugiranju smo supernatant previdno odlili.
- Peleti smo dodali 650 μ L 70 % etanola in dobro premešali na najmanjši hitrosti na vorteksu, da se je peleta odlepila od stene centrifugirke.
- Centrifugirali smo 6 minut pri 4 °C na 2500 x g.
- Po centrifugiranju smo supernatant previdno odlili.
- Notranjost centrifugirke smo previdno obrisali z vatirano palčko (pazili smo, da se nismo dotaknili DNA), nato smo centrifugirko obrnjeno navzdol za 10 minut položili na brisačko, da je odtekel in izhlapel ves etanol.
- Dodali smo 300 μ L pufra FG3 in dobro premešali na najmanjši hitrosti na vorteksu, da se je peleta odlepila s stene.
- Čez noč smo inkubirali v vodni kopeli pri 65 °C. Če se DNA ni raztopila, smo še nekaj dni pustili v temi pri sobni temperaturi.
- Ko je bila peleta raztopljena, smo 3 minute centrifugirali pri 4 °C na 2500 x g in nato prepipetirali v 0,5 mL epruvice s pokrovčkom.
- Epruvetke s pokrovčkom smo shranili v ustrezni škatli v hladilniku.

Po izolaciji:

- S 70 % etanolom smo očistili delovne površine in vse pripomočke, ki smo jih za izolacijo potrebovali.

3.3.2 QIAamp DNA mini kit

Nekaterih vzorcev z zgornjim postopkom ni bilo mogoče izolirati, saj se DNA ni oborila. Takrat smo uporabili reagenčni komplet QIAamp DNA mini kit, ki vsebuje lizirni puffer AL, pufra za čiščenje DNA AW1 in AW2, elucijski puffer AE, proteinazo QIAGEN in topilo za proteinazo. V eni stopnji smo z lizirnim pufrom lizirali krvne celice, s proteinazo pa

odstranili proteinske nečistote in nato vso reakcijsko zmes prenesli v epruvetko s kolono, v kateri se je na silikagel vezala DNA. DNA smo očistili s pufrom AW1, ki s svojo nizko koncentracijo kaotropnih soli odstrani preostale proteine in obarvane komponente, in pufrom AW2, ki vsebuje visoke koncentracije etanola, da odstrani ostanke soli. Sledilo je raztapljanje DNA v elucijskem pufru.

Prednost te metode je, da omogoča izolacijo iz manjšega volumna krvi, so pa posledično tudi končne koncentracije izolirane DNA precej manjše. Poleg manjšega začetnega volumna je dobra lastnost te metode tudi manjša poraba reagentov in plastikovine ter hitrejša izvedba izolacije (46).

Pri analizi smo sledili naslednjemu postopku:

- Pipetirali smo 20 μL Qiagen proteinaze na dno 1,5 mL epruvetke s pokrovčkom.
- Dodali smo 200 μL vzorca in 200 μL pufru AL, 15 s mešali na vrtničastem mešalu in na kratko centrifugirali.
- 10 minut smo inkubirali pri 56 °C in na kratko centrifugirali.
- Celotno mešanico smo prepipetirali v priloženo 2 mL epruvetko s kolono in 1 minuto centrifugirali na 6000 x g. Kolono smo prestavili v novo 2 mL plastično epruvetko.
- Na kolono smo dodali 500 μL pufru AW1 in 1 minuto centrifugirali pri 6000 x g. Kolono smo prestavili v čisto 2 mL plastično epruvetko, prejšnjo pa zavrgli.
- Na kolono smo dodali še 500 μL pufru AW2 in 3 minute centrifugirali na 20000 x g.
- Kolono smo prestavili v 1,5 mL plastično epruvetko s pokrovčkom in dodali 200 μL avtoklavirane ultra čiste vode.
- Pri sobni temperaturi smo inkubirali 1 minuto in nato 3 minute centrifugirali na 6000 x g.
- Pridobljene vzorce z izolirano DNA smo nato do nadaljnje obravnave shranili v hladilniku.

3.4 Določanje koncentracije in čistosti izolirane DNA

Vsakemu vzorcu smo izmerili koncentracijo, da smo lahko pripravili ustrezne redčitve za izvedbo reakcije PCR. S podatki o čistosti smo sami preverjali kvaliteto svojega dela med izolacijo in predvideli morebitne težave pri reakcijah PCR.

Koncentracijo in čistost izolirane DNA smo določili s spektrofotometrom NanoDrop® 1000. Nanodrop je spektrofotometer, ki na podlagi izmerjene absorbance in ustreznih nastavitvev

poda željene kvantitativne informacije o vzorcu. Čistost smo tako preverjali z razmerjem absorbanca pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm ter z razmerjem pri valovnih dolžinah 260 in 230 nm. Z razmerjem 260/280 se želimo približati vrednosti 1,8, drugačno razmerje pa je lahko posledica prisotnosti proteinov. Z razmerjem 260/230 želimo doseči vrednosti blizu 2,0, odstopanja pa so lahko posledica prisotnosti ostankov topil, ki smo jih uporabili pri izolaciji.

Uporabili smo naslednji postopek:

- Odprli smo program Nanodrop in izbrali možnost *Nucleic Acids*.
- Na glavo na nanodropu smo odpipetirali ultra čisto vodo.
- Preverili smo, da smo imeli izbrane analize za DNA in ne RNA.
- Glavo na nanodropu smo nežno obrisali in odpipetirali pufer FG3, v programu pa izbrali možnost *Blank*.
- Glavo smo obrisali in odpipetirali prvi vzorec, v program vpisali ime vzorca in izvedli meritev. Ta korak smo ponovili za vsak vzorec posebej.
- Ob koncu meritev smo ponovno odpipetirali ultra čisto vodo in obrisali glavo, da smo jo očistili.
- Pridobljene rezultate smo izvozili v tekstovno datoteko.

Iz izmerjenih koncentracij smo pripravili izračune volumnov za nadaljnja redčenja. Redčili smo v dveh stopnjah, najprej v plastične epruvetke s pokrovčkom na koncentracijo 50 ng/μL, nato pa v mikrotitrsko ploščico na koncentracijo 10 ng/μL. Za redčenje smo uporabili avtoklavirano ultra čisto vodo.

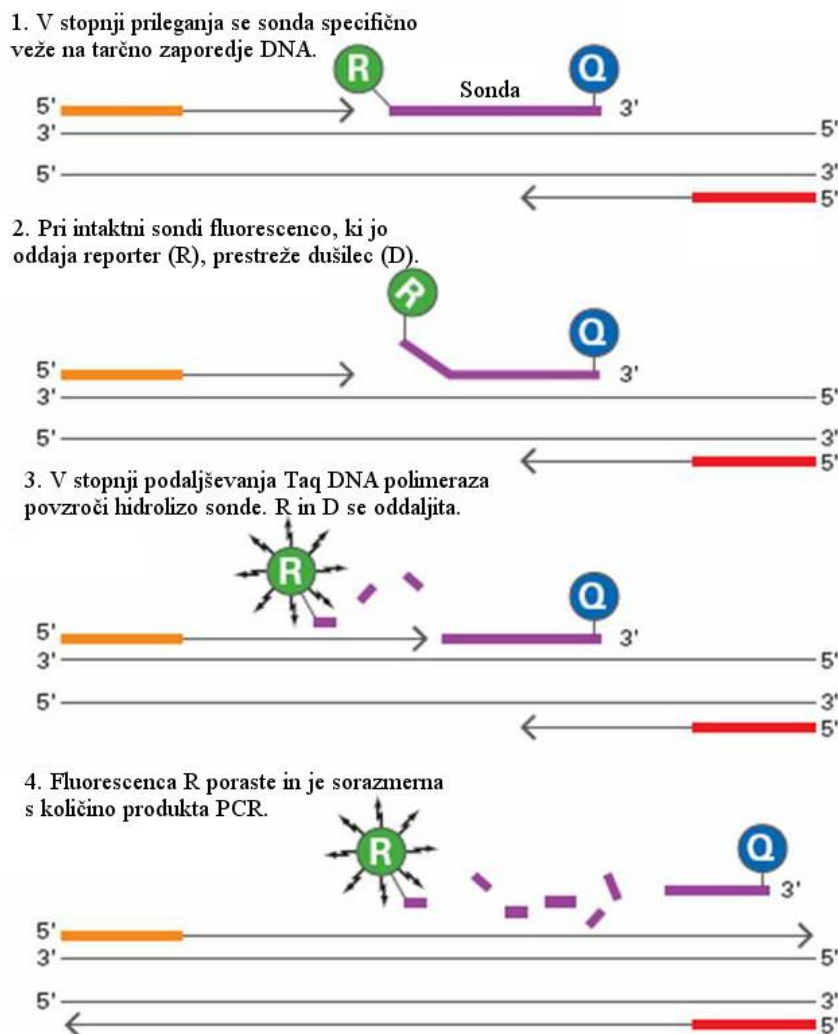
3.5 Genotipizacija z uporabo hidrolizirajočih sond

Verižna reakcija s polimerazo je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin. Omogoča pridobitev velikega števila kopij DNA iz majhne količine matrične DNA v relativno kratkem času. Za izvedbo reakcije potrebujemo matrično DNA, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, deoksinukleozid-trifosfate, ki bodo gradniki kopij DNA, termostabilno DNA – polimerazo, ione Mg²⁺, ki delujejo kot kofaktor termostabilne DNA – polimeraze, in reakcijski pufer, ki zagotovi ustrezne pogoje za optimalno delovanje encima.

Reakcija poteka v treh stopnjah, začne se z začetno denaturacijo, sledi pomnoževanje matrične DNA, zaključi pa se z zaključnim podaljševanjem. Druga stopnja je sestavljena iz

treh stopenj, ki se ciklično ponavljajo – običajno izvedemo 20 – 40 ciklov. Prva stopnja je denaturacija, kjer s segrevanjem na 94 – 95 °C razklenemo dvoverižno DNA, da dobimo dve enoverižni DNA. Druga stopnja je znižanje temperature na 40 – 60 °C, s čimer dosežemo prileganje oligonukleotidnih začetnikov na enoverižne DNA. V tretji stopnji pa temperaturo dvignemo na 72 °C, da pride do izgrajevanja komplementarne verige, saj je omenjena temperatura optimalna za delovanje termostabilne DNA – polimeraze. Vsaka novonastala veriga predstavlja dodatno matrico za naslednji cikel, kar razloži eksponentno rast v nastajanju produkta, dokler se reakcija ne upočasni in ni dosežen plato.

S časom so razvili veliko različic verižne reakcije s polimerazo, za nas je bila najustreznejša PCR v realnem času, ki poleg kvantifikacije omogoča tudi enostavno genotipizacijo. Glavna prednost PCR v realnem času v primerjavi s konvencionalnim PCR je sočasno pomnoževanje in detekcija produktov. S tem skrajšamo čas analize, zmanjšamo možnost kontaminacije in povečamo zanesljivost genotipizacije.



Slika 7: Princip detekcije s hidrolizirajočimi sondami.

Za detekcijo smo uporabili s fluorofori označene oligonukleotide – sonde, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Njihova prednost je specifičnost in možnost sočasnega določanja več različnih odsekov, ki jih označimo z različnimi fluorofori. Slabost je veliko višja cena. Signal merimo po principu fluorescenčnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo, kar pomeni, da kadar sta dva fluorofora dovolj blizu in se njun ekscitacijski in emisijski spekter prekrivata, ekscitacija donorskega barvila povzroči emisijo svetlobe, ki ekscitira akceptorsko barvilo, ki posledično emitira svetlobo drugačne valovne dolžine. Kadar akceptorska molekula absorbira svetlobo donorske molekule, sama pa ne fluorescira, ji pravimo dušilec. Za metodo s hidrolizirajočimi sondami, ki smo jo uporabili, je značilno, da imajo sonde na 5' koncu vezano barvilo, ki emitira svetlobo, na 3'

koncu pa dušilec, ki to svetlobo prestreže. Med reakcijo PCR v stopnji podaljševanja povzroči 5' – eksonukleazna aktivnost Taq DNA – polimeraze hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde. Posledično se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem poveča do te mere, da dušilec ne more več prestrezati fluorescence, ki jo sedaj lahko zaznamo in merimo (47). Princip delovanja je shematsko prikazan na sliki 7. V vsaki reakciji smo uporabili dve barvili, VIC in FAM, ki se vežeta vsako na svoj alel in na ta način omogočita genotipizacijo.

Za vsak polimorfizem smo uporabili drugo TaqMan analizo mešanico. Le te vsebujejo sonde z različnimi nukleotidnimi zaporedji, ki omogočajo specifično določitev polimorfnege mesta. Nukleotidna zaporedja so prikazana v preglednici V.

Preglednica V: Nukleotidna zaporedja s polimorfnimi mesti, ki smo jih določali.

Polimorfizem	Tarčno zaporedje DNA
rs2306283	CAGGTATTCTAAAGAACTAATATC[A/G]ATTCATCAGAAAAT TCAACATCGAC
rs4149032	TTTTTCCTATCTGCACATAACATTA[C/T]AAACTTATGGCAATT ATAAACTCA
rs4149056	TCTGGGTCATACATGTGGATATATG[C/T]GTTCATGGGTAATA TGCTTCGTGGA
rs1045642	TGTTGGCCTCCTTTGCTGCCCTCAC[A/G]ATCTCTTCCTGTGAC ACCACCCGGC
rs3814055	GGTCATTTTTTGGCAATCCCAGGTT[C/T]TCTTTTCTACCTGTT TGCTCAATCG
rs11045819	CACTATCTCAG[G/T]TGATGCT
rs2276707	GCTTGCTGAGAAGCTGCCCTCCAT[C/T]CTGTTACCATCCAC AGGTGGCTTCC
rs6785049	AGGAGCCATCCTCCCTCTTCCTCTC[A/G]CCCCAACTTCTGGA TTATGGGATG
rs7643645	GAGACCCAGCTCTGCTGGGACCAC[A/G]GGCCATTTTTCTTC CCATGTTGTGA
rs2472677	TCAACTTTTTTGTGCCATATTTTTT[C/T]TGATTAAAAACAAA CAAACACAAA

V vsaki mešanici je barvilo VIC označevalo prvi alel, barvilo FAM pa drugi alel. Na podlagi teh podatkov smo lahko določili rezultate genotipizacije. V preglednici VI je prikazano katero barvilo se je vezalo na posamezen alel.

Preglednica VI: Povezava med porastom fluorescence posameznega barvila glede na genotip pri posameznem polimorfizmu.

Polimorfizem	FAM	VIC
rs2306283	A (nemutiran)	G (mutiran)
rs4149032	C (nemutiran)	T (mutiran)
rs4149056	C (mutiran)	T (nemutiran)
rs1045642	A (mutiran)	G (nemutiran)
rs3814055	C (nemutiran)	T (mutiran)
rs11045819	G (nemutiran)	T (mutiran)
rs2276707	C (nemutiran)	T (mutiran)
rs6785049	A (mutiran)	G (nemutiran)
rs7643645	A(nemutiran)	G (mutiran)
rs2472677	C (nemutiran)	T (mutiran)

Za zagotavljanje dobrih rezultatov reakcij PCR je izrednega pomena preprečevanje kontaminacij. V ta namen smo v PCR laboratoriju uporabljali druga zaščitna oblačila kot v ostalih laboratorijih, vse reagente smo pred uporabo alikvotirali, avtoklavirana plastikovina se ni prenašala po drugih laboratorijih, vse aparature in potrebščine smo ustrezno očistili, uporabili smo UV – lučko, vse vzorce in reagente smo pred odpiranjem na kratko centrifugirali.

Pred samo izvedbo genotipizacije smo vse potrebne reagente vzeli iz zamrzovalnika in jih z aluminijasto folijo zavarovane pred svetlobo prenesli v hladilnik. Nato smo s 70 % etanolom za čiščenje površin očistili delovno komoro in mešalo, s 3 % hipokloritom pa še ostale stvari, ki smo jih potrebovali – pipete, škatle z nastavki za pipete, kozarce z epruvtkami s pokrovčki, koš za smeti, stojalo za epruvtke s pokrovčki. Vse stvari smo v komoro postavili tako, da smo dosegli čim večjo izpostavljenost UV – lučki, ki smo jo prižgali za 30 minut. Medtem smo preračunali ustrezne volumne reagentov in v programu LightCycler pripravili datoteko za genotipizacijo. Zaradi različnih optimalnih pogojev pri posameznih polimorfizmih smo analize opravljali po dveh različnih protokolih. Protokol 1 smo uporabili

pri polimorfizmih rs4149032, rs11045819, rs2276707, rs6785049, rs7643645 in rs2472677, protokol 2 pa pri polimorfizmih rs2306283, rs4149056, rs1045642 in rs3814055.

Volumska sestava reakcijske zmesi za posamezen protokol je prikazana v preglednici VII.

Preglednica VII: Volumska sestava reakcijskih zmesi za genotipizacijo za oba protokola.

	Volumni za protokol 1	Volumni za protokol 2
Volumen vzorca (c = 10 ng/ μ L)	1 μ L	1 μ L
Volumen avtoklavirane ultra čiste vode	2,94 μ L	2,815 μ L
Volumen TaqMan analizne mešanice (protokol 1 = 40x, protokol 2 = 20x)	0,06247 μ L	0,1249 μ L
Volumen TaqMan Genotyping Master Mixa 2x	1 μ L	1 μ L

Pri računanju volumnov smo upoštevali število vzorcev, slepi vzorec in 10 % prebitek na račun izgub pri pipetiranju.

Pripravili smo razpredelnico, ki je ponazarjala mikrotitrsko ploščico. Vanjo smo vpisali polimorfizme, ki smo jih določali in vzorce v katerih smo jih določali. Mikrotitrsko ploščico z vzorci izolirane DNA smo vzeli iz hladilnika in jo centrifugirali 2 minuti na 1900 x g.

Nato smo pričeli z delom v komori:

- Premešali in centrifugirali smo vse potrebne reagente.
- V epruvetke s pokrovčkom smo najprej napipetirali vodo, nato TaqMan Genotyping MasterMix, nazadnje pa še TaqMan sonde. Reakcijsko zmes smo ponovno premešali in jo v primeru, da je nismo takoj potrebovali, zaščitili pred svetlobo in shranili v hladilniku.
- V mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinicami smo napipetirali po 4 μ L reakcijske zmesi.
- V vdolbinico za slepo smo odpipetirali 1 μ L avtoklavirane ultra čiste vode, v ostale pa ustrezne vzorce.
- Čez mikrotitrsko ploščico smo s pomočjo plastične kartice nalepili folijo. Folija je morala biti nepoškodovana, saj bi v nasprotnem primeru lahko motila pridobivanje rezultatov med analizo.

- Prekrito mikrotitrsko ploščico smo 2 minuti centrifugirali na 1900 x g.
- Nato smo ploščico prenesli v analizator in pričeli z analizo po predhodno pripravljenem programu.
- Komoro smo ponovno očistili tako kot pred začetkom dela in prižgali UV – lučko za 30 minut.

Kot že omenjeno, smo analize izvajali po dveh različnih protokolih. Temperaturni program za vsakega je prikazan v preglednicah VIII in IX.

Preglednica VIII: Temperaturni program za genotipizacijo po protokolu 1.

	Temperatura	Čas	Število ciklov
Aktivacija Taq DNA - polimeraze	95 °C	15 min	1
Začetna denaturacija	95 °C	15 s	40
Podaljševanje in polimerizacija	60 °C	60 s	
Ohlajanje	40 °C	30 s	1

Preglednica IX: Temperaturni program za genotipizacijo po protokolu 2.

	Temperatura	Čas	Število ciklov
Aktivacija Taq DNA - polimeraze	95 °C	15 min	1
Začetna denaturacija	95 °C	15 s	50
Podaljševanje in polimerizacija	60 °C	90 s	
Ohlajanje	40 °C	30 s	1

Po končani analizi smo ovrednotili rezultate, ploščico pa odvrgli v ustrezen koš za odpadke. Preverili smo, da je bila fluorescenca slepe negativna, fluorescence vseh vzorcev pa dovolj visoke. Kadar ni bilo tako, smo analizo neuspešno analiziranih vzorcev ponovili.

3.6 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabljali program IBM SPSS statistics 22. Za vsak polimorfizem smo s pomočjo testa χ^2 preverili, če se frekvence genotipov znotraj vseh 83 vzorcev ujemajo s frekvencami genotipov v populaciji centralne Evrope (25). Test χ^2 lahko uporabljamo pri analizi enega ali več naključnih vzorcev, ko so podatki podani s številom oziroma frekvenco kategorije in so frekvence medsebojno neodvisne. Pomembno je tudi to, da so vsi vzorci dovolj veliki (48). V primeru, ko v katerikoli skupini za določen genotip ni

bilo dovolj primerov, smo uporabili Fisherjev eksaktni test, ki dovoljuje analizo tudi v takrat, ko je v določeni skupini 5 ali manj primerov.

Vpliv posameznih polimorfizmov na farmakokinetične parametre smo določali z analizo variance (ANOVA). Test se uporablja za ugotavljanje statistično pomembnih razlik med variancami vsaj treh neodvisnih skupin vzorcev. Temelji na predpostavkah, da je vsaka skupina vzorcev normalno porazdeljena, da so variance homogene in da so vzorci izbrani naključno. Kadar smo ugotovili statistično pomembne razlike med variancami, smo uporabili post hoc teste in sicer smo za skupine vzorcev s homogeno varianco izbrali test Tukey HSD, za skupine vzorcev z nehomogeno varianco pa test Games – Howell. Ti testi nam povejo, med katerimi skupinami vzorcev so statistično pomembne razlike (49).

V primeru, da smo ugotavljali statistično pomembne razlike med samo dvema skupinama vzorcev, smo uporabili neodvisni t-test. Ta test smo uporabili tudi pri recesivnem in dominantnem modelu določanja vpliva polimorfizmov na farmakokinetiko.

Program Haploview 4.2 smo uporabili za ugotavljanje haplotipnih blokov v preučevani populaciji in ugotavljanje vezavnega neravnovesja posameznih polimorfizmov. Program Phase pa smo uporabili za ugotavljanje haplotipnih blokov na nivoju posameznika (50).

Kot statistično značilne razlike smo pri vseh testih opredelili p – vrednosti, ki so manjše od 0,050, kot mejno signifikantne vrednosti pa p – vrednosti, ki so večje od 0,050 in manjše od 0,100.

4 Rezultati in razprava

Naš namen je bil ugotoviti, ali izbrani polimorfizmi vplivajo na farmakokinetične parametre rifampicina. Najprej smo izolirali DNA iz krvnih celic pacientov z endoprotezami. Vzorcem DNA smo nato izmerili koncentracijo in čistost ter jih redčili na ustrezno koncentracijo za izvedbo genotipizacije. Po določitvi genotipov smo s statističnimi analizami ovrednotili njihovo pogostost in s pomočjo aditivnega, recesivnega ter dominantnega modela ugotavljali njihov vpliv na farmakokinetiko rifampicina. Določili smo tudi haplotipe in njihov vpliv na farmakokinetiko rifampicina.

4.1 Izolacija DNA in določanje njene koncentracije in čistosti

S pomočjo FlexiGene[®] DNA Kita smo izolirali DNA iz 83 vzorcev. Vzorci so bile zamrznjene krvne celice, za nadomestitev plazme pa smo uporabili avtoklavirano ultra čisto vodo. Metodo za izolacijo iz zamrznjenih krvnih celic so optimizirali na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo, zanjo pa smo se odločili, ker tako ni bilo potrebno pacientov obremenjevati z dodatnim odvzemom vzorca krvi, ki bi bil namenjen samo farmakogenetskim raziskavam (45). Koncentracije DNA in čistost vzorcev so prikazane v preglednici v prilogi A.

Povprečna koncentracija DNA v izoliranih vzorcih je bila 285,54 ng/μL (SD = 193,01). Večja nihanja so posledica različnih vsebnosti levkocitov v odvzetih vzorcih. Vzorci 33R, 66R in 73R so imeli že po prvi stopnji izolacije komaj opazno peletko, kar se je poznalo tudi pri nizki koncentraciji. Pri vzorcih 2R in 6R izolacija s FlexiGene[®] DNA Kitom ni uspela, zato smo uporabili QIAamp DNA mini kit in izolacijo naredili iz preostanka vzorca.

Čistost vzorcev je bila ustrezna za nadaljnje analize. Razmerje absorbanca pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm je bilo v povprečju 1,88 (SD = 0,08), razmerje pri valovnih dolžinah 260 in 230 nm pa je bilo v povprečju 1,59 (SD = 0,37). Odstopanja je lahko povzročilo zamrzovanje vzorcev ali njihova starost, saj so bili najstarejši odvzeti že v letu 2012, najbolj opazna pa so bila nihanja pri razmerju 260/230 pri vzorcih s koncentracijo DNA nižjo od 100 ng/μL.

Nekaj težav nam je povzročilo raztapljanje DNA v zadnji stopnji izolacije, ki je trajalo precej dlje kot je navedeno v navodilih proizvajalca, saj tudi po nekaj tednih DNA ni bila povsem raztopljena. Posledično so se koncentracije med meritvami v različnih časovnih točkah lahko precej razlikovale, kar je otežilo pripravo vzorcev z ustrezno koncentracijo za nadaljnje

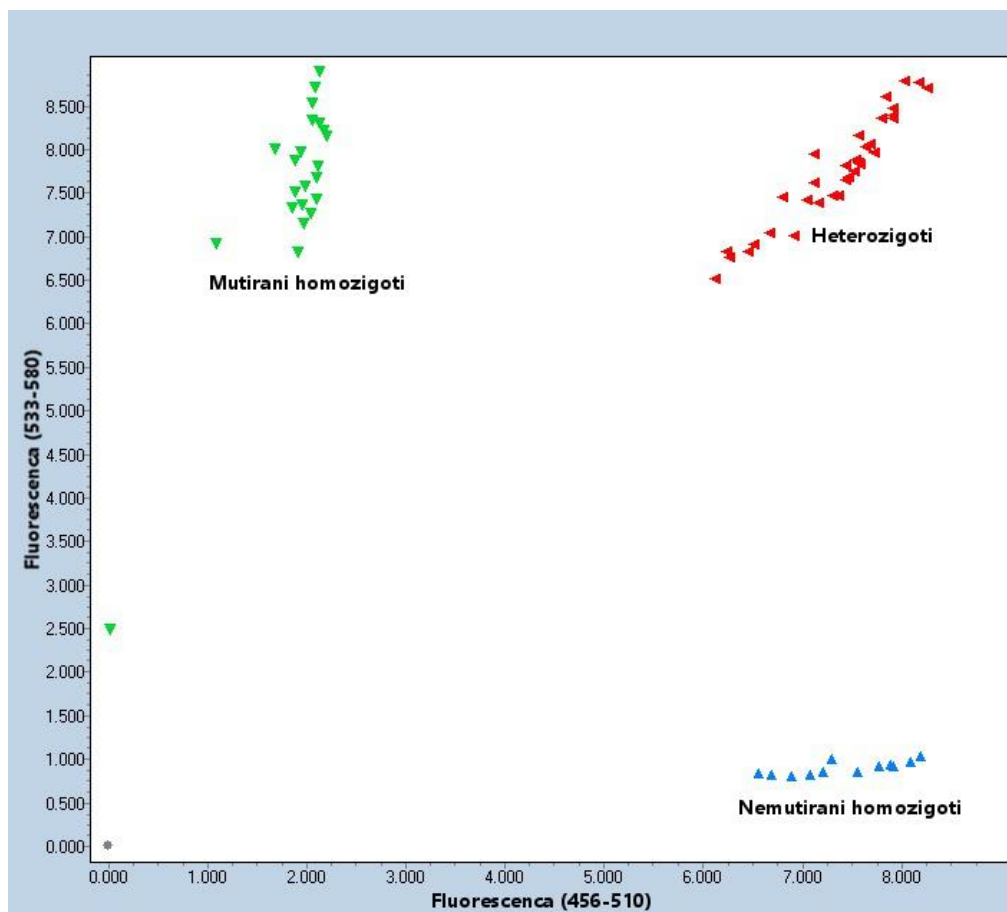
analize. Težavo smo rešili z naknadnim ponovnim redčenjem vzorcev, ki so dajali slabe rezultate.

4.2 Izvedba genotipizacije

Genotipizacijo smo izvedli z napravo LightCycler[®] 480 II, v kateri je potekla verižna reakcija s polimerazo v realnem času in programom LightCycler[®] 480 Software release 1.5.1.62 SP3. Za posamezen vzorec smo opazovali porast fluorescence barvila med reakcijo in na podlagi tega določili njegov genotip. Kadar je porasla fluorescenca samo enega barvila, FAM ali VIC, je šlo za nemutiranega ali mutiranega homozigota, odvisno od tega, katero barvilo je označevalo posamezen alel. Kadar sta porasli obe fluorescenci, pa smo imeli vzorec heterozigota.

V enem postopku genotipizacije smo analizirali več vzorcev hkrati in iz grafa, ki na osi x prikazuje fluorescenco pri valovni dolžini barvila FAM, na osi y pa fluorescenco valovne dolžine barvila VIC, ugotovili njihov genotip. Primer grafa je prikazan na sliki 8. Prikazuje rezultate genotipizacije polimorfizma rs1045642, kjer zeleni trikotniki prikazujejo vzorce, ki so mutirani homozigoti in jih označuje barvilo VIC, modri trikotniki prikazujejo vzorce, ki so nemutirani homozigoti in jih označuje barvilo FAM, rdeči trikotniki pa prikazujejo vzorce, ki so heterozigoti. Siv krog prikazuje slepi vzorec, ki ne vsebuje DNA.

Genotipizirali smo vseh 83 vzorcev, vsakega za 10 polimorfizmov. Ker so nekateri vzorci imeli nejasne rezultate ali relativno nizke fluorescence, smo jih analizirali z različnimi volumni, s čimer smo jim spremenili koncentracije. Protokolov, po katerih smo genotipizacijo izvajali, ni bilo potrebno spreminjati, saj sta oba že od začetka dajala ustrezne rezultate. Po ugotovljenih genotipih smo pri vsakem polimorfizmu po splošni praksi ponovno analizirali 20 % vzorcev. Genotipi polimorfizmov v genih *SLCO1B1* in *ABCB1* so prikazani v prilogi B, genotipi polimorfizmov v genu *NRII2* pa v prilogi C.



Slika 8: Primer rezultatov genotipizacije za polimorfizem rs1045642 G>A.

4.3 Pogostost pojavljanja genotipov

Kriterij za uspešno izvedene genotipizacije je Hardy-Weinbergovo ravnotežje. Hardy-Weinbergovo načelo pravi, da se, kadar ni prisotnih motečih dejavnikov, pogostost pojavljanja alelov v populaciji ne spreminja. Ravnotežje se podre, kadar so prisotne mutacije, naravna selekcija, nenaključno parjenje ali pritok novih alelov, kar se v naravi tudi dogaja, zato ravnotežje opisuje idealno stanje, ki je v realnosti nedosegljivo (51).

Vseeno nam p - vrednosti Hardy-Weinbergovega ravnotežja povejo, če se naši rezultati genotipizacije skladajo z rezultati v populaciji in s tem lahko ugotovimo morebitne napake pri izvedbi genotipizacije. Vrednosti za preučevane polimorfizme smo pridobili s programom Haploview, prikazane pa so v preglednici X, kjer vidimo, da so vsi rezultati v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

Preglednica X: Ujemanje frekvenc genotipov s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem.

Gen	Polimorfizem	p – vrednost
<i>SLCO1B1</i>	rs2306283	0,762
	rs4149032	0,810
	rs4149056	0,823
	rs11045819	0,718
<i>ABCB1</i>	rs1045642	0,894
<i>NR1I2</i>	rs3814055	0,254
	rs2276707	0,711
	rs6785049	1,000
	rs7643645	1,000
	rs2472677	0,571

Nato smo določili pogostost pojavljanja genotipov v populaciji in jo primerjali s pogostostjo pojavljanja genotipov v centralno evropskih državah. Uporabili smo test χ^2 , za polimorfizme, kjer je posamezna skupina preiskovancev štela manj kot 5 oseb, pa smo uporabili Fisherjev eksaktni test.

V preglednici XI so predstavljene pogostosti pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi za gen *SLCO1B1*. Pri polimorfizmu rs2306283 se tako v naši raziskavi kot v literaturi najpogosteje pojavljajo heterozigoti, sledijo nemutirani homozigoti, najmanj pa je mutiranih homozigotov. Pri polimorfizmu rs4149032 je izrazito najmanj mutiranih homozigotov, medtem ko je nemutiranih homozigotov in heterozigotov približno enako. Pri polimorfizmu rs4149056 je največ nemutiranih homozigotov, četrtnina je heterozigotov, mutiranih homozigotov pa je samo nekaj odstotkov. Pri polimorfizmu rs11045819 so najpogostejši nemutirani homozigoti, heterozigotov je nekaj več kot četrtnina vzorcev, mutiranih homozigotov pa je le nekaj odstotkov. Rezultati testa χ^2 in Fisherjevega eksaktnega testa kažejo, da se znotraj vsakega polimorfizma deleži posameznih genotipov, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, statistično pomembno ne razlikuje od deležev v centralno evropski populaciji.

Preglednica XI: Pogostost pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi (25) za gen *SLCO1B1*.

Polimorfizem	Genotip	Preiskovana skupina	Vrednosti iz literature	p – vrednost
rs2306283 A>G	AA	n = 26 (31 %)	n = 36 (36 %)	0,664
	AG	n = 39 (47 %)	n = 46 (47 %)	
	GG	n = 18 (22 %)	n = 17 (17 %)	
rs4149032 C>T	CC	n = 36 (43 %)	n = 46 (45 %)	0,945
	CT	n = 36 (43 %)	n = 45 (44 %)	
	TT	n = 11 (14 %)	n = 12 (11 %)	
rs4149056 T>C	TT	n = 58 (70 %)	n = 71 (71 %)	0,569*
	CT	n = 22 (26 %)	n = 27 (27 %)	
	CC	n = 3 (4 %)	n = 1 (1 %)	
rs11045819 C>A	CC	n = 59 (71 %)	n = 64 (65 %)	0,711*
	CA	n = 21 (25 %)	n = 30 (30 %)	
	AA	n = 3 (4 %)	n = 5 (5 %)	

Z * označeni rezultati so pridobljeni s Fisherjevim eksaktnim testom, rezultati brez * pa so pridobljeni s testom χ^2 . n = število preiskovancev v posamezni skupini; v oklepaju je podan delež preiskovancev za določen genotip znotraj polimorfizma.

Preglednica XII prikazuje pogostost pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi za gen *ABCB1*. Pri polimorfizmu rs1045642 se najpogosteje pojavljajo heterozigoti, mutiranih homozigotov pa je nekaj odstotkov več kot nemutiranih homozigotov. Test χ^2 ni pokazal značilnih razlik glede na populacijske podatke.

Preglednica XII: Pogostost pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi (25) za gen *ABCB1*.

Polimorfizem	Genotip	Preiskovana skupina	Vrednosti iz literature	p – vrednost
rs1045642 C>T	CC	n = 19 (23 %)	n = 18 (18 %)	0,731
	CT	n = 40 (48 %)	n = 50 (51 %)	
	TT	n = 24 (29 %)	n = 31 (31 %)	

n = število preiskovancev v posamezni skupini; v oklepaju je podan delež preiskovancev za določen genotip znotraj polimorfizma.

V preglednici XIII smo prikazali pogostost pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi za gen *NR1I2*. Pri polimorfizmu rs3814055 je frekvenca pojavljanja nemutiranih

homozigotov in heterozigotov približno enaka, mutiranih homozigotov pa je bistveno manj. Test χ^2 tudi tu ni pokazal statistično pomembnih razlik med obema sklopoma podatkov. Pri polimorfizmu rs2276707 pa naletimo na precej različne podatke za frekvence v naši raziskavi in frekvence objavljene v literaturi. Povsod je sicer najpogostejša pojavnost nemutiranega homozigota, vendar jim v literaturi pripada 82 %, v naši raziskavi pa le 52 %. Posledično se razlikujejo tudi odstotki heterozigotov in mutiranih homozigotov, je pa v obeh primerih mutiranih homozigotov najmanj. Ta razlika je lahko posledica dejstva, da smo mi paciente izbirali samo v Sloveniji, in sicer samo ljudi z ortopedskimi vsadki, v literaturi pa so podatki podani za ljudi iz celotne centralne Evrope, brez znanih bolezenskih stanj. Pričakovano je tudi Fisherjev eksaktni test zaznal statistično pomembne razlike med obema populacijama. Za polimorfizem rs6785049 je v naši raziskavi največ heterozigotov, sledijo mutirani homozigoti, najmanj pa je nemutiranih homozigotov, za razliko od podatkov iz literature, kjer je največ mutiranih homozigotov, s skoraj enakim deležem sledijo heterozigoti, najmanj pa je nemutiranih homozigotov. Kljub temu test χ^2 ni zaznal statistično pomembnih razlik, saj so odstopanja znotraj dovoljenih vrednosti. Polimorfizem rs7643645 zastopa največ heterozigotov, sledijo nemutirani homozigoti, opazno manj pa je mutiranih homozigotov. Tudi pri polimorfizmu rs2472677 je največ heterozigotov, sledijo nemutirani homozigoti, najmanj pa je mutiranih homozigotov. Pri obeh polimorfizmih je test χ^2 pokazal, da ni statistično pomembnih razlik med pogostostjo posameznega genotipa v naši raziskavi in v literaturi.

Preglednica XIII: Pogostost pojavljanja genotipov v naši raziskavi in v literaturi (25) za gen NR112.

Polimorfizem	Genotip	Preiskovana skupina	Vrednosti iz literature	p – vrednost
rs3814055 C>T	CC	n = 36 (43 %)	n = 44 (45 %)	0,647
	CT	n = 33 (40 %)	n = 43 (43 %)	
	TT	n = 14 (17 %)	n = 12 (12 %)	
rs2276707 C>T	CC	n = 43 (52 %)	n = 81 (82 %)	< 0,001*
	CT	n = 32 (38 %)	n = 16 (16 %)	
	TT	n = 8 (10 %)	n = 2 (2 %)	
rs6785049 A>G	AA	n = 28 (34 %)	n = 45 (46 %)	0,152
	AG	n = 40 (48 %)	n = 44 (44 %)	
	GG	n = 15 (18 %)	n = 10 (10 %)	

rs7643645 A>G	AA	n = 34 (41 %)	n = 38 (38 %)	0,935
	AG	n = 39 (47 %)	n = 49 (50 %)	
	GG	n = 10 (12 %)	n = 12 (12 %)	
rs2472677 C>T	CC	n = 8 (10 %)	n = 14 (14 %)	0,648
	CT	n = 41 (49 %)	n = 46 (47 %)	
	TT	n = 34 (41 %)	n = 39 (39 %)	

Z * označeni rezultati so pridobljeni s Fisherjevim eksaktnim testom, rezultati brez * pa so pridobljeni s testom χ^2 . n = število preiskovancev v posamezni skupini; v oklepaju je podan delež preiskovancev za določen genotip znotraj polimorfizma.

4.4 Vpliv polimorfizmov na farmakokinetiko rifampicina

Ugotavljali smo, kakšen vpliv imajo polimorfizmi na določene farmakokinetične parametre rifampicina. Preverjali smo vpliv na koncentracijo v plazmi na tretji dan po pričetku terapije, ko še ni izražena avtoindukcija presnovnih encimov, na koncentracijo v plazmi po tridesetem dnevu od pričetka terapije, ko se avtoindukcija že stabilizira, na očistek v prvi in v drugi časovni točki, na volumen porazdelitve in na razpolovni čas. Očistek nam pove, kako hitro snov v svoji osnovni, nespremenjeni obliki izginja iz krvnega obtoka in je definiran kot količnik med hitrostjo eliminacije in plazemsko koncentracijo. Volumen porazdelitve je volumen, v katerem bi se snov enakomerno porazdelila, če bi povsod imela koncentracijo, kakršno ima v plazmi, razpolovni čas pa nam pove, v kolikšnem času se presnovi polovica absorbirane učinkovine. Razpolovni čas je premosorazmeren z volumnom porazdelitve in obratnosorazmeren z očistkom (52).

V statistično analizo smo vključili 56 pacientov, saj za ostale nismo imeli farmakokinetičnih podatkov. Vzorcev, ki so bili pridobljeni na tretji dan po pričetku terapije, smo imeli 31, vzorcev, pridobljenih po tridesetem dnevu, pa je bilo 22. Ostale parametre so s pomočjo farmakokinetičnih modelov pridobili za vseh 56 pacientov.

Za statistične analize smo uporabili aditivni, recesivni in dominantni genetski model. Pri aditivnem modelu smo znotraj polimorfizma primerjali vrednosti parametrov glede na vsak genotip, saj ima pri tem modelu mutiran homozigot dvakrat večjo možnost za spremenjene parametre kot heterozigot, ki pa ima še vedno večje tveganje kot nemutiran homozigot. Zaradi prisotnosti treh neodvisnih spremenljivk smo uporabili statistični test ANOVA. Kadar so bile p - vrednosti statistično pomembne, smo uporabili post hoc test Tukey HSD za skupine vzorcev s homogeno varianco ali test Games – Howell za skupine vzorcev z

nehomogeno varianco. Rezultati post hoc testov statistično značilnih rezultatov ANOVE so prikazani v prilogi E. Pri recesivnem modelu smo združili nemutirane homozigote in heterozigote ter jih primerjali z mutiranimi homozigoti, saj tveganje predstavljata le dve kopiji mutiranega alela, pri dominantnem modelu pa smo združili mutirane homozigote in heterozigote ter jih primerjali z nemutiranimi homozigoti, saj prisotnost enega mutiranega alela predstavlja enako tveganje kot prisotnost dveh alelov. Za oba modela smo uporabili t-test.

4.4.1 Polimorfizmi v genu *SLCO1B1*

Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami posameznih parametrov za vsak genotip so predstavljene v prilogah D1, D2, D3 in D4. V preglednici XIV so prikazane p – vrednosti za aditivni, recesivni in dominantni model.

Preglednica XIV: p – vrednosti pri ugotavljanju vpliva polimorfizmov v genu *SLCO1B1* na farmakokinetiko rifampicina.

	rs2306283			rs4149032			rs4149056	rs11045819		
	AM	RM	DM	AM	RM	DM	AM	AM	RM	DM
c_1	0,717	0,437	0,578	0,987	0,926	0,974	0,861*	0,354	0,466	0,458
c_2	0,391	0,518	0,157	0,652	0,562	0,603	0,864*	0,711	/	0,711
Cl_1	0,785	0,509	0,541	0,204	0,096	0,942	0,005*	0,412	0,200	0,425
Cl_2	0,761	0,461	0,737	0,863	0,602	0,747	0,935*	0,458	0,365	0,544
V_2	0,756	0,545	0,540	0,617	0,962	0,417	0,733*	0,926	0,984	0,672
t_{50}	0,610	0,375	0,913	0,068	0,077	0,420	0,693*	0,150	0,075	0,893

AM = rezultati pridobljeni z aditivnim modelom, uporabili smo ANOVO, rezultati z zvezdico pa so pridobljeni s t-testom; RM = rezultati pridobljeni z recesivnim modelom, uporabili smo t-test; DM = rezultati pridobljeni z dominantnim modelom, uporabili smo t-test; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki; V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas. Krepko so označeni mejno signifikantni rezultati, krepko in podčrtano pa signifikantni rezultati.

Za polimorfizem rs2306283 nismo ugotovili nobenega statistično značilnega rezultata za preučevane parametre. To bi lahko bila posledica dejstva, da smo v literaturi našli podatke o znižanih maksimalnih koncentracijah, ki jih mi nismo določali, pacienti so bili okuženi z virusom HIV, pa tudi polimorfizem se pogosteje pojavlja v afriški populaciji, kjer so bile opravljene študije, kot v evropski (20, 27, 28).

Pri polimorfizmu rs4149032 smo našli mejno značilne razlike pri aditivnem modelu pri razpolovnem času ($p = 0,068$), zato smo za ta parameter naredili še post hoc teste, s katerimi

smo ugotovili, da se mutirani homozigoti mejno razlikujejo od heterozigotov v razpolovnem času ($p = 0,077$), saj je razpolovni čas pri mutiranih homozigotih ($n = 8$; $t_{50} = 341,76$ min) krajši od razpolovnega časa pri heterozigotih ($n = 26$; $t_{50} = 453,28$ min). Pri recesivnem modelu smo ravno tako ugotovili mejno značilen rezultat pri razpolovnem času ($p = 0,077$) in sicer je razpolovni čas pri mutiranih homozigotih ($n = 8$; $t_{50} = 341,76$ min) krajši kot pri združenih nemutiranih homozigotih in heterozigotih ($n = 48$; $t_{50} = 428,14$ min). Rezultat je mejno značilen tudi pri očistku v prvi časovni točki ($p = 0,096$), kjer imajo mutirani homozigoti ($n = 8$; $Cl_1 = 10,38$ L/h) večji očistek kot združeni nemutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 48$; $Cl_1 = 7,77$ L/h). Tudi tu lahko najdemo povezavo s podatki iz literature, ki govorijo o slabši biološki uporabnosti rifampicina pri afričanih s prisotnim polimorfizmom, je pa zanimivo, da se pri naših rezultatih pri aditivnem modelu razpolovni čas mutiranih homozigotov razlikuje samo od heterozigotov in ne tudi od nemutiranih homozigotov ($n = 22$; $t_{50} = 398,43$ min) (28).

Za polimorfizem rs4149056 smo že pri aditivnem modelu uporabili t-test, saj smo imeli samo dva genotipa – v študijo namreč ni bil vključen nihče, ki bi bil mutiran homozigot. Tudi tu smo najprej upoštevali homogenost varianc. Parameter, ki je pokazal značilne razlike med genotipoma, je očistek v prvi časovni točki ($p = 0,005$), ki je pri heterozigotih ($n = 16$; $Cl_1 = 6,21$ L/h) manjši kot pri nemutiranih homozigotih ($n = 40$; $Cl_1 = 8,92$ L/h). V literaturi podatkov o zmanjšanem očistku nismo našli, so pa pri ponavljajočih se odmerkih omenjali podaljšan razpolovni čas in večjo pojavnost poškodb jeter, kar se sklada tudi z našimi rezultati, saj je razpolovni čas obratnosorazmeren z očistkom (30).

Pri polimorfizmu rs11045819 smo ugotovili statistično mejno značilen rezultat pri recesivnem modelu za razpolovni čas ($p = 0,075$) in sicer imajo mutirani homozigoti ($n = 3$; $t_{50} = 287,83$ min) značilno krajši razpolovni čas kot združeni nemutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 53$; $t_{50} = 423,04$ min). Pri ostalih parametrih nismo ugotovili značilnih razlik. V literaturi v povezavi s tem polimorfizmom omenjajo znižane maksimalne koncentracije in površine pod plazemsko krivuljo, zaradi česar minimalna inhibitorna koncentracija pogosto ni bila dosežena. Povezave z znižanimi koncentracijami mi nismo zasledili, kar je lahko posledica majhnega števila mutiranih homozigotov v našem vzorcu (23, 27).

4.4.2 Polimorfizmi v genu *ABCB1*

Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami posameznih parametrov za vsak genotip so predstavljene v prilogi D5. V preglednici XV so prikazane p – vrednosti za aditivni, recesivni in dominantni model.

Preglednica XV: p – vrednosti pri ugotavljanju vpliva polimorfizmov v genu *ABCB1* na farmakokinetiko rifampicina.

	Aditivni model	Recesivni model	Dominantni model
c_1	0,508	0,942	0,265
c_2	0,773	0,536	0,607
Cl_1	<u>0,024</u>	0,745	<u><0,001</u>
Cl_2	0,248	0,275	<u>0,026</u>
V_2	0,283	0,507	0,114
t_{50}	<u>0,019</u>	0,143	<u>0,066</u>

Rezultati aditivnega modela so pridobljeni z ANOVO, rezultati recesivnega pa s t -testom. c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki; V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas. Krepko so označeni mejno signifikantni rezultati, krepko in podčrtano pa signifikantni rezultati.

Pri polimorfizmu rs1045642 smo z aditivnim modelom ugotovili statistično značilne vrednosti za dva parametra, in sicer za očistek v prvi časovni točki ($p = 0,024$) in za razpolovni čas ($p = 0,019$). Pri očiščku v prvi časovni točki so statistično pomembne razlike med nemutiranimi homozigoti in heterozigoti ($p < 0,001$) ter med nemutiranimi in mutiranimi homozigoti ($p = 0,029$). Nemutirani homozigoti imajo značilno manjši očistek ($n = 10$; $Cl_1 = 5,03$ L/h) kot heterozigoti ($n = 31$; $Cl_1 = 9,01$ L/h) in mutirani homozigoti ($n = 15$; $Cl_1 = 8,45$ L/h), iz česar lahko sklepamo, da prisotnost mutiranega alela vpliva na višji očistek. Ugotovili smo tudi značilne razlike v razpolovnem času, kjer se heterozigoti razlikujejo od nemutiranih homozigotov ($p = 0,042$) in mejno razlikujejo od mutiranih homozigotov ($p = 0,082$) in sicer imajo heterozigoti krajši razpolovni čas ($n = 31$; $t_{50} = 373,90$ min) od nemutiranih ($n = 10$; $t_{50} = 483,25$ min) in mutiranih ($n = 15$; $t_{50} = 457,42$ min) homozigotov, kar je nekoliko nenavadno. Tudi z dominantnim modelom smo ugotovili značilne rezultate za očistek v prvi časovni točki ($p < 0,001$), kjer imajo nemutirani homozigoti ($n = 10$; $Cl_1 = 5,03$ L/h) že pričakovano manjši očistek kot združeni mutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 46$; $Cl_1 = 8,82$ L/h), in mejno značilne razlike za razpolovni čas ($p = 0,066$), kjer imajo nemutirani homozigoti ($n = 10$; $t_{50} = 483,25$ min) daljši razpolovni čas kot združeni mutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 46$; $t_{50} = 401,13$ min). Za razliko

od aditivnega modela smo tu značilen rezultat ugotovili tudi pri očistku v drugi časovni točki ($p = 0,026$) in sicer je očistek pri nemutiranih homozigotih ($n = 10$; $Cl_2 = 17,48$ L/h) nižji kot pri združenih mutiranih homozigotih in heterozigotih ($n = 46$; $Cl_2 = 28,07$ L/h). Pri pacientih s tuberkulozo so ugotovili višje koncentracije rifampicina pri prisotnosti mutiranega alela, kar je bilo izrazito predvsem po dveh tednih jemanja zdravila in kasneje. Naši rezultati torej kažejo ravno obratne lastnosti, kar je lahko posledica različnih populacij in drugačnih odmerkov, ki se uporabljajo za zdravljenje tuberkuloze.

4.4.3 Polimorfizmi v genu *NR112*

Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami posameznih parametrov za vsak genotip so predstavljene v prilogah D6, D7, D8, D9 in D10. V preglednici XVI so prikazane p – vrednosti za aditivni, recesivni in dominantni model.

Preglednica XVI: p - vrednosti pri ugotavljanju vpliva polimorfizmov v genu *NR112* na farmakokinetiko rifampicina.

Aditivni model										
	rs3814055		rs2276707		rs6785049		rs7643645		rs2472677	
c_1	0,877		0,035		0,029		0,718		0,549	
c_2	0,485		0,563		0,680		0,434		0,246	
Cl_1	0,584		0,080		0,067		0,882		0,785	
Cl_2	0,461		0,117		0,541		0,629		0,356	
V_2	0,773		0,703		0,683		0,979		0,107	
t_{50}	0,429		0,527		0,169		0,508		0,071	
Recesivni in dominantni model										
	rs3814055		rs2276707		rs6785049		rs7643645		rs2472677	
	RM	DM	RM	DM	RM	DM	RM	DM	RM	DM
c_1	0,616	0,935	0,027	0,053	0,043	0,027	0,647	0,647	0,571	0,509
c_2	0,464	0,398	0,708	0,358	0,637	0,579	0,646	0,127	0,140	0,729
Cl_1	0,452	0,336	0,251	0,638	0,770	0,123	0,728	0,640	0,997	0,503
Cl_2	0,389	0,240	0,211	0,051	0,487	0,297	0,347	0,572	0,447	0,340
V_2	0,480	0,676	0,886	0,457	0,677	0,549	0,849	0,884	0,034	0,650
t_{50}	0,197	0,484	0,687	0,378	0,409	0,181	0,703	0,382	0,987	0,027

Rezultati aditivnega modela so pridobljeni z ANOVO, rezultati recesivnega in dominantnega pa s t -testom. RM = rezultati pridobljeni z recesivnim modelom; DM = rezultati pridobljeni z dominantnim modelom; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki; V_2

= porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas. *Krepko so označeni mejno signifkantni rezultati, krepko in podčrtano pa signifkantni rezultati.*

Pri polimorfizmu rs3814055 nismo ugotovili značilnih rezultatov niti z aditivnim niti z recesivnim modelom, medtem ko smo v literaturi zasledili poročila o zvišani indukciji CYP3A4 (39, 40).

Za polimorfizem rs2276707 smo z vsemi modeli ugotovili značilne rezultate za koncentracijo v prvi časovni točki (aditivni: $p = 0,035$; recesivni: $p = 0,027$; dominantni: $p = 0,053$). Pri aditivnem modelu ($p = 0,039$) imajo mutirani homozigoti ($n = 2$; $c_1 = 6,88$ mg/L) višjo koncentracijo kot nemutirani homozigoti ($n = 19$; $c_1 = 1,65$ mg/L), pri recesivnem imajo mutirani homozigoti ($n = 2$; $c_1 = 6,88$ mg/L) višjo koncentracijo kot združeni nemutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 29$; $c_1 = 2,16$ mg/L), pri dominantnem pa nemutirani homozigoti ($n = 19$; $c_1 = 1,65$ mg/L) nižjo koncentracijo kot združeni mutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 12$; $c_1 = 3,75$ mg/L). Statistično mejno značilen rezultat smo pri aditivnem modelu ugotovili tudi pri očistku v prvi časovni točki ($p = 0,080$), pri dominantnem modelu pa pri očistku v drugi časovni točki ($p = 0,051$), kjer imajo nemutirani homozigoti ($n = 28$; $Cl_2 = 31,37$ L/h) višji očistek kot združeni mutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 28$; $Cl_2 = 20,99$ L/h). V literaturi omenjajo, da prisotnost polimorfizma povzroči indukcijo črevesnega CYP3A, kar se ne sklada z našimi rezultati, saj indukcija CYP3A pomeni znižane koncentracije substratov (40). Neujemanja so lahko posledica majhnega števila mutiranih homozigotov, povezujemo pa jih lahko tudi z dejstvom, da je že v populaciji naše študije razmerje med genotipi drugačno kot v centralno evropski populaciji (poglavje 4.3).

Tudi pri polimorfizmu rs6785049 smo z vsemi modeli ugotovili značilne razlike pri koncentraciji v prvi časovni točki (aditivni: $p = 0,029$; recesivni: $p = 0,043$; dominantni: $p = 0,027$). Z aditivnim modelom smo ugotovili, da imajo nemutirani homozigoti višjo koncentracijo ($n = 2$; $c_1 = 6,87$ mg/L) od mutiranih homozigotov ($n = 13$; $c_1 = 1,31$ mg/L), z recesivnim da imajo mutirani homozigoti ($n = 13$; $c_1 = 1,31$ mg/L) nižjo koncentracijo od združenih nemutiranih homozigotov in heterozigotov ($n = 18$; $c_1 = 3,29$ mg/L) z dominantnim pa, da imajo nemutirani homozigoti ($n = 2$; $c_1 = 6,87$ mg/L) višje koncentracije od združenih mutiranih homozigotov in heterozigotov ($n = 29$; $c_1 = 2,16$ mg/L). Z aditivnim modelom smo ugotovili mejne razlike tudi pri očistku v prvi časovni točki ($p = 0,067$). V že

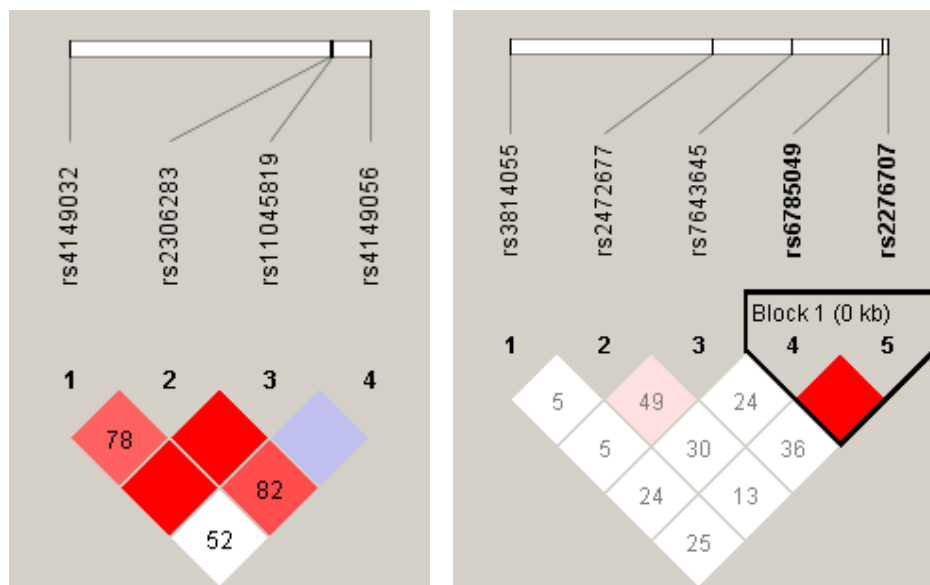
objavljenih študijah smo našli podatke o zvišani indukciji črevesnega CYP3A, kar se izraža predvsem pri mutiranih homozigotih, kar se sklada tudi z našimi ugotovitvami (40).

Za polimorfizem rs7643645 z nobenim modelom nismo ugotovili statistično značilnih rezultatov, medtem ko v literaturi pri prisotnosti polimorfizma omenjajo znižano bazalno aktivnost CYP3A4, po jemanju rifampicina pa zvišano indukcijo (39).

Pri polimorfizmu rs2472677 smo za razpolovni čas ugotovili mejno značilne rezultate z aditivnim in značilne rezultate z dominantnim modelom (aditivni: $p = 0,071$; dominantni: $p = 0,027$). Pri aditivnem se nemutirani homozigoti mejno razlikujejo od heterozigotov ($p = 0,057$) in sicer imajo slednji ($n = 26$; $t_{50} = 393,00$ min) krajši razpolovni čas kot nemutirani homozigoti ($n = 5$; $t_{50} = 535,98$ min), pri dominantnem pa imajo združeni mutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 51$; $t_{50} = 404,01$ min) ravno tako krajši razpolovni čas kot nemutirani homozigoti ($n = 5$; $t_{50} = 535,98$ min). Z recesivnim modelom smo ugotovili značilen rezultat tudi pri porazdelitvenem volumnu ($p = 0,034$), kjer imajo mutirani homozigoti ($n = 25$; $V_2 = 63,10$ L) manjši porazdelitveni volumen kot združeni nemutirani homozigoti in heterozigoti ($n = 31$; $V_2 = 67,38$ L). V študijah so ugotovili, da prisotnost polimorfizma povzroči večjo bazalno aktivnost CYP3A4, indukcija po jemanju rifampicina pa je pri prisotnosti mutiranih alelov manjša kot pri nemutiranih homozigotih, kar je v skladu z našimi ugotovitvami (39).

4.5 Določanje haplotipov

Haplotipi so skupine alelov, ki se nahajajo na istem kromosomu in se dedujejo skupaj (53). Haplotipe na nivoju preučevane populacije smo določali s pomočjo programa Haploview. Vezavno neravnovesje (LD – ang. linkage disequilibrium) med posameznimi polimorfizmi je prikazano na sliki 9. Številke v kvadratih nam povejo, kakšna je verjetnost, da se alela dedujeta skupaj – višja številka oziroma bolj intenzivna rdeč barva pomeni večjo verjetnost skupnega dedovanja.



Slika 9: Prikaz vezavnega neravnovesja med polimorfizmi v genih *SLCO1B1* in *NR1I2* v naši populaciji.

Levo za gen *SLCO1B1*, desno za gen *NR1I2*.

V genu *SLCO1B1* smo našli povezavo med polimorfizmom rs4149032 in rs2306283, rs4149032 in rs11045819, rs2306283 in rs11045819 ter med polimorfizmoma rs11045819 in rs4149056. V genu *NR1I2* pa smo za našo populacijo našli povezavo med polimorfizmoma rs6785049 in rs2276707, ki ju je program zaradi dobrega ujemanja združil v haplotipni blok. Za omenjene haplotipe smo povezanost polimorfizmov preverili še na nivoju posameznikov, za kar smo uporabili program PHASE. Določali smo jih zato, ker včasih bolje pokažejo vpliv polimorfizmov na farmakokinetične parametre, vendar jim v naši študiji zaradi majhnega števila rezultatov v nekaterih skupinah ne moremo dati večjega pomena. Haplotipi posameznega pacienta so prikazani v prilogi F.

4.6 Vpliv haplotipov na farmakokinetiko rifampicina

Preverili smo vpliv zgoraj omenjenih haplotipov na posamezne farmakokinetične parametre. Ker se je v literaturi za gen *NR1I2* pogosto pojavljal opis kombinacije polimorfizmov rs3814055, rs6785049 in rs2276707 kot haplotipa TGT, smo preverili tudi vpliv tega haplotipa, kljub temu, da za našo populacijo ni pokazal značilne povezanosti. Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami posameznih parametrov za vsak haplotip so predstavljene v prilogi G za gen *SLCO1B1* in v prilogi H za gen *NR1I2*.

Najprej smo ugotovili, kateri haplotipi so za posameznika najverjetnejši in izločili tiste, za katere je bila verjetnost manjša kot 95 %. Podatki, ki smo jih uporabili na nadaljnje izračune, so prikazani v prilogi E. Nato smo preverili, koliko kopij posameznega haplotipa ima vsak pacient in iz pridobljenih podatkov s programom SPSS ugotavljali vpliv števila teh kopij na farmakokinetične parametre. Zaradi majhnega števila podatkov smo preverjali vpliv prisotnosti haplotipa v eni ali dveh kopijah glede na odsotnost haplotipa, uporabili pa smo t-test. Rezultati so prikazani v preglednici XVII za gen *SLCO1B1* in v preglednici XVIII za gen *NR1H2*.

Preglednica XVII: p - vrednosti za vpliv haplotipov na farmakokinetiko rifampicina v genu *SLCO1B1*.

	2,4-AT	2,4-GC	2,4-GT	2,3-AC	2,3-GC	2,3-GA	1,3-CC	1,3-TC	1,3-TA	1,2-CA	1,2-CG	1,2-TA	1,2-TG
c ₁	0,534	0,896	0,463	0,437	0,454	0,458	0,926	0,829	0,458	0,672	0,795	<u>≤0,001</u>	0,561
c ₂	0,556	0,633	0,240	0,518	0,321	0,711	0,562	0,480	0,711	0,401	0,864	0,570	0,449
Cl ₁	0,304	<u>0,027</u>	0,834	0,509	0,073	0,425	0,096	0,408	0,425	0,599	0,277	0,262	0,723
Cl ₂	0,397	0,722	0,773	0,461	0,622	0,544	0,602	0,427	0,544	0,562	0,903	0,793	0,578
V ₂	0,612	0,640	0,460	0,545	0,412	0,672	0,962	0,385	0,672	0,703	0,977	0,852	0,364
t ₅₀	0,461	0,990	0,954	0,375	0,988	0,893	0,077	0,668	0,893	0,153	0,878	0,846	0,822

2,4 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs2306283 in rs4149056; 2,3 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs2306283 in rs11045819; 1,3 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs4149032 in rs11045819; 1,2 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs4149032 in rs2306283. c₁ = koncentracija v prvi časovni točki; c₂ = koncentracija v drugi časovni točki; Cl₁ = očistek v prvi časovni točki; Cl₂ = očistek v drugi časovni točki; V₂ = porazdelitveni volumen; t₅₀ = razpolovni čas. Krepko so označeni mejno signifikantni rezultati, krepko in podčrtano pa signifikantni rezultati.

Preglednica XVIII: *p* - vrednosti za vpliv haplotipov na farmakokinetiko rifampicina v genu NR112.

	4,5-AC	4,5-GC	4,5-GT	1,4,5-CAC	1,4,5-CGC	1,4,5-CGT	1,4,5-TAC	1,4,5-TGT
<i>c</i> ₁	<u>0,027</u>	0,944	0,053	0,246	<u>0,001</u>	0,182	<u>0,021</u>	0,212
<i>c</i> ₂	0,579	0,455	0,358	0,434	0,758	0,528	0,457	0,413
Cl ₁	0,123	0,814	0,638	0,672	0,225	0,219	0,132	0,854
Cl ₂	0,297	0,146	0,051	0,140	0,659	0,376	0,524	0,287
V ₂	0,549	0,401	0,457	0,779	0,148	0,869	0,620	0,874
<i>t</i> ₅₀	0,181	0,316	0,378	0,678	0,636	0,960	0,465	0,165

4,5 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs6785049 in rs2276707; 1,4,5 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs3814055, rs6785049 in rs2276707. *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; Cl₁ = očistek v prvi časovni točki; Cl₂ = očistek v drugi časovni točki; V₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas. Krepko so označeni mejno signifikantni rezultati, krepko in podčrtano pa signifikantni rezultati.

4.6.1 Haplotipi v genu *SLCO1B1*

V genu *SLCO1B1* smo značilne razlike ugotovili pri haplotipu GC, ki ga sestavljata mutirana alela polimorfizmov rs2306283 in rs4149056 (haplotip 2,4); oziroma v literaturi najpogosteje omenjen kot haplotip *SLCO1B1**15, in sicer za očistek v prvi časovni točki ($p = 0,027$). Razlika je značilna med tistimi, ki nimajo nobene kopije tega haplotipa ($n = 41$; $Cl_1 = 8,79$ L/h), in tistimi, ki imajo vsaj eno kopijo ($n = 7$; $Cl_1 = 6,56$ L/h), kar pomeni, da prisotnost kopije tega haplotipa zmanjša očistek. Ti rezultati potrjujejo tiste, ki smo jih pridobili za genotipe, saj je tudi pri prisotnosti polimorfizma rs4149056 očistek v prvi časovni točki manjši. Za ta haplotip so vezavno neravnovesje odkrili tudi Ling-Ming Li in ostali (30).

Mejno signifikantne rezultate smo ugotovili pri haplotipu GC, ki ga sestavljata mutiran alel polimorfizma rs2306283 in nemutiran alel polimorfizma rs11045819 (haplotip 2,3), za očistek v prvi časovni točki ($p = 0,073$) in sicer prisotnost haplotipa ($n = 25$; $Cl_1 = 7,05$ L/h) povzroči manjši očistek, kot ga imajo osebe brez omenjenega haplotipa ($n = 31$; $Cl_1 = 9,03$ L/h). Rezultati se skladajo z rezultati za polimorfizem rs11045819, kjer imajo pacienti z nemutiranim alelom daljši razpolovni čas.

Mejno pomembne razlike smo ugotovili tudi med številom kopij pri haplotipu CC z nemutiranimi aleloma polimorfizmov rs4149032 in rs11045819 (haplotip 1,3) v razpolovnem času ($p = 0,077$), in sicer je razpolovni čas pri osebah z nič kopijami ($n = 8$; $t_{50} = 341,76$ min) krajši kot pri osebah z vsaj eno kopijo ($n = 48$; $t_{50} = 428,14$ min). Za isti haplotip smo mejno signifikantne rezultate ugotovili tudi za očistek v prvi časovni točki ($p = 0,096$), ki je pri osebah z vsaj eno kopijo haplotipa ($n = 48$; $Cl_1 = 7,77$ L/h) manjši kot pri osebah brez tega haplotipa ($n = 8$; $Cl_1 = 10,38$ L/h). Rezultati se ujemajo s tistimi, ki smo jih pridobili za genotipe, saj imajo tudi tam osebe z nemutiranimi aleli daljši razpolovni čas in manjši očistek v prvi časovni točki.

Značilna je tudi razlika pri haplotipu TA iz mutiranega alela polimorfizma rs4149032 in nemutiranega alela polimorfizma rs2306283 (haplotip 1,2), kjer se izraža med vsaj eno ($n = 2$; $c_1 = 0,16$ mg/L) oziroma nič ($n = 29$; $c_1 = 2,62$ mg/L) kopijami v koncentraciji v prvi časovni točki ($p < 0,001$) in sicer prisotnost haplotipa povzroči precej nižje koncentracije v prvi časovni točki. Rezultati so v skladu z rezultati za genotipe, saj mutiran alel v polimorfizmu rs4149032 povzroča krajši razpolovni čas in večji očistek, kar lahko prispeva k manjši koncentraciji pri tem haplotipu.

4.6.2 Haplotipi v genu *NR1I2*

V genu *NR1I2* smo značilne razlike ugotovili v haplotipu AC iz mutiranega alela polimorfizma rs6785049 in nemutiranega alela polimorfizma rs2276707 (haplotip 4,5) in sicer pri koncentraciji v prvi časovni točki ($p = 0,027$), kjer se značilno razlikujejo vrednosti pri vsaj eni kopiji ($n = 29$; $c_1 = 2,16$ mg/L) glede na tiste pri nič ($n = 2$; $c_1 = 6,88$ mg/L) kopijah in sicer prisotnost vsaj ene kopije povzroči nižje koncentracije. Pridobljeni rezultati potrjujejo ugotovitve vpletenih posameznih polimorfizmih, saj mutiran alel pri rs6785049 in nemutiran alel pri rs2276707 prinašata nižje koncentracije v prvi časovni točki.

Mejno značilne razlike so tudi v haplotipu GT (G je nemutiran alel, T je mutiran alel) iz istih polimorfizmov kot so omenjeni zgoraj, ugotovili pa smo jih ravno tako pri koncentraciji v prvi časovni točki, kjer se razlikujejo vrednosti pri nič ($n = 19$; $c_1 = 1,64$ mg/L) kopijah glede na vrednosti pri eni oziroma dveh ($n = 12$; $c_1 = 3,74$ mg/L) kopijah ($p = 0,053$), kar nakazuje na to, da prisotnost vsaj ene kopije haplotipa povzroči višje koncentracije v prvi časovni točki. Mejno pomemben je tudi očistek v drugi časovni točki ($p = 0,051$), kjer prisotnost haplotipa ($n = 28$; $Cl_2 = 20,99$ L/h) prinese nižji očistek, kot ga imajo osebe brez haplotipa ($n = 28$; $Cl_1 = 31,37$ L/h). Rezultati tako kot pri prejšnjem haplotipu potrjujejo ugotovitve, ki smo jih pridobili s preučevanjem posameznih polimorfizmov. Za ta haplotip so vezavno neravnovesje odkrili tudi Jae Yong Chung in ostali ter Lichen Gao in ostali (41, 42).

Statistično pomembne razlike smo ugotovili tudi pri haplotipu CGC iz nemutiranih alelov polimorfizmov rs3814055, rs6785049 in rs2276707 (haplotip 1,4,5) in sicer pri koncentraciji v prvi časovni točki ($p = 0,001$) med skupinama z nič ($n = 23$; $c_1 = 2,31$ mg/L) in vsaj eno ($n = 2$; $c_1 = 0,07$ mg/L) kopijo haplotipa, kar pomeni, da prisotnost haplotipa zmanjša koncentracijo. Rezultati se ne ujemajo z rezultati za posamezne polimorfizme, saj nemutiran alel pri rs6785049 izkazuje višje koncentracije, kar lahko razložimo z majhno skupino preiskovancev z vsaj eno kopijo tega haplotipa (2 osebi).

Značilen rezultat smo ugotovili tudi pri haplotipu TAC (T in A sta mutirana alela, C je nemutiran alel) iz istih polimorfizmov pri koncentraciji v prvi časovni točki ($p = 0,021$), kjer imajo osebe s prisotnim haplotipom ($n = 8$; $c_1 = 0,71$ mg/L) nižje koncentracije kot osebe brez haplotipa ($n = 17$; $c_1 = 2,81$ mg/L). Rezultati potrjujejo ugotovitve, ki smo jih pridobili s preučevanjem posameznih polimorfizmov. Ta dva haplotipa so določili tudi v drugih študijah, vendar je pomembnejše rezultate prinašal haplotip TGT iz istih polimorfizmov, za katerega nismo ugotovili nobenih značilnih rezultatov (41, 42).

5 Sklepi

V nalogi smo ugotavljali vpliv izbranih polimorfizmov v genih *SLCO1B1*, *ABCB1* in *NR1I2* na koncentracijo rifampicina v plazmi in na njegovo farmakokinetiko. Študij, ki bi preučevale vpliv polimorfizmov na terapijo z rifampicinom pri pacientih z ortopedskimi endoprotezami do sedaj še niso izvajali. Ugotovili smo, da:

- V genu *SLCO1B1* prisotnost mutiranega alela polimorfizma rs4149056 povzroči manjši očistek v prvi časovni točki, kot je pri nemutiranih homozigotih ($Cl_{1(nemut)} = 8,92$ L/h, $Cl_{1(het)} = 6,21$ L/h, $p = 0,005$).
- V genu *ABCB1* prisotnost mutiranega alela polimorfizma rs1045642 povzroči višji očistek v prvi in drugi časovni točki ($Cl_{1(nemut)} = 5,03$ L/h, $Cl_{1(het)} = 9,01$ L/h, $Cl_{1(mut)} = 8,45$ L/h, $p_1 = 0,024$; $Cl_{2(nemut)} = 17,48$ L/h, $Cl_{2(mut)} = 28,07$ L/h, $p_2 = 0,026$) ter krajši razpolovni čas pri heterozigotih ($t_{50(nemut)} = 483,25$ min, $t_{50(het)} = 373,90$ min, $t_{50(mut)} = 457,42$ min, $p = 0,019$).
- V genu *NR1I2* prisotnost dveh mutiranih alelov polimorfizma rs2276707 povzroči višje koncentracije v prvi časovni točki ($c_{1(nemut + het)} = 2,16$ mg/L, $c_{1(mut)} = 6,88$ mg/L, $p = 0,027$). Prisotnost dveh mutiranih alelov polimorfizma rs6785049 povzroči nižje koncentracije v prvi časovni točki ($c_{1(nemut)} = 6,87$ mg/L, $c_{1(het + mut)} = 2,16$ mg/L, $p = 0,027$). Prisotnost mutiranega alela polimorfizma rs2472677 povzroči krajši razpolovni čas ($t_{50(nemut)} = 535,98$ min, $t_{50(het + mut)} = 404,01$ min, $p = 0,027$) in manjši porazdelitveni volumen ($V_{2(nemut + het)} = 67,38$ L, $V_{2(mut)} = 63,10$ L, $p = 0,034$).
- V genu *SLCO1B1* vsaj ena kopija haplotipa GC, ki ga sestavljata polimorfizma rs2306283 in rs4149056, povzroči manjši očistek v prvi časovni točki ($Cl_{1(0\ kopij)} = 8,79$ L/h, $Cl_{1(vsaj\ 1\ kopija)} = 6,56$ L/h, $p = 0,027$). Vsaj ena kopija haplotipa TA iz polimorfizmov rs4149032 in rs2306283 pa povzroči nižje koncentracije v prvi časovni točki ($c_{1(0\ kopij)} = 2,62$ mg/L, $c_{1(vsaj\ 1\ kopija)} = 0,15$ mg/L, $p < 0,001$).
- V genu *NR1I2* vsaj ena kopija haplotipa AC iz polimorfizmov rs6785049 in rs2276707 povzročita nižje koncentracije v prvi časovni točki ($c_{1(0\ kopij)} = 6,88$ mg/L, $c_{1(vsaj\ 1\ kopija)} = 2,16$ mg/L, $p = 0,027$). Vsaj ena kopija haplotipa CGC iz polimorfizmov rs3814055, rs6785049 in rs2276707 povzroči nižjo koncentracijo v prvi časovni točki ($c_{1(0\ kopij)} = 2,31$ mg/L, $c_{1(vsaj\ 1\ kopija)} = 0,07$ mg/L, $p < 0,001$). Vsaj ena kopija haplotipa TAC iz polimorfizmov rs3814055, rs6785049 in rs2276707

povzroči nižjo koncentracijo v prvi časovni točki ($c_{1(0 \text{ kopij})} = 2,81 \text{ mg/L}$, $c_{1(\text{vsaj } 1 \text{ kopija})} = 0,71 \text{ mg/L}$, $p = 0,021$).

- Pomembnejši so vplivi na parametre za prvo časovno točko, kar pomeni pred začetkom izražanja avtoindukcije.

Na osnovi zgoraj napisanega smo hipotezo delno potrdili. Z ugotovitvami, kateri polimorfizmi vplivajo na obnašanje rifampicina v telesu, bi lahko pripravili osebne režime zdravljenja in tako omogočili bolj uspešno zdravljenje. V bodoče bi bilo smiselno študijo opraviti na večji populaciji in vključiti polimorfizem rs4149056 iz gena *SLCO1B1*, polimorfizem rs1045642 iz gena *ABCB1* ter polimorfizme rs2276707, rs6785049 in rs2472677 iz gena *NR1H2*.

6 Literatura

1. Spine-health: <https://www.spine-health.com/glossary/orthopedic-implants>. Dostop: 22.06.2017.
2. Tande A J in Patel R: Prosthetic Joint Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2014; 27(2): 302–345.
3. Zimmerli W in Moser C: Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *Immunology & Medical Microbiology*, 2012; 65: 158–168.
4. ResearchGate:
https://www.researchgate.net/publication/7792801_Van_Houdt_R_Michiels_CW_Role_of_bacterial_cell_surface_structures_in_Escherichia_coli_biofilm_formation_Research_Microbiol_156_626-633. Dostop: 22.06.2017.
5. Samuel J in Gould F: Prosthetic joint infections: single versus combination therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010; 65: 18–23.
6. Aboltins C A, Page M A, Buising K L, Jenney A W J, Daffy J R in Choong P F M: Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement , prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid. *Clinical microbiology and infection*, 2007; 13: 586–591.
7. Trebse R, Pisot V in Trampuz A: Treatment of infected retained implants. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 2005; 87–B(2): 249–256.
8. Berdal J E, Skramm I, Mowinckel P, Gulbrandsen P in Bjørnholt J V: Use of rifampicin and ciprofloxacin combination therapy after surgical debridement in the treatment of early manifestation prosthetic joint infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 2005; 11(10): 843–855.
9. Phillips I: Clinical uses and control of rifampicin and clindamycin. *Journal of Clinical Pathology*, 1971; 24: 410–418.
10. Forrest G N in Tamura K: Rifampin Combination Therapy for Nonmycobacterial Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010; 23(1): 14–34.
11. DrugBank: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01045>. Dostop: 29.10.2016.

12. Chemical Book:
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7474473.htm.
Dostop: 22.06.2017.
13. Acocella G: Clinical Pharmacokinetics of Rifampicin. *Clinical Pharmacokinetics*, 1978; 3(2): 108–127.
14. Shimomura H, Nogami R, Shigeno A, Shimada S in Aoyama T: Influence of Food on Rifampicin Pharmacokinetics in Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016; 39(1): 49–53.
15. Ellard G A in Fourie P B: Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 1999; 3(11): S301–S308.
16. Zilly W, Breimer D in Richter E: Pharmacokinetic Interactions with Rifampicin. *Clinical Pharmacokinetics*, 1977; 2: 61–70.
17. Sutrisna E: Autoinduction Properties of Rifampicin on Javanese Tuberculosis with Variant Type CYP3A4*1G. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2015; 8(4): 21–23.
18. Niemi M, Backman J T, Fromm M F, Neuvonen P J in Kivist K T: Pharmacokinetic Interactions with Rifampicin. *Clinical Pharmacokinetics*, 2003; 42(9): 819–850.
19. GeneCards: <http://www.genecards.org>. Dostop: 15.05.2017.
20. Niemi M, Pasanen M K in Neuvonen P J: Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 : a Genetically Polymorphic Transporter of Major Importance for Hepatic Drug Uptake. *Pharmacological Reviews*, 2011; 63(1): 157–181.
21. Genetics Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. Dostop: 20.06.2017.
22. Roth M, Obaidat A in Hagenbuch B: OATPs , OATs and OCTs : the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British Journal of Pharmacology*, 2012; 165: 1260–1287.
23. Weiner M, Peloquin C, Burman W, Luo C, Engle M, Prihoda T J, Kenzie W R Mac, Bliven-sizemore E, Johnson J L in Vernon A: Effects of Tuberculosis , Race , and Human Gene SLCO1B1 Polymorphisms on Rifampin Concentrations. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy, 2010; 54(10): 4192–4200.
24. Ostanek B: Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma. Farmaceutski vestnik, 2009; 60: 3–7.
 25. Ensembl: <http://www.ensembl.org>. Dostop: 20.06.2017.
 26. National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5243>. Dostop: 22.06.2017.
 27. Kwara A, Cao L, Yang H, Poethke P in Kurpewski J: Factors Associated with Variability in Rifampin Plasma Pharmacokinetics and the Relationship between Rifampin Concentrations and Induction of Efavirenz Clearance. National Institutes of Health, 2015; 34(3): 265–271.
 28. Chigutsa E, Visser M E, Swart E C, Denti P, Pushpakom S, Egan D, Holford N H G, Smith P J, Maartens G, Owen A in Mcilleron H: The SLCO1B1 rs4149032 Polymorphism Is Highly Prevalent in South Africans and Is Associated with Reduced Rifampin Concentrations: Dosing Implications. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011; 55(9): 4122–4127.
 29. Gengiah T N, Botha J H, Soowamber D, Naidoo K in Karim S S A: Low rifampicin concentrations in tuberculosis patients with HIV infection. The Journal of Infection in Developing Countries, 2014; 8(8): 987–993.
 30. Li L, Chen L, Deng G, Tan W, Dan Y, Wang R in Chen W: SLCO1B1 * 15 haplotype is associated with rifampin-induced liver injury. Molecular Medicine Reports, 2012; 6: 75–82.
 31. Geick A, Eichelbaum M, Burk O in Tu D-: Nuclear Receptor Response Elements Mediate Induction of Intestinal MDR1 by Rifampin. The Journal of Biological Chemistry, 2001; 276(18): 14581–14587.
 32. Weiner M, Burman W, Luo C, Peloquin C A, Engle M, Goldberg S, Agarwal V in Vernon A: Effects of Rifampin and Multidrug Resistance Gene Polymorphism on Concentrations of Moxifloxacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007; 51(8): 2861–2866.
 33. Sutrisna E M, Dwiprahasto I, Astuti I in Kristin E: The Impacts of MDR1 C3435T

- Gene Polymorphism towards Plasma Rifampicin Levels in Javanese Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015; 7(9): 647–651.
34. Ambudkar S V, Kim I in Sauna Z E: The power of the pump : Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2005; 27: 392–400.
35. Sauna Z E, Smith M M, Marianna M in Kerr K M: The Mechanism of Action of Multidrug-Resistance-Linked P-Glycoprotein. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2001; 33(6): 481–491.
36. Kliewer S A, Goodwin B in Willson T M: The Nuclear Pregnane X Receptor : A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews*, 2002; 23(5): 687–702.
37. Nieuwoudt E: Effect of genetic variants in genes encoding two nuclear receptors (PXR and CAR) on efavirenz levels and treatment outcome in South African HIV-infected females. Stellenbosch University, 2014.
38. Kotta-loizou I, Patsouris E in Theocharis S: Pregnane X receptor polymorphisms associated with human diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2013; 17(10): 1–11.
39. Lamba J, Lamba V, Strom S, Venkataramanan R in Schuetz E: Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the Promoter and Intron 1 of Human Pregnane X Receptor/NR1I2 and Their Association with CYP3A4 Expression. *Drug Metabolism and Disposition*, 2008; 36(1): 169–181.
40. Zhang J, Kuehl P, Green E D, Touchman J W, Hudson J R, Schuetz E G in Boguski M S: The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*, 2001; 11: 555–572.
41. Gao L, He Y, Tang J, Yin J, Huang Z, Liu F, Ouyang D, Chen X, Zhang W, Liu Z in Zhou H: Genetic Variants of Pregnane X Receptor (PXR) and CYP2B6 Affect the Induction of Bupropion Hydroxylation by Sodium Ferulate. *PLoS ONE*, 2013; 8(6): 1–9.
42. Chung J Y, Cho J, Lim H, Kim J, Yu K, Lim K S, Shin S in Jang I: Effects of Pregnane

- X Receptor (NR1I2) and CYP2B6 Genetic Polymorphisms on the Induction of Bupropion Hydroxylation by Rifampin. *Drug Metabolism and Disposition*, 2011; 39(1): 92–97.
43. Reuter T, Warta R, Theile D, Meid A D, Rigalli J P, Mogler C, Herpel E, Grabe N, Lahrmann B, Plinkert P K, Herold-mende C, Dyckhoff G, Haefeli W E in Weiss J: Role of NR1I2 (pregnane X receptor) polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2015; 2: .
44. QIAGEN: FlexiGene DNA Handbook. 2010.
45. Mlakar Š: Vpliv izbranih polimorfizmov v genih OPRM1, ABCB1 in COMT na varnost in učinkovitost terapije s fentanilom pri otrocih. 2014; 1–71.
46. QIAGEN: QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2016.
47. Černe D in Ostanek B: Biomedicinska analitika 1. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012.
48. Adamič Š: Temelji biostatistike. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana 1989.
49. Laerd statistics: <https://statistics.laerd.com>. Dostop: 20.01.2017.
50. Broad Institute: <https://www.broadinstitute.org>. Dostop: 25.01.2017.
51. Scitable by nature education: <https://www.nature.com/scitable/definition/hardy-weinberg-equilibrium-122>. Dostop: 29.06.2017.
52. Bogataj M, Mrhar A, Kerec Kos M, Trontelj J, Vovk T in Pišlar M: Biofarmacija s farmakokinetiko. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2013.
53. Gene planet: <https://www.geneplanet.si>. Dostop: 23.07.2017.

7 Priloge

Priloga A: Koncentracije in čistost vzorcev DNA po izolaciji

vzorec	260/280	260/230	c [ng/ μ L]
1R	1,89	1,49	108,4
2R	1,91	1,08	8,9
3R	1,84	1,69	317,6
4R	1,83	1,67	395,8
5R	1,81	1,72	428,8
6R	2,04	1,29	11,4
7R	1,85	1,36	171,9
8R	1,86	1,25	120,8
9R	1,87	1,49	190,5
10R	1,91	1,50	158,9
11R	1,82	1,75	353,2
12R	1,81	1,95	507,6
13R	1,87	1,77	235,6
14R	1,90	1,55	190,4
15R	1,88	1,83	653,2
16R	1,93	1,23	123,4
17R	1,82	1,49	332,8
18R	2,02	0,65	40,8
19R	1,86	1,93	323,2
20R	1,81	1,71	373,3
21R	1,84	1,89	365,5
22R	1,80	1,85	479,0
23R	1,82	1,71	373,1
24R	1,85	1,85	375,0
25R	1,90	1,14	97,1
26R	1,88	1,41	209,5
27R	1,89	1,59	198,5
28R	1,93	1,11	91,9
29R	1,85	1,44	128,2
30R	1,83	1,57	285,7
31R	1,99	0,68	56,0
32R	1,87	1,73	186,8
33R	2,39	0,24	17,7
34R	1,84	1,86	392,0
35R	1,89	1,42	153,1
36R	1,86	1,82	383,5
37R	1,89	1,65	287,2
38R	1,92	1,52	186,2
39R	1,90	1,63	121,3

vzorec	260/280	260/230	c [ng/ μ L]
40R	1,85	1,88	446,2
41R	1,83	1,96	546,9
42R	1,87	1,55	235,6
43R	1,92	1,41	167,0
44R	1,90	1,44	165,5
45R	1,88	1,67	254,2
46R	1,96	0,87	68,7
47R	1,84	1,75	386,7
48R	1,83	2,13	520,6
49R	1,99	1,23	93,2
50R	1,93	1,89	299,3
51R	1,91	1,95	358,4
52R	1,94	1,72	212,4
53R	1,89	2,04	345,5
54R	1,93	1,71	209,5
55R	1,98	1,18	82,5
56R	1,89	1,86	192,8
57R	1,84	2,08	363,0
58R	1,92	1,78	345,4
59R	1,92	2,06	694,9
60R	2,02	1,24	117,3
61R	1,97	1,50	196,1
62R	1,90	1,73	304,5
63R	1,89	1,89	410,0
64R	1,87	1,94	296,1
65R	1,82	1,63	237,5
66R	2,04	0,59	36,0
67R	1,81	1,74	571,7
68R	1,79	2,05	492,3
69R	1,83	2,00	323,4
70R	1,88	1,35	269,2
71R	1,84	1,71	502,4
72R	1,83	2,07	449,8
73R	1,86	1,31	75,7
74R	1,80	1,52	204,8
75R	1,88	2,29	678,1
76R	1,89	1,11	206,3
77R	1,81	1,46	144,9
78R	1,85	1,84	248,0

vzorec	260/280	260/230	c [ng/ μ L]
79R	1,77	1,52	582,4
80R	1,85	1,96	320,6
81R	1,85	1,89	252,3

vzorec	260/280	260/230	c [ng/ μ L]
82R	1,82	1,38	104,8
83R	1,89	1,92	1253,3

Priloga B: Genotipi polimorfizmov v genih *SLCO1B1* in *ABCB1*

	<i>SLCO1B1</i>				<i>ABCB1</i>
	rs2306283	rs4149032	rs4149056	rs11045819	rs1045642
1R	AG	CC	CT	CC	TC
2R	AG	CT	TT	CC	TC
3R	AG	CT	TT	CC	TC
4R	AG	CT	TT	CA	TC
5R	GG	CT	CT	CC	TC
6R	AG	CT	TT	CA	TC
7R	GG	CT	CT	CC	TC
8R	GG	CT	CT	CC	TT
9R	AA	CC	TT	CC	TC
10R	AA	CC	TT	CC	TC
11R	AA	CC	TT	CC	TC
12R	AG	CT	TT	CC	TC
13R	GG	TT	TT	CA	TT
14R	AG	CC	CT	CC	CC
15R	AG	CC	CT	CC	TT
16R	AA	CC	TT	CC	TC
17R	AA	CT	TT	CC	TC
18R	AA	CC	TT	CC	TT
19R	AG	CT	TT	CA	TT
20R	AA	CC	TT	CC	TC
21R	AA	CC	TT	CC	TT
22R	AG	CT	TT	CA	TT
23R	GG	TT	TT	AA	TT
24R	AG	CT	TT	CA	CC
25R	AG	CT	CT	CC	TT
26R	AG	CT	TT	CA	TC
27R	AA	CC	TT	CC	TC
28R	AG	TT	TT	CA	TC
29R	AG	CT	TT	CA	TT
30R	AG	CT	TT	CC	TC
31R	AG	CT	TT	CC	TC
32R	GG	TT	TT	AA	TC
33R	GG	TT	TT	CC	TT
34R	GG	CT	CT	CA	TC
35R	GG	CT	CT	CA	CC

36R	AA	CT	TT	CC	CC
37R	AG	CC	TT	CC	TC
38R	AG	CT	CT	CC	CC
39R	AA	CC	TT	CC	TT
40R	AA	CC	CT	CC	CC
41R	GG	TT	CT	CA	CC
42R	AA	CC	TT	CC	TC
43R	AA	CC	TT	CC	TC
44R	GG	TT	TT	AA	TC
45R	AG	CT	TT	CA	TC
46R	AA	CC	TT	CC	TC
47R	AG	CC	CT	CC	CC
48R	AG	CC	CT	CC	CC
49R	AG	CT	TT	CA	TT
50R	AG	CT	TT	CC	TT
51R	AG	CT	CT	CC	TC
52R	AA	CC	TT	CC	TT
53R	AG	CC	TT	CC	CC
54R	AA	TT	TT	CC	TC
55R	GG	CT	CT	CA	TC
56R	AA	CC	TT	CC	TC
57R	AA	CC	TT	CC	TT
58R	AG	CT	TT	CA	TC
59R	AG	CC	CT	CC	TC
60R	AA	CC	TT	CC	TC
61R	GG	CT	CT	CA	TC
62R	AG	CT	TT	CC	TT
63R	AA	CC	TT	CC	TT
64R	AG	CC	CC	CC	TT
65R	AA	CC	TT	CC	CC
66R	AG	CT	TT	CC	CC
67R	AG	TT	TT	CC	TC
68R	AG	CT	TT	CA	TC
69R	GG	CC	CT	CC	CC
70R	GG	CT	CC	CC	TT
71R	AG	CC	CT	CC	TC
72R	AG	CT	TT	CA	CC
73R	AG	CT	TT	CC	TC
74R	AG	CT	CT	CC	TC
75R	GG	CC	CC	CC	TT
76R	AG	CC	CT	CC	CC
77R	GG	TT	TT	CA	CC
78R	AG	CT	TT	CC	CC
79R	AA	CC	TT	CC	CC

80R	AA	CC	TT	CC	TT
81R	GG	TT	TT	CA	TT
82R	AA	CC	TT	CC	CC
83R	AA	CC	TT	CC	TT

Priloga C: Genotipi polimorfizmov v genu *NR1I2*

	<i>NR1I2</i>				
	rs3814055	rs2276707	rs6785049	rs7643645	rs2472677
1R	CT	CC	AA	AA	TT
2R	CC	CC	AA	AA	TT
3R	TT	CT	AG	AA	TT
4R	CT	CC	AA	AA	TT
5R	CT	CT	AG	AA	TT
6R	CT	CT	GG	AG	CT
7R	CT	CT	AG	AA	TT
8R	CC	CC	AA	AG	CT
9R	CC	CT	AG	AA	TT
10R	CT	CC	AA	GG	CC
11R	CC	CC	AA	AA	TT
12R	CC	CC	AA	AG	CT
13R	CT	CC	AG	GG	CC
14R	TT	CC	AA	AG	CT
15R	CT	CC	AG	AA	TT
16R	CC	CC	AA	AG	TT
17R	TT	CT	AG	GG	CT
18R	CT	CC	AA	AG	TT
19R	CC	CT	AG	GG	TT
20R	CT	CC	AA	GG	TT
21R	CT	CC	AA	AA	CT
22R	TT	CT	AG	AG	CC
23R	TT	CC	AG	AG	CT
24R	TT	TT	GG	AA	TT
25R	CC	CC	AG	AA	CT
26R	CC	CT	AG	GG	CC
27R	CT	CT	AG	AG	CT
28R	CC	TT	GG	AA	CT
29R	CC	CC	AA	AA	TT
30R	TT	TT	GG	AA	TT
31R	CT	CT	AG	AA	CT
32R	CT	CT	GG	AA	CT
33R	TT	CT	GG	AA	CT
34R	CC	CC	AG	AG	CT

35R	CC	CT	AG	AG	TT
36R	CT	CC	AA	AG	TT
37R	CC	CC	AA	AA	TT
38R	CC	CC	AA	AG	CC
39R	CT	CT	AG	AA	TT
40R	CT	CT	AG	AA	CT
41R	TT	CT	AG	AG	CT
42R	TT	CC	AG	AG	CT
43R	CT	CC	AG	AA	CT
44R	CC	CT	AG	AA	TT
45R	CC	CC	AA	GG	CT
46R	CC	CT	GG	AA	TT
47R	CT	CT	AG	AA	TT
48R	CT	CC	AG	AG	CT
49R	CT	CT	AG	AG	CT
50R	CC	CC	AA	AA	CT
51R	CC	TT	GG	AA	CT
52R	CT	TT	GG	AG	CT
53R	CC	CT	AG	AA	TT
54R	CC	CC	AG	AG	CT
55R	CC	CT	AG	AG	CT
56R	CC	CC	AA	AG	TT
57R	TT	TT	GG	AA	TT
58R	CC	CT	AG	GG	CT
59R	CT	CC	AA	AA	TT
60R	CC	CT	AG	AG	CT
61R	CT	CT	AG	AG	CT
62R	CT	CC	AA	AG	TT
63R	CT	CT	GG	AG	CT
64R	CC	CC	AA	AG	TT
65R	CC	CC	GG	AG	CC
66R	CC	CC	AA	AG	TT
67R	TT	CT	AG	AG	CT
68R	CC	CC	AA	AG	CT
69R	CT	TT	GG	AG	CT
70R	CT	CC	AG	AG	CC
71R	CC	CC	AG	AG	CT
72R	TT	TT	GG	AA	TT
73R	CC	CT	AG	AG	CT
74R	CC	CC	AG	AG	CT
75R	CT	CC	AA	AG	TT
76R	CT	CC	AG	AG	CT
77R	CT	CC	AG	AA	CT
78R	CC	CT	AG	AG	CT

79R	CT	CT	GG	GG	CC
80R	CT	CC	AA	AA	CT
81R	TT	CC	AA	GG	CT
82R	CC	CT	AG	AA	TT
83R	CC	CC	AA	AG	TT

Priloga D1: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs2306283 v genu *SLCO1B1*.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	AA	AG	GG	AA + AG	GG	AA	AG + GG
c ₁ [mg/L]	2,05 ± 2,70 n = 11	2,38 ± 2,67 n = 13	3,24 ± 4,04 n = 7	2,23 ± 2,63 n = 24	3,24 ± 4,04 n = 7	2,05 ± 2,70 n = 11	2,69 ± 3,14 n = 20
c ₂ [mg/L]	0,16 ± 0,19 n = 7	1,85 ± 3,77 n = 12	0,04 ± 0,05 n = 3	1,24 ± 3,07 n = 19	0,04 ± 0,05 n = 3	0,16 ± 0,19 n = 7	1,5 ± 3,43 n = 15
Cl ₁ [L/h]	8,63 ± 4,69 n = 18	8,06 ± 4,23 n = 26	7,57 ± 2,96 n = 12	8,3 ± 4,38 n = 44	7,57 ± 2,96 n = 12	8,63 ± 4,69 n = 18	7,91 ± 3,85 n = 38
Cl ₂ [L/h]	24,86 ± 19,74 n = 18	25,34 ± 19,95 n = 26	29,97 ± 21,16 n = 12	25,15 ± 19,64 n = 44	29,97 ± 21,16 n = 12	24,86 ± 19,74 n = 18	26,8 ± 20,17 n = 38
V ₂ [L]	64,38 ± 10,08 n = 18	65,84 ± 6,97 n = 26	66,29 ± 4,03 n = 12	65,25 ± 8,31 n = 44	66,29 ± 4,03 n = 12	64,38 ± 10,08 n = 18	65,99 ± 6,15 n = 38
t ₅₀ [min]	413,03 ± 133,89 n = 18	431,26 ± 140,12 n = 26	386,42 ± 90,90 n = 12	423,81 ± 136,33 n = 44	386,42 ± 90,90 n = 12	413,03 ± 133,89 n = 18	417,11 ± 127,16 n = 38

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga D2: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs4149032 v genu *SLCO1B1*.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	CC	CT	TT	CC + CT	TT	CC	CT + TT
c ₁ [mg/L]	2,44 ± 2,53 n = 12	2,42 ± 2,88 n = 15	2,69 ± 5,06 n = 4	2,43 ± 2,68 n = 27	2,69 ± 5,06 n = 4	2,44 ± 2,53 n = 12	2,48 ± 3,27 n = 19
c ₂ [mg/L]	0,64 ± 1,45 n = 8	1,64 ± 3,89 n = 11	0,15 ± 0,08 n = 3	1,22 ± 3,08 n = 19	0,15 ± 0,08 n = 3	0,64 ± 1,45 n = 8	1,32 ± 3,47 n = 14
Cl ₁ [L/h]	8,2 ± 4,1 n = 22	7,41 ± 3,93 n = 26	10,38 ± 4,39 n = 8	7,77 ± 3,98 n = 48	10,38 ± 4,39 n = 8	8,2 ± 4,1 n = 22	8,11 ± 4,18 n = 34
Cl ₂ [L/h]	25,1 ± 19,42 n = 22	26,04 ± 22,49 n = 26	29,62 ± 12,19 n = 8	25,61 ± 20,92 n = 48	29,62 ± 12,19 n = 8	25,1 ± 19,42 n = 22	26,88 ± 20,42 n = 34
V ₂ [L]	64,3 ± 10,12 n = 22	66,48 ± 6,01 n = 26	65,41 ± 2,52 n = 8	65,48 ± 8,14 n = 48	65,41 ± 2,52 n = 8	64,3 ± 10,12 n = 22	66,23 ± 5,38 n = 34
t ₅₀ [min]	398,43 ± 103,68 n = 22	453,28 ± 145,79 n = 26	341,76 ± 91,91 n = 8	428,14 ± 129,89 n = 48	341,76 ± 91,91 n = 8	398,43 ± 103,68 n = 22	427,04 ± 142,12 n = 34

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga D3: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs4149056 v genu *SLCO1B1*.

Fk par.	TT	TC
c_1 [mg/L]	$2,53 \pm 3,29$ n = 20	$2,33 \pm 2,4$ n = 11
c_2 [mg/L]	$1,13 \pm 3,16$ n = 17	$0,87 \pm 1,87$ n = 5
Cl_1 [L/h]	$8,92 \pm 4,41$ n = 40	$6,21 \pm 2,39$ n = 16
Cl_2 [L/h]	$26,04 \pm 17,6$ n = 40	$26,53 \pm 25,36$ n = 16
V_2 [L]	$65,25 \pm 7,95$ n = 40	$66,02 \pm 6,76$ n = 16
t_{50} [min]	$411,46 \pm 144,78$ n = 40	$426,63 \pm 74,45$ n = 16

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev.

Priloga D4: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs11045819 v genu *SLCO1B1*.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	CC	CA	AA	CC + CA	AA	CC	CA + AA
c ₁ [mg/L]	2,12 ± 2,25 n = 22	3,67 ± 4,44 n = 8	0,29 ± 0 n = 1	2,53 ± 2,99 n = 30	0,29 ± 0 n = 1	2,12 ± 2,25 n = 22	3,29 ± 4,3 n = 9
c ₂ [mg/L]	1,22 ± 3,28 n = 16	0,69 ± 1,49 n = 6	0 ± 0 n = 0	1,07 ± 2,87 n = 22	0 ± 0 n = 0	1,22 ± 3,28 n = 16	0,69 ± 1,49 n = 6
Cl ₁ [L/h]	7,84 ± 4,32 n = 38	8,32 ± 3,64 n = 15	11,12 ± 3,43 n = 3	7,98 ± 4,11 n = 53	11,12 ± 3,43 n = 3	7,84 ± 4,32 n = 38	8,79 ± 3,66 n = 18
Cl ₂ [L/h]	27,1 ± 22,7 n = 38	21,81 ± 11,82 n = 15	36,39 ± 6,31 n = 3	25,6 ± 20,25 n = 53	36,39 ± 6,31 n = 3	27,1 ± 22,7 n = 38	24,24 ± 12,29 n = 18
V ₂ [L]	65,2 ± 8,3 n = 38	66,13 ± 6,43 n = 15	65,56 ± 3,25 n = 3	65,46 ± 7,77 n = 53	65,56 ± 3,25 n = 3	65,2 ± 8,3 n = 38	66,03 ± 5,94 n = 18
t ₅₀ [min]	414,2 ± 120,27 n = 38	445,45 ± 145,31 n = 15	287,83 ± 70,79 n = 3	423,04 ± 127,2 n = 53	287,83 ± 70,79 n = 3	414,2 ± 120,27 n = 38	419,18 ± 147,08 n = 18

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga D5: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs1045642 v genu *ABCB1*.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	CC	CT	TT	CC + CT	TT	CC	CT + TT
c ₁ [mg/L]	3,58 ± 3,58 n = 7	2,04 ± 2,25 n = 20	2,64 ± 5,1 n = 4	2,44 ± 2,67 n = 27	2,64 ± 5,1 n = 4	3,58 ± 3,58 n = 7	2,14 ± 2,76 n = 24
c ₂ [mg/L]	2,1 ± 2,97 n = 2	1,25 ± 3,67 n = 12	0,55 ± 1,29 n = 8	1,37 ± 3,49 n = 14	0,55 ± 1,29 n = 8	2,1 ± 2,97 n = 2	0,97 ± 2,92 n = 20
Cl ₁ [L/h]	5,03 ± 1,64 n = 10	9,01 ± 4,18 n = 31	8,45 ± 4,29 n = 15	8,04 ± 4,09 n = 41	8,45 ± 4,29 n = 15	5,03 ± 1,64 n = 10	8,82 ± 4,18 n = 46
Cl ₂ [L/h]	17,48 ± 10,28 n = 10	26,65 ± 18,78 n = 31	31,02 ± 25,48 n = 15	24,41 ± 17,44 n = 41	31,02 ± 25,48 n = 15	17,48 ± 10,28 n = 10	28,07 ± 21,01 n = 46
V ₂ [L]	68,91 ± 4,5 n = 10	64,9 ± 7,82 n = 31	64,35 ± 8,43 n = 15	65,88 ± 7,31 n = 41	64,35 ± 8,43 n = 15	68,91 ± 4,5 n = 10	64,72 ± 7,93 n = 46
t ₅₀ [min]	483,25 ± 115,42 n = 10	373,9 ± 104,84 n = 31	457,42 ± 153 n = 15	400,57 ± 116,19 n = 41	457,42 ± 153 n = 15	483,25 ± 115,42 n = 10	401,13 ± 127,19 n = 46

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga D6: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs3814055 v genu *NR1I2*.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	CC	CT	TT	CC + CT	TT	CC	CT + TT
c ₁ [mg/L]	2,42 ± 2,8 n = 16	2,27 ± 3,02 n = 11	3,17 ± 4,17 n = 4	2,36 ± 2,83 n = 27	3,17 ± 4,17 n = 4	2,42 ± 2,8 n = 16	2,51 ± 3,23 n = 15
c ₂ [mg/L]	0,53 ± 1,14 n = 10	0,75 ± 1,69 n = 6	2,31 ± 5,19 n = 6	0,61 ± 1,32 n = 16	2,31 ± 5,19 n = 6	0,53 ± 1,14 n = 10	1,53 ± 3,77 n = 12
Cl ₁ [L/h]	8,76 ± 4,23 n = 24	7,88 ± 3,82 n = 22	7,25 ± 4,61 n = 10	8,34 ± 4,02 n = 46	7,25 ± 4,61 n = 10	8,76 ± 4,23 n = 24	7,68 ± 4,02 n = 32
Cl ₂ [L/h]	29,81 ± 23,54 n = 24	24,48 ± 17,71 n = 22	21,23 ± 14,02 n = 10	27,26 ± 20,9 n = 46	21,23 ± 14,02 n = 10	29,81 ± 23,54 n = 24	23,46 ± 16,49 n = 32
V ₂ [L]	64,97 ± 7,26 n = 24	65,3 ± 8,76 n = 22	67,02 ± 5,83 n = 10	65,13 ± 7,92 n = 46	67,02 ± 5,83 n = 10	64,97 ± 7,26 n = 24	65,84 ± 7,9 n = 32
t ₅₀ [min]	401,79 ± 117,87 n = 24	409,39 ± 128,44 n = 22	463,51 ± 152,36 n = 10	405,42 ± 121,71 n = 46	463,51 ± 152,36 n = 10	401,79 ± 117,87 n = 24	426,3 ± 136,25 n = 32

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga D7: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs2276707 v genu *NR1I2*.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	CC	CT	TT	CC + CT	TT	CC	CT + TT
c ₁ [mg/L]	1,65 ± 2,54 n = 19	3,12 ± 3,01 n = 10	6,88 ± 3,13 n = 2	2,16 ± 2,75 n = 29	6,88 ± 3,13 n = 2	1,65 ± 2,54 n = 19	3,75 ± 3,23 n = 12
c ₂ [mg/L]	0,48 ± 1,15 n = 10	1,82 ± 4,1 n = 10	0,32 ± 0,3 n = 2	1,15 ± 3,01 n = 20	0,32 ± 0,3 n = 2	0,48 ± 1,15 n = 10	1,57 ± 3,76 n = 12
Cl ₁ [L/h]	7,88 ± 3,42 n = 28	7,62 ± 3,85 n = 23	12,04 ± 7,09 n = 5	7,76 ± 3,59 n = 51	12,04 ± 7,09 n = 5	7,88 ± 3,42 n = 28	8,41 ± 4,75 n = 28
Cl ₂ [L/h]	31,37 ± 23,15 n = 28	22,19 ± 15,26 n = 23	15,51 ± 10,53 n = 5	27,23 ± 20,33 n = 51	15,51 ± 10,53 n = 5	31,37 ± 23,15 n = 28	20,99 ± 14,59 n = 28
V ₂ [L]	64,71 ± 9,28 n = 28	66,5 ± 5,2 n = 23	65 ± 7,01 n = 5	65,52 ± 7,69 n = 51	65 ± 7,01 n = 5	64,71 ± 9,28 n = 28	66,23 ± 5,45 n = 28
t ₅₀ [min]	400,55 ± 117,51 n = 28	439,2 ± 145 n = 23	393,49 ± 107,55 n = 5	417,98 ± 130,71 n = 51	393,49 ± 107,55 n = 5	400,55 ± 117,51 n = 28	431,04 ± 138,43 n = 28

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga D8: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs6785049 v genu *NR1I2*.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	GG	GA	AA	GG + GA	AA	GG	GA + AA
c ₁ [mg/L]	6,88 ± 3,13 n = 2	2,84 ± 3,29 n = 16	1,31 ± 1,65 n = 13	3,29 ± 3,44 n = 18	1,31 ± 1,65 n = 13	6,88 ± 3,13 n = 2	2,16 ± 2,75 n = 29
c ₂ [mg/L]	0,33 ± 0,26 n = 4	1,62 ± 3,94 n = 11	0,64 ± 1,37 n = 7	1,28 ± 3,38 n = 15	0,64 ± 1,37 n = 7	0,33 ± 0,26 n = 4	1,24 ± 3,17 n = 18
Cl ₁ [L/h]	10,99 ± 5,77 n = 9	7,39 ± 3,78 n = 28	7,92 ± 3,21 n = 19	8,26 ± 4,54 n = 37	7,92 ± 3,21 n = 19	10,99 ± 5,77 n = 9	7,6 ± 3,54 n = 47
Cl ₂ [L/h]	19,8 ± 14,04 n = 9	26,46 ± 20,81 n = 28	28,79 ± 21,03 n = 19	24,84 ± 19,42 n = 37	28,79 ± 21,03 n = 19	19,8 ± 14,04 n = 9	27,4 ± 20,7 n = 47
V ₂ [L]	64,07 ± 5,46 n = 9	66,33 ± 6,13 n = 28	64,87 ± 10,16 n = 19	65,78 ± 5,98 n = 37	64,87 ± 10,16 n = 19	64,07 ± 5,46 n = 9	65,74 ± 7,94 n = 47
t ₅₀ [min]	363,11 ± 105,24 n = 9	446,28 ± 124,6 n = 28	395,83 ± 136,81 n = 19	426,05 ± 124,15 n = 37	395,83 ± 136,81 n = 19	363,11 ± 105,24 n = 9	425,89 ± 130,62 n = 47

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga D9: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs7643645 v genu *NR1I2*.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	AA	AG	GG	AA + AG	GG	AA	AG + GG
c ₁ [mg/L]	2,72 ± 3,07 n = 15	1,92 ± 2,26 n = 12	3,11 ± 4,8 n = 4	2,37 ± 2,72 n = 27	3,11 ± 4,8 n = 4	2,72 ± 3,07 n = 15	2,22 ± 2,94 n = 16
c ₂ [mg/L]	1,75 ± 3,64 n = 13	0,08 ± 0,08 n = 7	0,15 ± 0 n = 2	1,17 ± 3,01 n = 20	0,15 ± 0 n = 2	1,75 ± 3,64 n = 13	0,09 ± 0,08 n = 9
Cl ₁ [L/h]	7,89 ± 4,34 n = 28	8,32 ± 4,09 n = 21	8,66 ± 3,69 n = 7	8,07 ± 4,19 n = 49	8,66 ± 3,69 n = 7	7,89 ± 4,34 n = 28	8,41 ± 3,93 n = 28
Cl ₂ [L/h]	27,7 ± 23,67 n = 28	26,38 ± 16,35 n = 21	19,51 ± 12,1 n = 7	27,13 ± 20,66 n = 49	19,51 ± 12,1 n = 7	27,7 ± 23,67 n = 28	24,66 ± 15,48 n = 28
V ₂ [L]	65,32 ± 8,7 n = 28	65,5 ± 6,97 n = 21	65,99 ± 4,84 n = 7	65,4 ± 7,93 n = 49	65,99 ± 4,84 n = 7	65,32 ± 8,7 n = 28	65,62 ± 6,42 n = 28
t ₅₀ [min]	400,66 ± 128,26 n = 28	441,81 ± 142,24 n = 21	398,29 ± 72,66 n = 7	418,3 ± 134,56 n = 49	398,29 ± 72,66 n = 7	400,66 ± 128,26 n = 28	430,93 ± 128,57 n = 28

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga D10: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za genotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za polimorfizem rs2472677.

Fk par.	Aditivni model			Recesivni model		Dominantni model	
	CC	CT	TT	CC + CT	TT	CC	CT + TT
c ₁ [mg/L]	3,39 ± 4,59 n = 4	1,75 ± 1,89 n = 12	2,78 ± 3,27 n = 15	2,16 ± 2,71 n = 16	2,78 ± 3,27 n = 15	3,39 ± 4,59 n = 4	2,32 ± 2,75 n = 27
c ₂ [mg/L]	0,06 ± 0 n = 1	0,13 ± 0,1 n = 11	2,21 ± 4,08 n = 10	0,12 ± 0,1 n = 12	2,21 ± 4,08 n = 10	0,06 ± 0 n = 1	1,12 ± 2,94 n = 21
Cl ₁ [L/h]	6,96 ± 4,74 n = 5	8,38 ± 3,74 n = 26	8,14 ± 4,47 n = 25	8,15 ± 3,87 n = 31	8,14 ± 4,47 n = 25	6,96 ± 4,74 n = 5	8,26 ± 4,08 n = 51
Cl ₂ [L/h]	18,01 ± 9,83 n = 5	29,94 ± 22,41 n = 26	23,91 ± 18,2 n = 25	28,01 ± 21,25 n = 31	23,91 ± 18,2 n = 25	18,01 ± 9,83 n = 5	26,98 ± 20,48 n = 51
V ₂ [L]	66,95 ± 5,22 n = 5	67,47 ± 6,62 n = 26	63,1 ± 8,42 n = 25	67,38 ± 6,34 n = 31	63,1 ± 8,42 n = 25	66,95 ± 5,22 n = 5	65,32 ± 7,79 n = 51
t ₅₀ [min]	535,98 ± 181,11 n = 5	393,00 ± 102,35 n = 26	415,47 ± 132,99 n = 25	416,06 ± 126,33 n = 31	415,47 ± 132,99 n = 25	535,98 ± 181,11 n = 5	404,01 ± 117,71 n = 51

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga E: Post hoc testi statistično značilnih rezultatov ANOVE pri ugotavljanju vpliva polimorfizmov na farmakokinetiko rifampicina.

Gen	Polimorfizem	Farmakokinetični parameter	p – vrednost	Genotip
<i>SLCO1B1</i>	rs4149032	t_{50} (Tukey HSD)	0,077	TT, CT
			0,287	CC, CT
			0,515	TT, CC
<i>ABCBI</i>	rs1045642	Cl_1 (Games-Howell)	<0,001	CC, CT
			0,908	TT, CT
			0,029	CC, TT
		t_{50} (Tukey HSD)	0,042	CC, CT
			0,082	TT, CT
			0,861	CC, TT
<i>NR1I2</i>	rs2276707	c_1 (Tukey HSD)	0,363	CC, CT
			0,194	TT, CT
			0,039	CC, TT
		Cl_1 (Games-Howell)	0,964	CC, CT
			0,436	TT, CT
			0,469	CC, TT
	rs6785049	c_1 (Tukey HSD)	0,133	GG, GA
			0,297	AA, GA
			0,030	GG, AA
		Cl_1 (Games-Howell)	0,232	GG, GA
			0,863	AA, GA
			0,334	GG, AA
rs2472677	t_{50} (Tukey HSD)	0,057	CC, CT	
		0,795	TT, CT	
		0,127	CC, TT	

c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki; V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev. Krepko so označeni mejno signifikantni rezultati, krepko in podčrtano pa signifikantni rezultati.

Priloga F: Haplotipi

	<i>SLCO1B1</i>				<i>NR1I2</i>	
	2,4	2,3	1,3	1,2	4,5	1,4,5
1R	/	AC,GC	CC,CC	CA,CG	AC,AC	CAC,TAC
2R	AT,GT	AC,GC	CC,TC	CA,TG	AC,AC	CAC,CAC
3R	AT,GT	AC,GC	CC,TC	CA,TG	AC,GT	TAC,TGT
4R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	AC,AC	CAC,TAC
5R	GC,GT	GC,GC	CC,TC	CG,TG	AC,GT	/
6R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	GC,GT	/
7R	GC,GT	GC,GC	CC,TC	CG,TG	AC,GT	/
8R	GC,GT	GC,GC	CC,TC	CG,TG	AC,AC	CAC,CAC
9R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,GT	CAC,CGT
10R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,AC	CAC,TAC
11R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,AC	CAC,CAC
12R	AT,GT	AC,GC	CC,TC	CA,TG	AC,AC	CAC,CAC
13R	GT,GT	GC,GA	TC,TA	TG,TG	AC,GC	/
14R	/	AC,GC	CC,CC	CA,CG	AC,AC	TAC,TAC
15R	/	AC,GC	CC,CC	CA,CG	AC,GC	/
16R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,AC	CAC,CAC
17R	AT,AT	AC,AC	CC,TC	CA,TA	AC,GT	TAC,TGT
18R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,AC	CAC,TAC
19R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	AC,GT	CAC,CGT
20R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,AC	CAC,TAC
21R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,AC	CAC,TAC
22R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	AC,GT	TAC,TGT
23R	GT,GT	GA,GA	TA,TA	TG,TG	AC,GC	TAC,TGC
24R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	GT,GT	TGT,TGT
25R	/	AC,GC	CC,TC	CA,TG	AC,GC	CAC,CGC
26R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	AC,GT	CAC,CGT
27R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,GT	/
28R	AT,GT	AC,GA	TC,TA	TA,TG	GT,GT	CGT,CGT
29R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	AC,AC	CAC,CAC
30R	AT,GT	AC,GC	CC,TC	CA,TG	GT,GT	TGT,TGT
31R	AT,GT	AC,GC	CC,TC	CA,TG	AC,GT	/
32R	GT,GT	GA,GA	TA,TA	TG,TG	GC,GT	/
33R	GT,GT	GC,GC	TC,TC	TG,TG	GC,GT	TGC,TGT
34R	GC,GT	GC,GA	CC,TA	CG,TG	AC,GC	CAC,CGC
35R	GC,GT	GC,GA	CC,TA	CG,TG	AC,GT	CAC,CGT
36R	AT,AT	AC,AC	CC,TC	CA,TA	AC,AC	CAC,TAC
37R	AT,GT	AC,GC	CC,CC	CA,CG	AC,AC	CAC,CAC
38R	/	AC,GC	CC,TC	CA,TG	AC,AC	CAC,CAC
39R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,GT	/
40R	AC,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,GT	/

41R	GC,GT	GC,GA	TC,TA	TG,TG	AC,GT	TAC,TGT
42R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,GC	TAC,TGC
43R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,GC	/
44R	GT,GT	GA,GA	TA,TA	TG,TG	AC,GT	CAC,CGT
45R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	AC,AC	CAC,CAC
46R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	GC,GT	CGC,CGT
47R	/	AC,GC	CC,CC	CA,CG	AC,GT	/
48R	/	AC,GC	CC,CC	CA,CG	AC,GC	/
49R	AT,GT	AC,GA	CC,TA	CA,TG	AC,GT	/
50R	AT,GT	AC,GC	CC,TC	CA,TG	AC,AC	CAC,CAC
51R	/	AC,GC	CC,TC	CA,TG	GT,GT	CGT,CGT
52R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	GT,GT	CGT,TGT
53R	AT,GT	AC,GC	CC,CC	CA,CG	AC,GT	CAC,CGT
54R	AT,AT	AC,AC	TC,TC	TA,TA	AC,GC	CAC,CGC
55R	GC,GT	GC,GA	CC,TA	CG,TG	AC,GT	CAC,CGT
56R	AT,AT	AC,AC	CC,CC	CA,CA	AC,AC	CAC,CAC

2,4 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs2306283 in rs4149056; 2,3 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs2306283 in rs11045819; 1,3 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs4149032 in rs11045819; 1,2 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs4149032 in rs2306283; 4,5 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs6785049 in rs2276707; 1,4,5 = haplotip sestavljen iz polimorfizmov rs3814055, rs6785049 in rs2276707.

Priloga G: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *SLCO1B1*.

Fk par.	AT - rs2306283 in rs4149056		GC - rs2306283 in rs4149056		GT - rs2306283 in rs4149056	
	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c_1 [mg/L]	3,24 ± 4,05 n = 7	2,36 ± 2,83 n = 19	2,63 ± 3,24 n = 21	2,42 ± 3,02 n = 5	2,05 ± 2,7 n = 11	2,99 ± 3,47 n = 15
c_2 [mg/L]	0,04 ± 0,05 n = 3	1,2 ± 3,25 n = 16	1,13 ± 3,16 n = 17	0,02 ± 0,02 n = 2	0,17 ± 0,19 n = 7	1,51 ± 3,73 n = 12
Cl_1 [L/h]	7,58 ± 2,97 n = 12	8,77 ± 4,54 n = 36	8,79 ± 4,43 n = 41	6,59 ± 1,68 n = 7	8,64 ± 4,69 n = 18	8,37 ± 3,96 n = 30
Cl_2 [L/h]	29,98 ± 21,17 n = 12	24,56 ± 18,25 n = 36	25,51 ± 17,71 n = 41	28,31 ± 26,63 n = 7	24,87 ± 19,74 n = 18	26,55 ± 18,75 n = 30
V_2 [L]	66,29 ± 4,03 n = 12	65,36 ± 8,39 n = 36	65,38 ± 7,9 n = 41	66,84 ± 4,84 n = 7	64,38 ± 10,09 n = 18	66,32 ± 5,5 n = 30
t_{50} [min]	386,42 ± 90,91 n = 12	419,94 ± 146,57 n = 36	411,46 ± 142,96 n = 41	412,15 ± 76,8 n = 7	413,03 ± 133,89 n = 18	410,67 ± 137,47 n = 30

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev.

Priloga G – nadaljevanje: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *SLCO1B1*.

Fk par.	AC - rs2306283 in rs11045819		GC - rs2306283 in rs11045819		GA - rs2306283 in rs11045819	
	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c_1 [mg/L]	3,24 ± 4,05 n = 7	2,23 ± 2,63 n = 24	2,07 ± 3 n = 16	2,88 ± 2,97 n = 15	2,12 ± 2,25 n = 22	3,29 ± 4,3 n = 9
c_2 [mg/L]	0,04 ± 0,05 n = 3	1,24 ± 3,07 n = 19	0,44 ± 1,05 n = 12	1,83 ± 4,1 n = 10	1,22 ± 3,28 n = 16	0,69 ± 1,49 n = 6
Cl_1 [L/h]	7,58 ± 2,97 n = 12	8,3 ± 4,38 n = 44	9,03 ± 4,35 n = 31	7,05 ± 3,57 n = 25	7,84 ± 4,32 n = 38	8,79 ± 3,66 n = 18
Cl_2 [L/h]	29,98 ± 21,17 n = 12	25,15 ± 19,64 n = 44	24,99 ± 17,18 n = 31	27,66 ± 23,08 n = 25	27,1 ± 22,7 n = 38	24,24 ± 12,29 n = 18
V_2 [L]	66,29 ± 4,03 n = 12	65,25 ± 8,31 n = 44	64,72 ± 8,63 n = 31	66,4 ± 6,07 n = 25	65,2 ± 8,3 n = 38	66,03 ± 5,94 n = 18
t_{50} [min]	386,42 ± 90,91 n = 12	423,81 ± 136,33 n = 44	415,56 ± 148,89 n = 31	416,09 ± 99,63 n = 25	414,2 ± 120,27 n = 38	419,18 ± 147,08 n = 18

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev.

Priloga G – nadaljevanje: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *SLCO1B1*.

Fk par.	CC - rs4149032 in rs11045819		TC - rs4149032 in rs11045819		TA - rs4149032 in rs11045819	
	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c_1 [mg/L]	2,69 ± 5,06 n = 4	2,43 ± 2,68 n = 27	2,56 ± 2,96 n = 19	2,31 ± 3,09 n = 12	2,12 ± 2,25 n = 22	3,29 ± 4,3 n = 9
c_2 [mg/L]	0,15 ± 0,08 n = 3	1,22 ± 3,08 n = 19	0,7 ± 1,46 n = 13	1,61 ± 4,24 n = 9	1,22 ± 3,28 n = 16	0,69 ± 1,49 n = 6
Cl_1 [L/h]	10,38 ± 4,39 n = 8	7,77 ± 3,98 n = 48	8,47 ± 3,9 n = 37	7,5 ± 4,53 n = 19	7,84 ± 4,32 n = 38	8,79 ± 3,66 n = 18
Cl_2 [L/h]	29,62 ± 12,19 n = 8	25,61 ± 20,92 n = 48	24,66 ± 16,83 n = 37	29,16 ± 25,03 n = 19	27,1 ± 22,7 n = 38	24,24 ± 12,29 n = 18
V_2 [L]	65,41 ± 2,52 n = 8	65,48 ± 8,14 n = 48	64,94 ± 8,76 n = 37	66,5 ± 4,49 n = 19	65,2 ± 8,3 n = 38	66,03 ± 5,94 n = 18
t_{50} [min]	341,76 ± 91,91 n = 8	428,14 ± 129,89 n = 48	410,46 ± 124,71 n = 37	426,19 ± 137,49 n = 19	414,2 ± 120,27 n = 38	419,18 ± 147,08 n = 18

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev.

Priloga G – nadaljevanje: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *SLCO1B1*.

Fk par.	CA - rs4149032 in rs2306283		CG - rs4149032 in rs2306283		TA - rs4149032 in rs2306283	
	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c_1 [mg/L]	2,85 ± 3,9 n = 8	2,33 ± 2,65 n = 23	2,39 ± 3,14 n = 24	2,72 ± 2,46 n = 7	2,62 ± 3 n = 29	0,16 ± 0,06 n = 2
c_2 [mg/L]	0,1 ± 0,09 n = 5	1,36 ± 3,23 n = 17	1,13 ± 3,16 n = 17	0,87 ± 1,87 n = 5	1,22 ± 3,08 n = 19	0,17 ± 0,07 n = 3
Cl_1 [L/h]	8,65 ± 3,97 n = 14	7,98 ± 4,18 n = 42	8,48 ± 4,38 n = 43	7,05 ± 2,89 n = 13	7,97 ± 3,95 n = 52	10,39 ± 6,04 n = 4
Cl_2 [L/h]	28,88 ± 20,19 n = 14	25,28 ± 19,94 n = 42	26,36 ± 19,45 n = 43	25,59 ± 22,05 n = 13	26,38 ± 20,48 n = 52	23,63 ± 10,24 n = 4
V_2 [L]	65,95 ± 3,82 n = 14	65,31 ± 8,5 n = 42	65,49 ± 7,71 n = 43	65,42 ± 7,42 n = 13	65,52 ± 7,77 n = 52	64,78 ± 5,14 n = 4
t_{50} [min]	373,19 ± 93,06 n = 14	430 ± 135,86 n = 42	417,26 ± 138,65 n = 43	410,95 ± 89,19 n = 13	414,02 ± 120,21 n = 52	438,95 ± 233,75 n = 4

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev.

Priloga G – nadaljevanje: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *SLCO1B1*.

	TG - rs4149032 in rs2306283	
Fk par.	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c ₁ [mg/L]	2,11 ± 2,47 n = 14	2,75 ± 3,36 n = 17
c ₂ [mg/L]	0,55 ± 1,3 n = 10	1,51 ± 3,73 n = 12
Cl ₁ [L/h]	8,36 ± 4,38 n = 25	7,97 ± 3,94 n = 31
Cl ₂ [L/h]	24,52 ± 18,44 n = 25	27,53 ± 21,17 n = 31
V ₂ [L]	64,37 ± 9,65 n = 25	66,36 ± 5,39 n = 31
t ₅₀ [min]	411,46 ± 123,35 n = 25	419,3 ± 133,82 n = 31

Fk par. = farmakokinetični parameter; *c*₁ = koncentracija v prvi časovni točki; *c*₂ = koncentracija v drugi časovni točki; *Cl*₁ = očistek v prvi časovni točki; *Cl*₂ = očistek v drugi časovni točki;

*V*₂ = porazdelitveni volumen; *t*₅₀ = razpolovni čas; *n* = število preiskovancev.

Priloga H: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *NR1H2*.

Fk par.	AC - rs6785049 in rs2276707		GC - rs6785049 in rs2276707		GT - rs6785049 in rs2276707	
	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c_1 [mg/L]	$6,88 \pm 3,13$ n = 2	$2,16 \pm 2,75$ n = 29	$2,48 \pm 2,77$ n = 25	$2,38 \pm 3,97$ n = 6	$1,65 \pm 2,54$ n = 19	$3,75 \pm 3,23$ n = 12
c_2 [mg/L]	$0,33 \pm 0,26$ n = 4	$1,24 \pm 3,17$ n = 18	$1,33 \pm 3,24$ n = 17	$0,2 \pm 0,22$ n = 5	$0,48 \pm 1,15$ n = 10	$1,57 \pm 3,76$ n = 12
Cl_1 [L/h]	$10,99 \pm 5,77$ n = 9	$7,6 \pm 3,54$ n = 47	$8,07 \pm 4,18$ n = 43	$8,38 \pm 4$ n = 13	$7,88 \pm 3,42$ n = 28	$8,41 \pm 4,75$ n = 28
Cl_2 [L/h]	$19,8 \pm 14,04$ n = 9	$27,4 \pm 20,7$ n = 47	$24,05 \pm 17,91$ n = 43	$33,23 \pm 24,86$ n = 13	$31,37 \pm 23,15$ n = 28	$20,99 \pm 14,59$ n = 28
V_2 [L]	$64,07 \pm 5,46$ n = 9	$65,74 \pm 7,94$ n = 47	$65,94 \pm 7,89$ n = 43	$63,91 \pm 6,47$ n = 13	$64,71 \pm 9,28$ n = 28	$66,23 \pm 5,45$ n = 28
t_{50} [min]	$363,11 \pm 105,24$ n = 9	$425,89 \pm 130,62$ n = 47	$425,33 \pm 137,98$ n = 43	$384,25 \pm 85,03$ n = 13	$400,55 \pm 117,51$ n = 28	$431,04 \pm 138,43$ n = 28

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev.

Priloga H – nadaljevanje: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *NR1I2*.

Fk par.	CAC - rs3814055, rs6785049 in rs2276707		CGC - rs3814055, rs6785049 in rs2276707	
	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c_1 [mg/L]	3,47 ± 3,67 n = 5	1,8 ± 2,57 n = 20	2,32 ± 2,87 n = 23	0,07 ± 0,07 n = 2
c_2 [mg/L]	1,81 ± 4,48 n = 8	0,47 ± 1,15 n = 10	1,15 ± 3,26 n = 16	0,41 ± 0,23 n = 2
Cl_1 [L/h]	9,01 ± 5,42 n = 14	8,39 ± 3,94 n = 28	8,32 ± 4,18 n = 38	11,18 ± 6,55 n = 4
Cl_2 [L/h]	20,04 ± 13,05 n = 14	29,89 ± 22,56 n = 28	25,73 ± 18,29 n = 38	34,91 ± 37,35 n = 4
V_2 [L]	65,64 ± 6,36 n = 14	64,92 ± 8,25 n = 28	65,37 ± 7,96 n = 38	63,14 ± 1,53 n = 4
t_{50} [min]	428,21 ± 147,53 n = 14	409,55 ± 130,83 n = 28	419,03 ± 138,45 n = 38	384,81 ± 107,83 n = 4

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev.

Priloga H – nadaljevanje: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *NR1H2*.

Fk par.	CGT - rs3814055, rs6785049 in rs2276707		TAC - rs3814055, rs6785049 in rs2276707	
	0 kopij	Vsaj 1 kopija	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c_1 [mg/L]	1,57 ± 2,36 n = 19	3,93 ± 3,61 n = 6	2,81 ± 3,16 n = 17	0,71 ± 1,02 n = 8
c_2 [mg/L]	1,32 ± 3,47 n = 14	0,18 ± 0,26 n = 4	0,49 ± 1,04 n = 12	2,22 ± 5,23 n = 6
Cl_1 [L/h]	8 ± 3,99 n = 31	10,27 ± 5,34 n = 11	9,23 ± 4,88 n = 28	7,32 ± 3,14 n = 14
Cl_2 [L/h]	28,28 ± 21,6 n = 31	21,89 ± 15,93 n = 11	28,04 ± 22,77 n = 28	23,75 ± 14,39 n = 14
V_2 [L]	65,04 ± 8,25 n = 31	65,49 ± 5,69 n = 11	64,74 ± 7,16 n = 28	66 ± 8,64 n = 14
t_{50} [min]	416,4 ± 139,65 n = 31	413,99 ± 127,75 n = 11	404,84 ± 111,72 n = 28	437,64 ± 175,7 n = 14

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev.

Priloga H – nadaljevanje: Srednje vrednosti s standardnimi deviacijami in število oseb za haplotip pri določenem farmakokinetičnem parametru za posamezne haplotipe v genu *NR1H2*.

	TGT - rs3814055, rs6785049 in rs2276707	
Fk par.	0 kopij	Vsaj 1 kopija
c_1 [mg/L]	1,87 ± 2,54 n = 22	4,07 ± 4,6 n = 3
c_2 [mg/L]	0,42 ± 1,01 n = 13	2,75 ± 5,68 n = 5
Cl_1 [L/h]	8,51 ± 3,95 n = 34	8,96 ± 6,41 n = 8
Cl_2 [L/h]	28,24 ± 21,34 n = 34	19,65 ± 13,96 n = 8
V_2 [L]	65,25 ± 7,94 n = 34	64,77 ± 6,41 n = 8
t_{50} [min]	401,64 ± 126,38 n = 34	475,82 ± 162,84 n = 8

Fk par. = farmakokinetični parameter; c_1 = koncentracija v prvi časovni točki; c_2 = koncentracija v drugi časovni točki; Cl_1 = očistek v prvi časovni točki; Cl_2 = očistek v drugi časovni točki;

V_2 = porazdelitveni volumen; t_{50} = razpolovni čas; n = število preiskovancev

