

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA PEČOVNIK

DIPLOMSKA NALOGA  
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA PEČOVNIK

POVEZANOST POLIMORFIZMOV V GENIH *SLCO1B1* IN *SLCO1B3*

S KONCENTRACIJAMI BILIRUBINA PRI BOLNIKIH

Z GILBERTOVIM SINDROMOM

ASSOCIATION OF *SLCO1B1* AND *SLCO1B3* POLYMORPHISMS WITH BILIRUBIN CONCENTRATIONS IN PATIENTS WITH GILBERT'S SYNDROME

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. Meritve koncentracij bilirubina so opravili na Pediatrični kliniki v Ljubljani.

### **Zahvala**

Mentorici doc. dr. Barbari Ostanek, mag. farm. se iskreno zahvaljujem za izkazano zaupanje, razumevanje ter strokovno pomoč.

Za pomoč in nasvete pri delu se najlepše zahvaljujem tudi vsem sodelavcem Katedre za klinično biokemijo.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Roku Orlu dr. med., predstojniku kliničnega oddelka za gastroenterologijo, hepatologijo in nutricionistiko, za posredovanje analiziranih vzorcev in rezultate meritev koncentracije bilirubina.

Iskrena hvala tudi vsem ostalim, ki so mi tekom študija stali ob strani, predvsem družini ter najbližnjim prijateljem.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.

Ljubljana, maj 2012

Barbara Pečovnik

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član diplomske komisije: asist. dr. Jurij Trontelj

**VSEBINA**

POVZETEK .....	III
SEZNAM OKRAJŠAV .....	IV
KAZALO SLIK .....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	VI
1 UVOD .....	1
1.1 BILIRUBIN .....	1
1.1.1 Nastanek, struktura in lastnosti bilirubina.....	1
1.1.2 Presnova in izločanje bilirubina .....	3
1.1.3 Toksičnost bilirubina.....	6
1.2 MOTNJE V PRESNOVI BILIRUBINA .....	7
1.2.1 Hiperbilirubinemije .....	7
1.2.2 Diagnostika hiperbilirubinemij .....	8
1.3 GILBERTOV SINDROM .....	9
1.3.1 Organski anionski prenašalec 1B1 (OATP1B1) .....	11
1.3.2 Organski anionski prenašalec 1B3 (OATP1B3) .....	14
2 NAMEN DELA .....	15
3 MATERIALI IN METODE .....	16
3.1 VZORCI.....	16
3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN VZORČNIH DNA.....	16
3.2.1 SPEKTROFOTOMETER NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000 .....	17
3.2.2 Določanje koncentracije in čistosti DNA.....	17
3.2.3 Materiali in oprema .....	17
3.3 REAKCIJA VERIŽNE POLIMERIZACIJE (PCR).....	18
3.3.1 KASP genotipizacija .....	19

3.3.2 Genotipizacija z hidrolizirajočimi sondami ( <i>TaqMan</i> sonde).....	21
3.3.3 SPLOŠNA DOLOČILA pri pripravi reakcijskih zmesi in PCR- reakcije .....	22
3.3.4 GENOTIPIZACIJA <i>SLCO 1B3</i> int7 .....	23
3.3.5 GENOTIPIZACIJA <i>SLCO1B1</i> A388G in T521C .....	24
3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE BILIRUBINA .....	27
3.5 STATISTIČNA ANALIZA .....	27
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	28
4.1 IZVEDBA IN OPTIMIZACIJA GENOTIPIZACIJE .....	28
4.2 POGOSTOST POLIMORFIZMOV .....	32
4.3 UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV S SERUMSKIMI KONCENTRACIJAMI INDIREKTNEGA BILIRUBINA .....	42
5. SKLEP .....	46
6. LITERATURA .....	47

## POVZETEK

Gilbertov sindrom je najpogosteša dedna motnja v presnovi bilirubina, za katero je značilna nekonjugirana hiperbilirubinemija, ki nastane kot posledica kombinacije znižane konjugacije bilirubina in njegovega zmanjšanega privzema v jetrne celice. Čeprav velja za benigno motnjo, je njegovo diagnosticiranje klinično pomembno zaradi pomena pri individualizaciji zdravljenja z zdravili, ki so substrati za, UGT1A1, OATP1B1 ali OATP1B3.

Gena *SLCO1B1* in *SLCO1B3* nosita zapis za prenašalca OATP1B1 in OATP1B3, ki sodita med glavne prenašalce organskih anionov iz krvi v jetra. S študijami so pokazali, da lahko sodeluje tudi pri privzemu bilirubina v jetrne celice. V genih *SLCO1B1* in *SLCO1B3* so odkrili številne polimorfizme, ki lahko vplivajo na količino ali strukturo prenašalnega proteina in s tem na učinkovitost transporta bilirubina.

Namen našega dela je bil, zato ugotoviti vpliv polimorfizmov v genih *SLCO1B1* in *SLCO1B3* na koncentracijo bilirubina pri bolnikih z Gilbertovim sindromom. Naša hipoteza je bila, da prisotnost polimorfizmov v imenovanih genih vpliva na serumsko koncentracijo indirektnega bilirubina.

V preiskovani skupini 95 bolnikov z Gilbertovim sindromom smo z uporabo hidrolizirajočih sond oziroma KASP genotipizacije določili naslednje frekvence genotipov. Za polimorfizem A338G v genu *SLCO1B1*, 39 heterozigotov AG (41,1 %), 36 homozigotov AA (37,9 %), 20 homozigotov GG (21,1 %), za polimorfizem T521C v genu *SLCO1B1*, 29 heterozigotov TC (30,5 %), 63 homozigotov TT (66,3 %) in 3 homozigote CC ter za polimorfizem v int 7 gena *SLCO1B3* pa smo določili 27 heterozigotov CG (28,4 %), 67 homozigotov CC (70,5 %) ter 1 homozigota GG (1,1 %).

Dokazali smo statistično značilno povezavo med koncentracijo indirektnega bilirubina in genotipom polimorfizma v int 7 gena *SLCO1B3*. Bolniki s prisotnim mutiranim aleлом imajo višje koncentracije indirektnega bilirubina. Na proučevani skupini bolnikov z GS smo opazili trend zviševanja koncentracij indirektnega BLR s številom mutiranih alelov za polimorfizma A388G in T521C, vendar razlike niso bile statistično značilne. V prihodnje bi bilo zato smiselno izvesti raziskavo na večjem številu preiskovancev.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin-trifosfat
BDG	bilirubin diglukuronid
BLR	bilirubin
BMG	bilirubin monoglukuronid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid –trifosfat
GS	Gilbertov sindrom
MRP2	kanikularni multispecifični organski anionski prenašalec
OATP	organski anionski prenašalni polipeptid
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
<i>SLCO1B1</i>	gen za organski anionski prenašalec 1B1
<i>SLCO1B3</i>	gen za organski anionski prenašalec 1B3
UGT	uridindifosfat- glukoronil transferaze
<i>UGT1A1</i>	uridindifosfat- glukuroniltransferaza 1A1

## KAZALO SLIK

Slika 1: Nastanek bilirubina .....	2
Slika 2: Struktura bilirubina .....	3
Slika 3: Shematski prikaz privzema bilirubina v hepatocit .....	4
Slika 4: Konjugacija BLR z glukuronsko kislino.....	4
Slika 5: Nastanek, transport in izločanje bilirubina.....	5
Slika 6: Meritev koncentracije DNA v vzorčni raztopini s spektrofotometrom NanoDrop® ND-1000. ....	16
Slika 7: Shematski prikaz cikla verižne reakcije s polimerazo. ....	18
Slika 8: Oligonukleotidni začetniki .....	20
Slika 9: Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s sondami.....	22
Slika 10: Primer prikaza rezultatov genotipizacije za polimorfizem v genu <i>SLCO1B3</i> ....	29
Slika 11: Rezultati in razpršeni prikaz rezultatov.....	31
Slika 12: Odvisnost koncentracije celotnega bilirubina ( $\mu\text{mol/L}$ ) od genotipov <i>SLCO1B1</i> in <i>SLCO1B</i> .....	43
Slika 13: Odvisnost koncentracije indirektnega bilirubina ( $\mu\text{mol/L}$ ) od genotipov <i>SLCO1B1</i> in <i>SLCO1B3</i> .....	44

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Klinične značilnosti GS.....	10
Preglednica II: Haplotipi za polimorfizma A388G in T521C .....	12
Preglednica III: Valovne dolžine eksitacije in emisije v nm za CAL in FAM.....	21
Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi ter volumen reagentov za SLCO1B3 int 7.....	23
Preglednica V: Thermal Cycler Protocol.....	24
Preglednica VI: Sestava reakcijske zmesi ter volumen reagentov za <i>SLCO1B1</i> .....	24
Preglednica VII: Protokol PCR reakcije.....	25
Preglednica VIII: Povezava med fluorescenčnim signalom ter nukleotidnim zaporednjem vzorčne DNA.....	30
Preglednica IX: Genotipi ter koncentracije celotnega in indirektnega bilirubina v serumu preiskovanih bolnikov. ....	32
Preglednica X: Genotipske in alelske frekvence .....	37
Preglednica XI: Izračun pričakovanih frekvenc .....	40
Preglednica XII: Povprečna vrednost koncentracije bilirubina ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\pm$ standarda deviacija pri preiskovancih.....	42

## 1. UVOD

### 1.1 BILIRUBIN

#### 1.1.1 Nastanek, struktura in lastnosti bilirubina

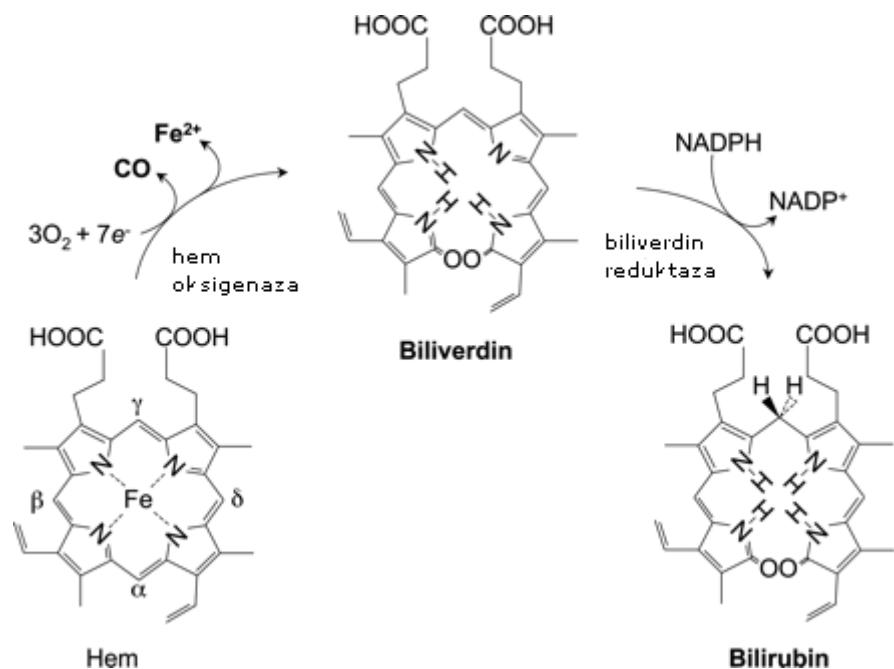
Bilirubin (BLR), končni produkt razgradnje hema, je rumenooranžno barvilo. V nizkih koncentracijah deluje kot antioksidant, v visokih koncentracijah pa je potencialno nevrotoksičen. Več kot 80 % BLR nastane iz hema pri katabolizmu hemoglobina, ki se sprosti iz razpadlih eritrocitov, preostali BLR pa izvira iz miglobina, katalaz, citokromov, peroksidaz in drugih hemproteinov oziroma iz neučinkovite eritropoeze. Dnevno nastane od 250 do 400 mg BIL, ki se v organizmu nahaja v različnih oblikah (1,2,3).

Te oblike BLR so:

- $\alpha$ -bilirubin: nekonjugirani BLR, ki je nekovalentno vezan na albumin,
- $\beta$ -bilirubin in  $\gamma$ -bilirubin: konjugirani oblici BLR (bilirubin monoglukoronid (BMG), bilirubin dikluronid (BDG)),
- $\delta$ -bilirubin: konjugirani BLR, ki je kovalentno vezan na albumin,
- prosti BLR: normalno manj kot 0,1 % celotnega BLR,
- fotoizomeri: 4Z,15Z-bilirubin, 4Z,15E- bilirubin, 4E,15E- bilirubin, 4E,15Z- bilirubin (4,5).

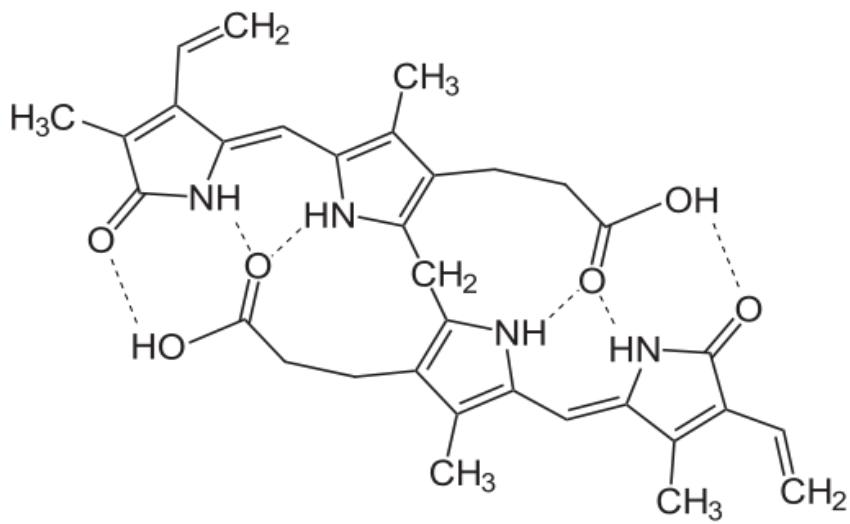
V organizmu so pri fizioloških pogojih vse oblike BLR v dinamičnem ravnotežju, ob zvišanju koncentracije ene od oblik se vzpostavi novo ravnotežje. Mehanizem nastanka bilirubina prikazuje Slika 1. Razgradnja hema poteka predvsem v retikuloendoteliskem sistemu vranice, manjši del pa tudi v jetrnih hepatocitih, Kupfferjevih celicah ter v ledvicah. Odprtje hemskega obroča poteka s pomočjo encimov hem-oksigenaze in NADPH. Pri tem se v obtok sprostita  $Fe^{2+}$  ter ogljikov monoksid, nastane pa zelen, vodotopen, netoksičen pigment biliverdin.

Biliverdin se ob prisotnosti biliverdin-reduktaze reducira do bilirubina, ki se po sprostitvi v serum do jeter transportira vezan na albumin (1,2,6).



**Slika 1:** Nastanek bilirubina (prirejeno po viru 7).

Molekula BLR je sestavljena iz štirih pirolovinilnih obročev, ki so med seboj povezani s  $-\text{CH}=\text{O}$  ali  $-\text{CH}_2-$  vezjo (slika 2). Zaradi prisotnosti dveh dvojnih vezi lahko BIL obstaja v štirih geometrijskih izomerih, in sicer 4Z, 15Z bilirubin, 4Z, 15E bilirubin, 4E, 15Z bilirubin ter 4E, 15E bilirubin. V telesu je prevladujoča oblika 4Z, 15Z bilirubin. Na svetlobi poteče ireverzibilni proces, tako se konformacija BLR spremeni v bolj vodotopno obliko 4Z, 15E bilirubin ali Z-lumirubin. Molekula vsebuje dve karboksilni ter dve laktamski skupini, vendar je BLR bolje topen v nepolarnih topilih, pri fiziološkem pH pa tvori v vodi netopne agregate. Lipofilnost BLR lahko pojasnimo z njegovo tridimenzionalno strukturo, iz katere je razvidno, da se med polarnimi skupinami tvorijo intramolekularne vodikove vezi (8).



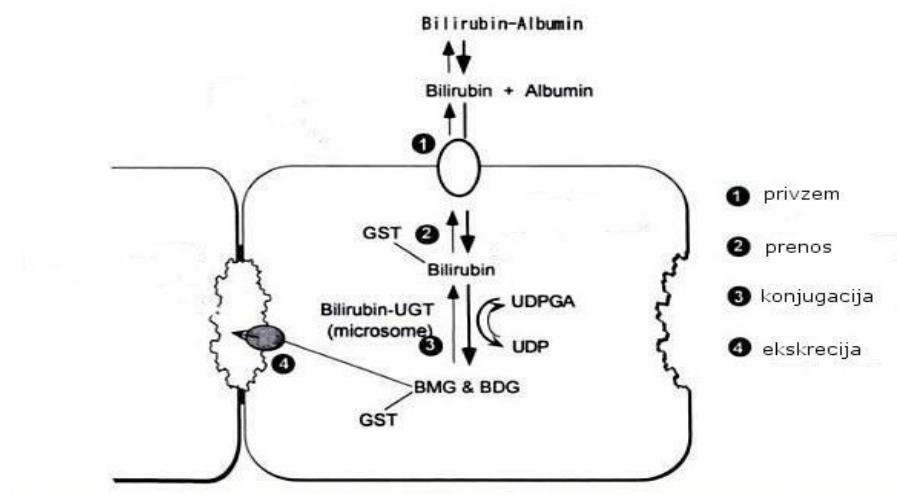
**Slika 2:** Struktura bilirubina, intramolekularne vodikove vezi so označene z črtkano črto.  
(9).

### 1.1.2 Presnova in izločanje bilirubina

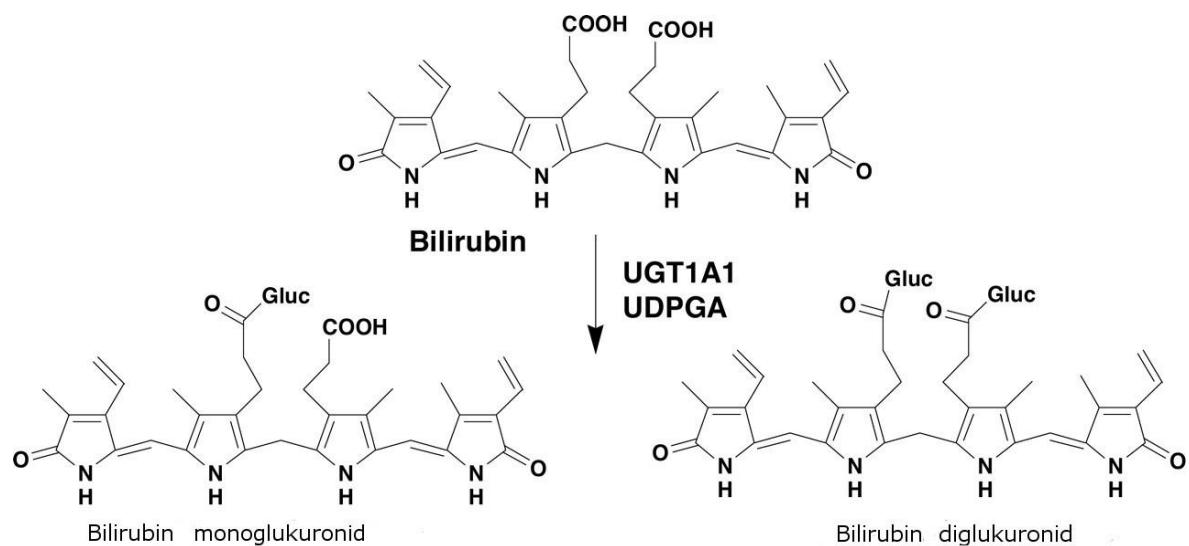
BLR, ki se v serumu reverzibilno veže na albumin in se prenese do jeter, imenujemo nekonjugiran BLR. Tako vezan BLR ne more prehajati čez možganske pregrade, v kolikor ta ni poškodovana . Le 0, 1% BLR v serumu predstavlja nativni prosti ali nevezani BLR. Na molekuli albumina je več vezalnih mest za vezavo BLR, vendar sta pomembni predvsem dve vezavni mesti, in sicer ima primarno mesto (poddomena IIA), ki ima desetkrat večjo konstanto vezave od sekundarnega mesta (poddomena IIIA). Pri normalni koncentraciji albumina se lahko veže do 600  $\mu\text{mol/L}$  BLR. Na albumin se lahko vežejo tudi druge snovi, kot so maščobne kisline, sulfonamidi, benzodiazepini in protivnetne učinkovine. Te snovi se lahko kompetitivno vežejo na isto vezalno mesto kot BLR, lahko pa se vežejo nekompetitivno na drugo vezalno mesto na albuminu in s tem povzročijo konformacijske spremembe, ki povečajo ali zmanjšajo možnost vezave BLR (6).

BLR se iz krvnega obtoka odstrani v jetrih. Pred vstopom v jetrne celice se sprosti z albumina, nato pa prehaja membrano hepatocita s pomočjo anionskih proteinskih prenosalcev ali s procesom difuzije (Slika 3). Znotraj hepatocita se BLR veže na citosolne proteine ligandise. S tem je preprečeno izločanje BLR iz celice nazaj v krvni obtok ter nespecifična difuzija BLR v predele hepatocita (6, 10).

Citoplazemski protein ligandin BLR prenese do endoplazmatskega retikuluma. Na endoplazmatskem retikulumu poteče reakcija esterifikacije z glukuronsko kislino, ki jo katalizira specifični izoencim UDP- glukuronil transferaza 1A1 (UGT1A1), ki spada v družino uridindifosfat- glukuroniltransferaz (UGT). Nastaneta vodotopna BLR monoglukoronid (BMG) in BLR diglukoronid (BDG) s skupnim imenom konjugiran BLR, ki se nato izločita v žolč (2, 10, 11).



**Slika 3:** Shematski prikaz privzema bilirubina v hepatocit, konjugacije z glukuronsko kislino in ekskrecije konjugatov v žolč. (B: bilirubin, BMG: bilirubin monoglukuronid, BDG: bilirubin-diglukuronid, UGT1A1: uridindifosfat-glukuroniltransferaza 1A1) (prirejeno po viru 12).

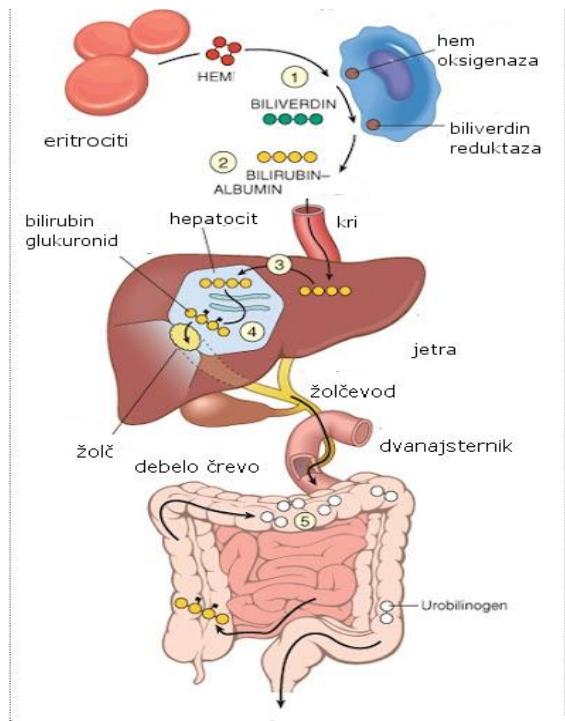


**Slika 4:** Konjugacija BLR z glukuronsko kislino.

Izločanje konjugiranega BLR v žolč je energijsko odvisen proces, poteka preko kanikularnih membran s prenašalnimi proteinimi. Kanikularni multispecifični organski anionski prenašalec (cMOAT), ki je poznan tudi kot »multidrug resistance protein» (MRP2), prenaša BMG, BDG in organske anione. Pri odraslih se skoraj 95 % vsega BLR izloči v žolč v obliki BMG in BDG, ostalo so glukozidi in ksilozidi.

Ob vnosu hrane se na pobudo gastrina in sekretina odpre Oddijev sfinkter in iz žolčnega mehurja se v zgornji del tankega črevesa izliva žolč, ki predstavlja mešanico žolčnih soli, holesterola, fosfolipidov in vode. Žolč se v žolčniku skoncentrira in v dvanajstniku pomeša s pankreatičnem sokom (2). Konjugati BLR se v črevesju hidrolizirajo z intestinalno  $\beta$ -glukuronidazo. Nastane nekonjugiran bilirubin, ki se nato pod vplivom anaerobnih bakterij reducira do različnih brezbarvnih tetrapirolov, ki se skupno imenujejo urobilinogeni.

Eden od drugega se razlikujejo po stopnji hidrogeniranosti stranskih vinilnih verig. Del nekonjugiranega BLR in do 20 % dnevno nastalih urobilinogenov se reabsorbira iz črevesja in vstopijo v enterohepatično cirkulacijo, kjer se ponovno skozi jetra izločijo v žolč (13). Ostalih 80 % urobilinogenov v spodnjem delu prebavnega trakta spontano oksidira urobiline, ki dajejo barvo blatu, s katerim se tudi izločijo (10).



**Slika 5:** Nastanek, transport in izločanje bilirubina (prirejeno po viru 14).

### **1.1.3 Toksičnost bilirubina**

Pri visokih koncentracijah nekonjugiranega BLR je lahko presežena vezalna kapaciteta na albuminih, zato je posledično več prostega BLR. Prosti nekonjugiran BLR pa je nevrotoksičen, saj lahko le-ta oblika prehaja čez hematoencefalno pregrado, vstopa v intersticijsko ter cerebrospinalno tekočino in se nalaga v bazalnih gangljih, hipokampusu, malih možganih ter drugih področjih možganov (15, 16).

BLR moti oksidativno fosforilacijo in inhibira ATP-azno aktivnost mitohondrijev, inhibira tudi sintezo RNA in proteinov ter presnovo ogljikovih hidratov v možganih. S tem ko, inhibira hidrolitične encime, dehidrogenaze in encime, ki sodelujejo pri transportu elektronov, povzroča selektivne poškodbe centralnega živčnega sistema, kar se odraža kot razvoj kernikterusa ali bilirubinske encefalopatije, pri kateri ločimo akutno ter kronično. Klinični znaki kernikterusa so povezani s hipertonijo in hipotonijo, možgansko paralizo in refleksnim opistotonusom. To lahko napreduje v letargijo, atonijo ali celo v smrt. Dolgoročne posledice vključujejo delno ali popolno izgubo sluha, paralizo pogleda navzgor, hipoplazijo zobne sklenine, nekotrolirane počasne gibe ter umsko zaostalost. Zmerno povečan BLR pa predstavlja zaščito pred oksidativnim stresom (13, 17).

## 1.2 MOTNJE V PRESNOVI BILIRUBINA

### 1.2.1 Hiperbilirubinemije

Stanje zvišane koncentracije bilirubina imenujemo hiperbilirubinemija. Kadar so koncentracije BLR tako visoke, da povzročijo porumenitev kože, vidnih sluznic in beločnic, to stanje klinično imenujemo zlatenica. Pri odraslih zlatenico klinično zaznamo pri koncentraciji BLR višji od 43 µmol/L, pri novorojenčkih pa pri koncentraciji višjih od 120 µmol/L (2). Visoke vrednosti BLR v krvi lahko vodijo do kernikterusa, zelo nevarnega kliničnega stanja, pri katerih se kažejo nevrotoksični učinki BLR.

Zvišane koncentracije BLR v krvi so lahko posledica motenj v presnovi BLR na katerikoli stopnji. Vzroki za hiperbilirubinemijo so lahko prirojeni ali pa so posledica bolezenskih stanj. Glede na molekulske oblike BLR, ki se kopiči v organizmu ločimo, **konjugirano** ter **nekonjugirano** hiperbilirubinemijo. Glede na mesto okvare, pa jih delimo na prehepatične, hepatične in posthepatične (10,18).

Vzroki za nekonjugirano hiperbilirubinemijo so:

- povečana produkcija nekonjugiranega BLR (prirojene ali pridobljene hemolitične anemije, neefektivna eritropoeza, hematom),
- moten transport nekonjugiranega BLR iz plazme v hepatocyte (kongestivno srčno popuščanje, ciroza jeter),
- okvarjene membrane hepatocita (kompetitivna inhibicija zaradi zdravil, GS, sepsa),
- moteno shranjevanje nekonjugiranega BLR v citosolu (povišana telesna temperatura),
- zmanjšana konjugacija v jetrih (neonatalna zlatenica, zdravila ki delujejo kot inhibitorji, Crigler-Najjar sindrom (CN), GS, hepatocelularne bolezni kot je hepatitis).

Odvisno od stopnje hemolize pa lahko zaradi povečanega vstopa BLR v jetra v črevesju najdemo tudi povečane količine konjugiranega BLR, kar povzroči povečan nastanek urobilinogenov. V urin nekonjugiran BLR ne prehaja, ker je vezan na albumin (10,19,20).

Vzroki za konjugirano hiperbilirubinemijo so:

- motnje v izločanju konjugiranega BLR iz hepatocita (hepatocelularne bolezni kot je hepatitis, prirojene presnovne motnje kot sta Dubin- Johnson in Rotorjev sindrom, ter nekatera zdravila).

Zaradi okvarjene funkcije jeter se v črevesje izločajo manjše količine konjugiranega BLR kot normalno, posledično je manjši nastanek urobilinogenov ter njihova prisotnost v blatu ter urinu. V serumu pa zaznamo povišane jetrne encime (10,19,20).

- obstrukcija pretoka žolča ( žolčni kamni, stenoza žolčevoda, tumorji ).

Moteno je izločanje konjugiranega BLR, zato se pojavijo višje koncentracije v krvi. Po krvnem obtoku kroži BLR kovalentno vezan na albumin in predstavlja delta frakcijo BLR. V rumenooranžnem urinu so prisotne velike količine konjugiranega BLR, medtem ko so urobilinogeni prisotni v manjših količinah oziroma jih ni. Tudi blato vsebuje zelo majhno količino urobilinogenov, zato je njihova barva tipično svetla, podobna barvi gline (19,20).

### 1.2.2 Diagnostika hiperbilirubinemij

Prisotnost povišane koncentracije BLR oziroma hiperbilirubinemije ugotavljam s potrditvenimi ter presejalnimi testi. Presejalni testi so metode, pri katerih uporabljamo klinično oceno zlatenice, uporabo transkutanega ikterometra in bilirubinometra. Metode določanja koncentracije BLR v serumu pa so :

- Reakcija diazotiranja po Jendrassik Grof-u

Po dodatku pospeševalca reagira z albumina sproščen BLR in vse ostale oblike BLR (konjugirani,  $\delta$  , idr.) z diazotirano sulfanilno kislino. V alkalnem mediju nastane modro-zeleni azobilirubin. Askorbinska kislina razgradi prebitni diazonijev klorid in prepreči vpliv hemoglobina na razvoj barve.

- bilirubinometer,
- reakcija na večslojni reagenčni ploščici,
- encimska metoda z bilirubin oksidazo (20).

Določanje BLR je zelo problematično zaradi narave BLR, saj obstaja v različnih oblikah, je netopen v vodi ter občutljiv na svetlobo. Vzorec za določanje BLR je serum ali plazma. Vzorec vzamemo na tešče, brez hemolize. Do analize ga shranimo zaščitenega pred svetlobo oziroma v temnem prostoru, saj lahko poteče na svetlobi oksidacija BLR. Stabilnost vzorca je 3 dni pri 4 °C ali 3 mesece pri -70 °C.

### 1.3 GILBERTOV SINDROM

Gilbertov sindrom (GS) je dedna motnja, za katero je značilna nekonjugirana hiperbilirubinemija v odsotnosti hemolize ter jetrnih bolezni. Prvič sta ga leta 1901 opisala Gilbert in Lereboullet. V literaturi je sindrom opisan tudi z naslednjimi sinonimi: Gilbert-Lerebouletov sindrom, Icterus intermittens juvenilis, Meulengrachtova bolezen in nekonjugirana benigna hiperbilirubinemija (22).

GS je najpogostejša dedna motnja v presnovi BLR, saj je glede na meritve serumske koncentracije BLR prisoten kar pri 3–10 % populacije (21). Pogostejši je pri moških (12,4 %), ki imajo tudi višje koncentracije BLR, kot pri ženskah (4,8 %) (2). Serumske koncentracije celotnega BLR se dvignejo na 20 do 50 µmol/L, redko pa presežejo 85 µmol/L (referenčne vrednosti za odrasle so do 17 µmol/L) (22). Značilno je, da vrednosti nihajo in rastejo ob metabolnem stresu, kot je stradanje ali prisotnost druge bolezni.

Pri večini bolnikov se GS diagnosticira v puberteti ali v zgodnji odrasli dobi. Velja za benigno motnjo, saj razen občasno povišanih koncentracij BLR ni prisotnih drugih patoloških odstopanj in zdravljenje ni potrebno (21,22). Kljub temu je diagnosticiranje GS klinično pomembno, saj so bolniki bolj doveztni za stranske učinke nekaterih zdravil. Zlasti irinotekanom, ki se uporablja za zdravljenje raka debelega črevesja. Bolniki z GS imajo lahko hudo diarejo. Poleg tega prispeva k razvoju hiperbilirubinemije in povečanemu tveganju za nastanek žolčnih kamnov pri mnogih dednih krvnih bolezni, kot so pomanjkanje glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, β- talasemiji, sferocitozi, neskladju krvnih skupin AB0 in srpasti anemiji. Prav tako lahko prispeva k povečanemu tveganju za razvoj raka na dojkah in jajčnikih, neonatalni hiperbilirubinemiji in razvoju žolčnih kamnov pri bolnikih s cistično fibrozo (23,24). Diagnosticiranje GS je pomembno tudi zaradi izključitve potrebe po nadaljnji invazivni diferencialni diagnostiki vzrokov hiperbilirubinemij, kot je jetrna biopsija (22).

**Preglednica I:** Klinične značilnosti GS (27).

<b>Epidemiologija</b>	9-16 % Kavkazijske populacije
<b>Klinični znaki</b>	Asimptomatska ali občasna zlatenica zaradi stresa
<b>Patofiziologija</b>	Pomanjkanje aktivnosti encima UGT1A1
<b>Laboratorijski rezultati</b>	Zvišan celokupni BLR in nizek direktni BLR, AST, ALT AF, ALB, PČ in aPTČ normalni
<b>Diferencialna diagnoza</b>	Akutni hepatitis in hepatotoksičnost

( AST- aspartat aminotransferaza, ALT AF- membranska alalninaminotransferaza, ALB- albumin, PČ- protrombinski čas, aPTČ- aktivirani parcialni tromboplastinski čas )

Vzroki za GS še niso povsem razjasnjeni. Najpomembnejšo vlogo igra znižana konjugacija BLR, ki je pri bolnikih z GS znižana na 30 % normalne (25). Pri bolnikih so dokazali tudi zmanjšan jetreni očistek bromosulfoftaleina, indocianin zelenega, tolbutamida, nikotinske kisline in drugih organskih anionov, kar kaže, da zmanjšan privzem BLR v hepatocite tudi prispeva k hiperbilirubinemiji (26).

Eden glavnih vzrokov za GS so mutacije v genu za bilirubin-UDP glukuroniltransferazo, ki se razlikujejo od populacije do populacije. Medtem ko je pri Kavkazijcih za razvoj GS odgovoren predvsem polimorfizem (TA)<sub>n</sub> v promotorskem zaporedju *UGT1A1*, je pri Azijcih za razvoj iste bolezni najpogosteje odgovorna mutacija G71R v kodirajoči regiji gena *UGT1A1*.

TATAA zaporedje v promotorju gena *UGT1A1* je vezavno mesto za transkripcijski faktor IID, ki omogoča iniciacijo transkripcije. Alel vsebuje 6 TA ponovitev (TA)<sub>6</sub>, kar omogoča popolno izražanje encima. Pri GS se v element (TA)<sub>6</sub> vrine dodaten TA par in nastane zaporedje (TA)<sub>7</sub>, ki vpliva na vezavo transkripcijskega faktorja in posledično zmanjša izražanje encima UGT1A1. Odkrili so tudi posameznike s 5 ali 8 TA ponovitvami, vendar sta ta dva alela pri Kavkazijcih zelo redko prisotna. Med številom TA ponovitev in aktivnostjo encima obstaja obratno sorazmerje: z naraščanjem števila TA ponovitev aktivnosti *UGT1A1* ustrezno pada in obratno. Ker je mutacija prisotna v nekodirajoči regiji, je nastali encim strukturno normalen.

Ker je dedovanje GS avtosomno recessivno, med bolnike prištevamo le homozigote s 7 TA ponovitvami ( $TA_{7/7}$ ), medtem ko so homozigoti za nemutiran alel ( $TA_{6/6}$ ) in heterozigoti s po enim mutiranim ter enim mutiranim alelom ( $TA_{6/7}$ ) zdravi. Klinični znaki GS se ne izrazijo pri vseh homozigotih ( $TA_{7/7}$ ), kar nakazuje na obstoj dodatnih faktorjev, ki so nujni za pojav sindroma.

Pri različnih populacijah se prisotnost mutiranega ( $TA_7$ ) alela razlikuje: pri Afričanih je alelska frekvenca ( $TA_7$ ) višja in pri Azijcih nižja kot pri kavkazijski populaciji, kjer je približno 34–40 % (23, 27, 28).

Poleg mutacij v genu *UGT1A1* so v zadnjih letih pričeli proučevati pri bolnikih GS tudi vlogo mutacij v genih *SLCO1B1* ter *SLCO1B3* zaradi njune vloge pri prenosu BLR v hepatocite.

### 1.3.1 Organski anionski prenašalec 1B1 (OATP1B1)

OATP1B1 je predstavnik družine SLCO (ang. Solute carrier organic anion transporters), ki se izraža izključno na bazolateralni strani hepatocita. Tako kot ostali predstavniki SLCO/OATP družine, je sestavljen iz 12 transmembranskih domen. Sinonimi za OATP1B1 so : SLCO1B1, LST1, LST-1, OATP2, OATPC, OATP-C, SLC21A6, MGC133282. OATP1B1 je glikoprotein sestavljen iz 691 aminokislin z molekulsko maso 84 kDa. Njegova funkcija je transport endogenih ter eksogenih amfipatičnih molekul iz krvi v hepatocite. Med endogene molekule spadajo: tauroholat, estron-3-sulfat,  $17\beta$ -estradiol-D-glukuronid, levkrotrien C<sub>4</sub>, prostagladin E<sub>2</sub>, ščitnični hormoni, bilirubin. Med eksogene molekule pa uvrščamo številne zdravilne učinkovine in ksenobiotike (organski anion bromosulfoftalein, glikozid oubain, peptidomimetik BQ-123, statine, aktivni metabolit irinotekana (SN-38), metotreksat, rifampicin, nekatere ACE inhibitorje in antagoniste angiotenzina II.). Natančen transportni mehanizem pri OATP-jih še ni poznan. Vemo pa, da transport snovi ni odvisen od gradijeta natrija, klorida in kalija, membranskega potenciala in ATP-ja. Nekateri znanstveniki so mnenja, da naj bi transport snovi potekal z elektro nevtralno izmenjavo, pri katerem bi se za vsak prenos organske snovi v hepatocit izločil nevtralizirajoči anion iz hepatocita nazaj v kri. Nevtralizirajoči anioni so bikarbonat, glutation ali glutation-S-konjugat (29,30).

OATP1B1 kodira gen *SLCO1B1*, ki leži na kromosomu 12p12 in je sestavljen iz 15 eksonov. V genu *SLCO1B1* so odkrili številne polimorfizme v kodirajočih regijah, ki povzročijo spremembo aminokisline v samem proteinu. To lahko vpliva na lokalizacijo in transportno funkcijo proteina. Podobno kot pri genu *UGT1A1* se tudi tu vrsta in pogostost razlikuje med pripadniki različnih etničnih skupin. Pri posamezniku je lahko sočasno prisotnih več sprememb, ki imajo v kombinaciji lahko drugačne posledice, kot bi pričakovali glede na vsako posamezno spremembo. Zato je smiselna korelacija fenotipa s kombinacijo sprememb - haplotipi. Halotipi so kombinacija alelov, ki se nahajajo na istem kromosomu zelo blizu skupaj in se zaradi tega tudi dedujejo skupaj. Pri OATP1B1 so ugotovili 17 haplotipov (28,33).

### **Polimorfizma A388G (N130D) in T521C (V174A)**

Vpliv na serumsko koncentracijo BLR so dokazali za polimorfizma 388A>G (N130D) in 521T>C (V174A).

**Preglednica II:** Haplotipi za polimorfizma A388G in T521C. Zgornja vrstica prikazuje mesto na genu *SLCO1B1*, kjer pride do zamenjave in s katerim nukleotidom je zamenjan. Spodnja vrstica pa prikazuje imena posameznega haplotipa (32).

Polimorfizmi	Brez sprememb	388G	521C	388G in 521C
Haplotipi	OATP1B1*1a	OATP1B1*1b	OATP1B1*5	OATP1B1*15

Polimorfizem A388G (N130D) se nahaja pri večini etničnih skupin. Pride do zamenjave aminokisline aspargin z aspartatom na drugi zunajceščni zanki OATP1B1. To povzroči povečanje celokupnega negativnega naboja proteina, kar lahko ima vpliv na vezavo substratov na protein (31). Polimorfizem A388G tako poveča transport bromosulfoftaleina, zmanjša transport tauroholata ter ne vpliva na transport estron sulfata in 17 β- estradiol glukuronida, kar so ugotovili z *in vitro* poskusih na HeLa celicah (30). Michalski ter sodelavci pa so v *in vitro* poskusih na MDCKII celicah ugotovili, da prisotnost polimorfizma A388G povzroči zmanjšano izražanje OATP1B1 na bazolaterarni membrani hepatocita (32).

V kombinaciji s polimorfizmom T521C, torej haplotip OATP1B1\*15, pa naj bi vplival tudi na transport estron sulfata in 17 β-estradiol glukuronida (33). Pogostost SNP-jev je odvisna od rasne skupine. Tako ima polimorfizem A388G frekvenco mutiranega alela –90 % pri Azijcih, 30–45 % pri Kavkazijcih in 70–80 % pri Afričanah (34).

Polimorfizem T521C (V174A) je eden izmed najbolj preučevanih polimorfizmov. Dokazali so, da prisotnost tega polimorfizma ter haplotipov OATP1B1\*5 in OATP1B1 \*15 zmanjša transportno funkcijo za substrate OATP1B1 kot, so estron sulfat, 17β-estradiol glukuronid ter nekateri statini. Zato je koncentracija le-teh povečana. Možna razloga za zmanjšan transport bi lahko bilo dejstvo, da se OATP1B1 z alaninom na mestu 174 ne izraža le na hepatocelularni membrani temveč tudi na v znotrajceličnem prostoru hepatocitov in je zato število OATP1B1 na membrani zmanjšano (33). Pogostost SNP-jev je odvisna od rasne skupine. Tako ima polimorfizem T521C frekvenco mutiranega alela 10-15 % pri Azijcih, 10-20 % pri Kavkazijcih in 1-2 % pri Afričanah (34).

Natančen mehanizem prenosa nekonjugiranega BLR v hepatocyte, še ni poznan. Predvideva pa se kombinacija difuzije in prenosa s prenašalci (28). Možno vlogo OATP1B1 v patogenezi GS dokazuje raziskava Cuija s sodelavci, ki so v *in vitro* pogojih dokazali, da je nekonjugiran BLR substrat za OATP1B1, prenos bromosulfoftalein kot modelne molekule za nekonjugiran BLR s *SLCO1B1*, ter zvišane koncentracije nekonjugiranega BLR pri osebah s spremembami nukleotidnega zaporedja gena *SLCO1B1* (28). Da je nekonjugiran BLR substrat za OATP1B1, so dokazli tudi Briz in sodelavci (37).

### 1.3.2 Organski anionski prenašalec 1B3 (OATP1B3)

Je organski anionski prenašalec 1B3, ki ga kodira gen *SLCO1B3*. Tako kot *SLCO1B1* tudi *SLCO1B3* spada v družino SLCO in se prav tako izraža izključno na bazolateralni strani hepatocita in je tako kot ostali predstavniki SLCO/OATP družine sestavljen iz 12 transmembranskih domen. Sinonimi za OATP1B3 so : OATP 8, LST – 3TM13, LST 3, *SLCO1B3*, *SLC21A8*. *SLCO1B3* obsega 106kb na kromosomu 12p12 in je sestavljen iz 15 eksonov. Njegova funkcija je transport endogenih ter eksogenih snovi v hepatocit.

Endogeni substrati za OATP8 so  $17\beta$ -estradiol glukuronid, estron-3-sulfat, želodčne kisline ter peptidni hormoni. Eksogeni pa so različne zdravilne učinkovine, kot je rifampicin, digoksin, pitavastatin in antagonist endotelnega receptorja BQ-123 (35).

OATP1B3 ima 80% identičnih aminokislin kot OATP1B1 in oba imata prekrivajoč spekter substratov. Zanimivo je, da v primerjavi z OATP1B1 o OATP1B3 bistveno manj knjižnih podatkov. Prvi opis o identifikaciji SNP-jev v kodirajoči regiji gena *SLCO1B3* se je pojavil šele leta 2001. Ugotovili so, da SNP 334T>C povzroči zamenjavo aminokisline Ser112Ala (29).

Nedavni študiji sta pokazali povezanost nukleotidne zamenjave G>C v intronu 7 *SLCO1B3* s koncentracijo serumskega bilirubina prebivalcev Sardinije ter Koreje (36, 38). Briz ter sodelavci pa so ugotovili, da ima *SLCO1B3* pomembno vlogo v privzemu nekonjugiranega BLR pri plodu, čez placento, prav tako pa lahko bistveno prispeva pri prenosu nekonjugiranega BLR v hepatocyte pri odraslih (37).

Seveda se pogostost polimorfizmov in haplotipov *SLCO1B3* razlikuje med populacijami. Polimorfizme so do sedaj proučevali na štirih populacijah: na svetlopoltilih Kanadčanih, svetlopoltilih Evropejcih, Japoncih in Afro-Američanih (39).

## 2 NAMEN DELA

GS je najpogostejša dedna motnja v presnovi bilirubina. Nekonjugirana hiperbilirubinemija nastane kot posledica kombinacije znižane konjugacije BLR in zmanjšanega privzema v jetrne celice. Čeprav velja za benigno motnjo, je njegovo diagnosticiranje klinično pomembno zaradi pomena pri individualizaciji zdravljenja z zdravili, ki so substrati za UGT1A1, OATP1B1 ali OATP1B3.

Gena *SLCO1B1* in *SLCO1B3* nosita zapis za prenašalca OATP1B1 in OATP1B3, ki sta med glavnimi prenašalci organskih anionov iz krvi v jetra. Med substrati za prenašalca je med drugimi tudi bilirubin. V genih *SLCO1B1* in *SLCO1B3* so odkrili številne polimorfizme, ki lahko vplivajo na količino ali strukturo prenašalnega proteina in s tem na učinkovitost transporta BLR.

Namen našega dela bo preučiti povezanost polimorfizmov v genih *SLCO1B1* in *SLCO1B3* s koncentracijami bilirubina pri bolnikih z GS.

V ta namen bomo:

- v raziskavo vključili skupino bolnikov z GS,
- preiskovancem določili genotipe za preiskovane polimorfizme A388G ter T521C v genu *SLCO1B1* ter polimorfizem v int 7 gena *SLCO1B3*,
- statistično ovrednotili povezano med polimorfizmi v genih *SLCO1B1* in *SLCO1B3* in serumskimi koncentracijami nekonjugiranega BLR.

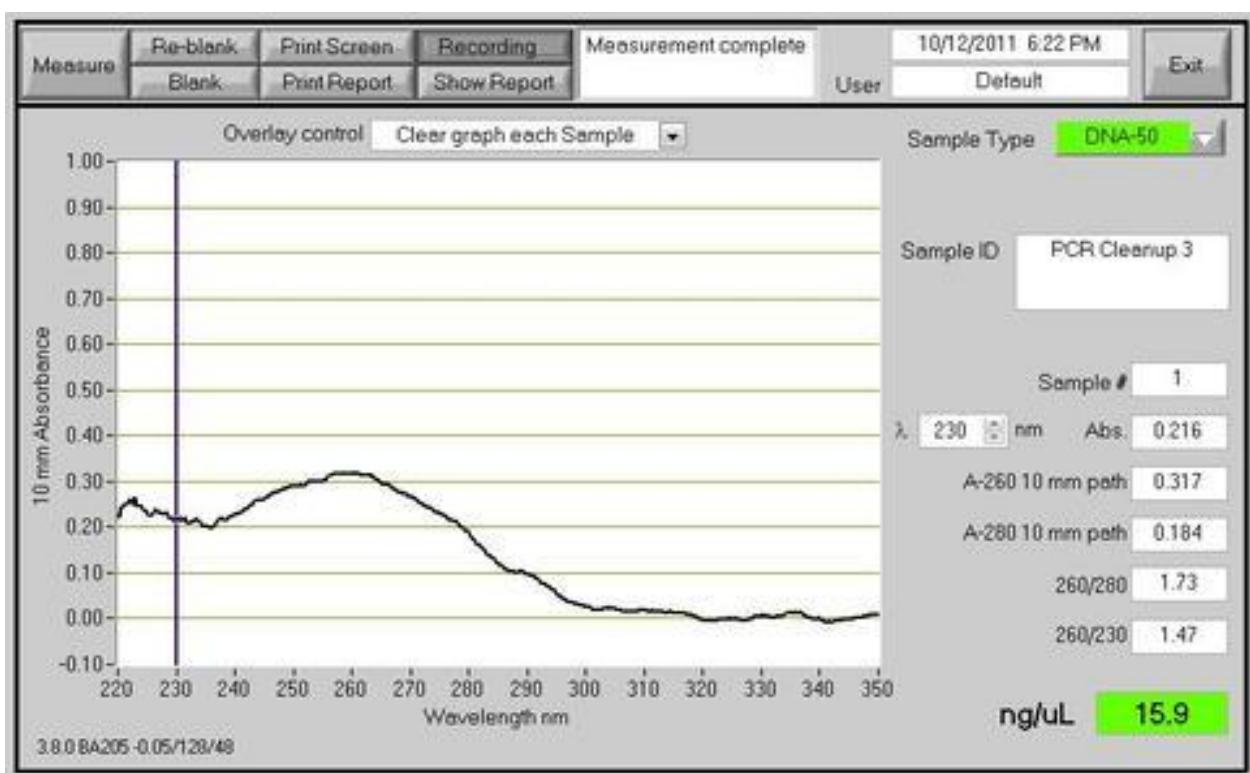
## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili 95 mladostnikov, ki so bili napotni na Pediatrično kliniko s sumom na GS. Povprečna vrednost koncentracije celokupnega BLR preiskovancev je bila  $51,1 \pm 23,9 \mu\text{mol/L}$ . Vzorci, ki smo jih prejeli, so bile izolirane DNA iz polne krvi. Do uporabe smo jih hranili v zamrzovalniku.

### 3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN VZORČNIH DNA

Razredčenim raztopinam DNA smo morali pred začetkom dela izmeriti koncentracijo, saj je za genotipizacijo pomembno, da so raztopine DNA enakih koncentracij. Uporabili smo spektrofotometer NanoDrop® ND-1000. Slika 6 prikazuje primer meritve vzorčne DNA.



**Slika 6:** Meritev koncentracije DNA v vzorčni raztopini s spektrofotometrom NanoDrop® ND-1000.

Tako pripravljene raztopine smo na osnovi predhodno izmerjenih koncentracij redčili do končne koncentracije 5ng/ $\mu$ L oz 10ng/ $\mu$ L.

### 3.2.1 SPEKTROFOTOMETER NanoDrop® ND-1000

NanoDrop® je širokospikalni (220 - 750 nm) spektrofotometer, s katerim lahko z veliko natančnostjo in ponovljivostjo izmerimo koncentracijo nukleinskih kislin in proteinov v vzorcih z volumnom vsaj 1  $\mu$ L. Deluje na osnovi retencijske tehnologije, ki izkorišča površinsko napetost za pravilen položaj vzorca. Tako ne potrebujemo kivet in ostalih naprav, ki bi lahko kontaminirale vzorec (40).

#### Delovanje

Na konec spodnje optične enote odpipetiramo 1 $\mu$ L vzorca. Nato položimo zgornjo optično enoto na spodnjo, tako da pride v stik z vzorcem in nastane most med obema optičnima enotama. Izvor svetlobe predstavlja pulzna ksenonska žarnica za analizo svetlobe , ki je prešla skozi vzorec, pa se uporablja t.i. »Charge- coupled device« detektor (na svetlobo občutljiv polprevodniški element iz silikonskih diod, ki svetlobo pretvori v električni signal). Inštrument je povezan z računalnikom, ki ima nameščeno ustrezno programsko opremo, s katero obdelamo te signale in dobimo rezultate meritve (40).

### 3.2.2 Določanje koncentracije in čistosti DNA

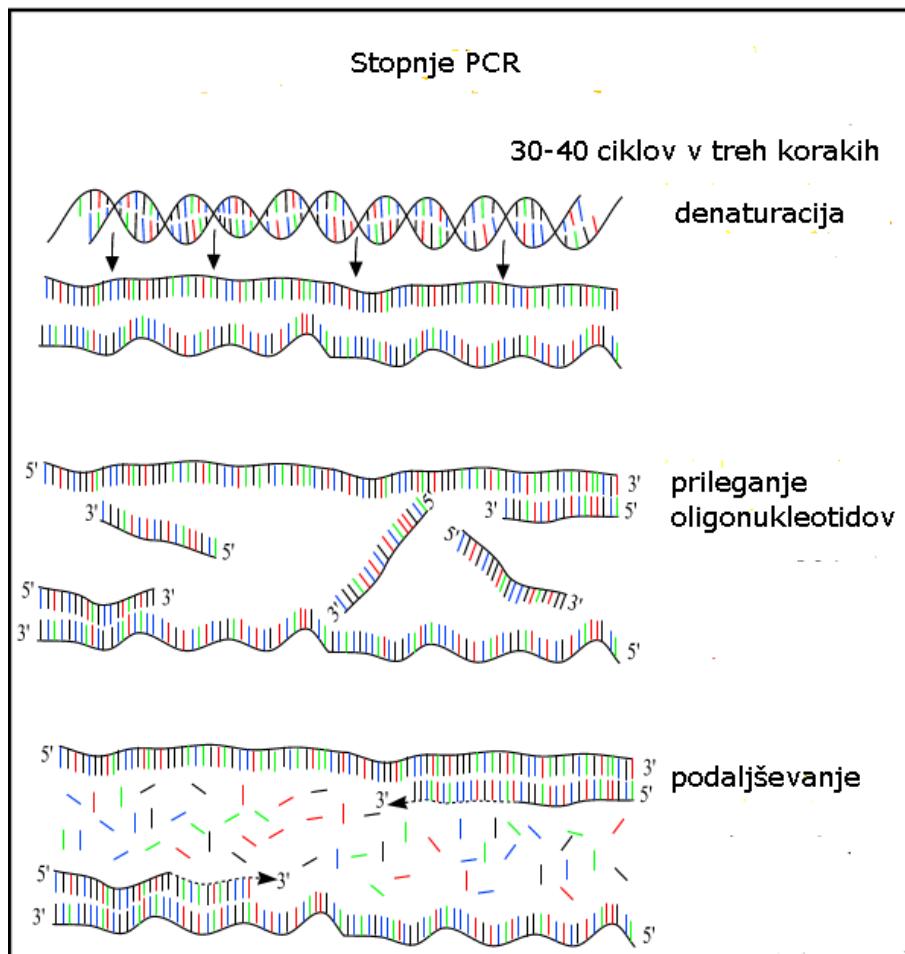
Za določanje koncentracije merimo absorbanco pri  $\lambda= 260\text{nm}$ . Optična gostota 1 pomeni, da je v vzorcu 50 $\mu\text{g}$  DNA/mL. Če hočemo določiti kontaminacijo s proteini pa izmerimo razmerje med  $A_{260}$  in  $A_{280}$ . Pri čisti DNA je razmerje med  $A_{260}$  in  $A_{280}= 1,8$ . Če je razmerje nižje od 1,8 je DNA kontaminirana s proteini (41).

### 3.2.3 Materiali in oprema

- visokoprečiščena voda, Gibco™, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- osnovne raztopine vzorčnih DNA,
- spektrofotometer NanoDrop® ND-1000,
- polavtomatske pipete (Eppendorf) za različne volumne,
- avtoklavirane 1,5 in 0,5 mL Eppendorfove epruvete (Sarstedt),
- mešalnik Vortex Genie (Scientific Industries),
- avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt).

### 3.3 REAKCIJA VERIŽNE POLIMERIZACIJE (PCR)

Reakcija verižne polimerizacije (PCR) je metoda za hitro pomnoževanje DNA *in vitro*. Reakcija poteka ciklično, pri čemer je en cikel reakcije sestavljen iz treh stopenj. V prvi stopnji z visoko temperaturo denaturiramo matrično DNA (obe komplementarni verigi se ločita). Denaturacija poteče pri 94–95 °C. V naslednji stopnji temperaturo reakcijske zmesi znižamo pod temperaturo tališča vezave obeh oligonukleotidov. Prileganje začetnikov poteka pri temperaturi 40–60°C. V zadnji stopnji temperaturo dvignemo na optimalno območje za delovanje encima DNA-polimeraze. DNA-polimeraza začne pri temperaturi 72 °C izgrajevati komplementarno verigo. To poteka tako, da se veže na oligonukleotidni začetnik in začne v smer 5' proti 3' graditi komplementarno verigo. DNA, ki nastane v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih verig v naslednjem ciklu. Teoretično se število DNA verig eksponentno povečuje. Običajno izvedemo 20–40 ciklov.



Slika 7: Shematski prikaz cikla verižne reakcije s polimerazo (prirejeno po viru 42).

Reakcijsko zmes sestavlja: vzorec DNA, Mg<sup>2+</sup> ioni, deoksinukleozid- trifosfati, ki predstavljajo gradnike nove verige DNA, reakcijski pufer, dva začetna oligonukleotida in termostabilna DNA polimeraza (43, 44).

Obstaja več različnih izvedb PCR. V nalogi smo uporabili KASP genotipizacijo za določanje genotipov v genu *SLCO1B1* ter genotipizacijo z hidrolizirajočimi sondami (*Taqman* sonde) pri določanju genotipov v genu *SLCO1B3*.

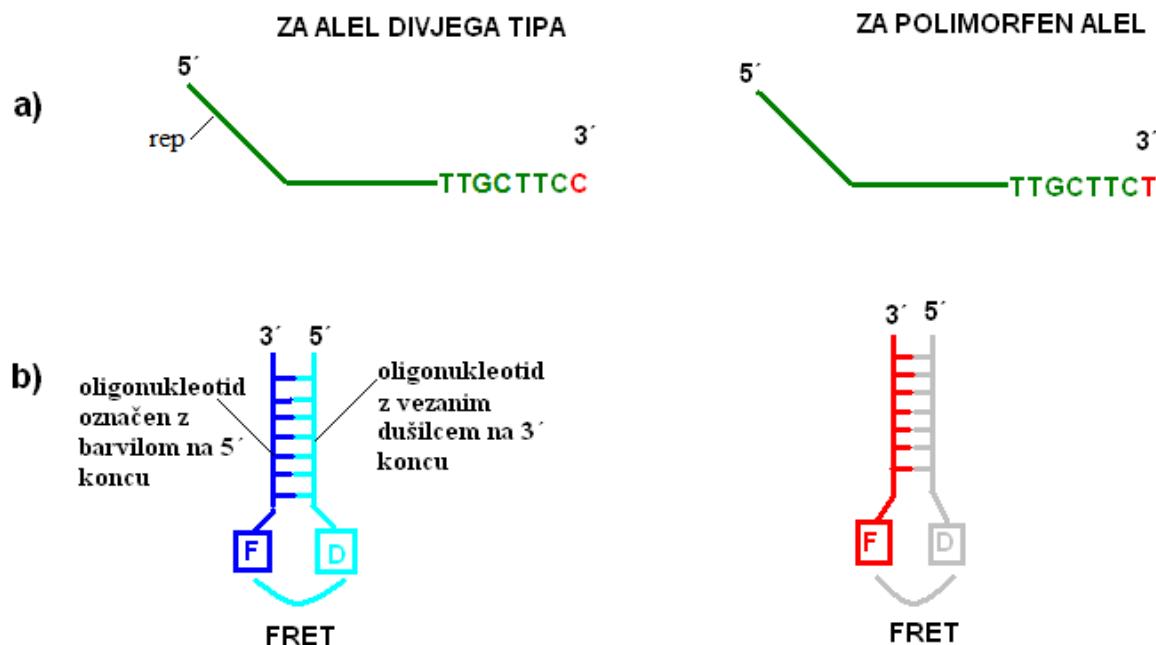
### 3.3.1 KASP genotipizacija

Za izvedbo genotipizacije dveh polimorfizmov A388G in T521C v genu *SLCO1B1* smo uporabili KASP genotipizacijski sistem. KASP (ang. Kbioscience Competitive Allele-Specific PCR) je homogena genotipizacijska tehnologija v končni točki, ki deluje na podlagi FRET- tehnologije (FRET- ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer). S KASP tehnologijo lahko določamo polimorfizme posameznih nukleotidov (SNP) in majhne insercije ali delecije. KASP genotipizacijski sistem je sestavljen iz dveh komponent prve, ki je specifična za posamezen SNP in vsebuje tri neoznačene oligonukleotidne začetnike (Assay mix) ter druge tj. univerzalne reakcijske zmesi (Reaction mix), ki vsebuje vse ostale potrebne komponente, vključno s sistemom za fluorescenco in specifično polimerazo Taq (45).

Za lažje razumevanje principa delovanja reakcije so najprej predstavljeni oligonukleotidni začetniki:

- **Dva alelno specifična začetnika.** Vsak začetnik je specifičen za posamezen SNP. Zgrajena sta tako, da se s 3' koncem vežeta na polimorfno mesto na DNA, na 5' koncu pa imata zaporedje, ki se ne veže na DNA verigo ( t. i. rep). Ta dva začetnika nista označena z barvili (Slika 8a).
- **En skupen obratnosmerni ( reverzni ) začetni oligonukleotid,** ki gradi komplementarno verigo.
- **Dva oligonukleotida, označena na 5' koncu s fluorescentnim barvilom.** Eden je označen s barvilm FAM drugi pa z barvilm CAL. Ta oligonukleotida se vežeta na repno sekvenco na 5' koncih alelno specifičnih začetnikov. Na začetku reakcije sta povezana z oligonukleotidoma z vezanima dušilcema (Slika 8b). Med reakcijo pomnoževanja se sprostita in pride do porasta fluorescence.

- **Dva začetna oligonukleotida , ki imata na 3' koncu vezan dušilec signala.** Sta komplementarna oligonukleotidoma, ki sta označena z barvili in preko FRET-tehnologije prestrezata fluorescenco barvil, dokler je to potrebno.



**Slika 8:** Oligonukleotidni začetniki a) alelno specifična začetnika s polimorfnim mestom na 3' koncu b) oligonukleotid, označen z barvilo in njenemu komplementaren oligonukleotid z vezanim dušilcem (levo za alel divjega tipa; desno za alel s polimorfizmom; F pomeni fluorescenčno barvilo; D pomeni dušilec). Na začetku reakcije sta oligonukleotida povezana- prihaja do FRET. Tekom reakcije se ločita, oligonukleotid z barvilm se veže na rep na 5' koncu alelno specifičnega začetnika (F in D se oddaljita), ni več FRET, zaradi tega pride do porasta fluorescence.

V začetnih ciklih PCR-reakcije se ustrezan alelno-specifični začetni oligonukleotid veže na komplementarno zaporedje neposredno navzgor od mesta polimorfizma. 3' konec začetnega oligonukleotida je vezan na polimorfno mesto. Prav tako se veže tudi skupni reverzni začetni oligonukleotid ter tako poteče PCR, kjer potem alelno-specifični začetni oligonukleotid postane matrična veriga. Med fazo, s fluoroforom označen oligonukleotid ostane vezan s komplementarnim dušilcem fluorescentnega signala ter fluorescencija še ne poraste. Ko reakcija teče dalje, eden izmed označenih oligonukleotidov ustreza zaporedju pomnoženega alela, ki predstavlja novo matrično verigo.

Označeni oligonukleotid se odcepi od dušilca, se poveže s komplementarno verigo in ustvari se fluorescentni signal, ki ga prepoznamo in zabeležimo. V kolikor je vzorec homozigot, se bo ustvaril le eden izmed možnih fluorescentnih signalov. V kolikor pa je oseba heterozigot, bomo zabeležili mešani fluorescentni signal. Pri KASP-genotipizacijskem sistemu se uporabljata barvili CAL in FAM, ki emitirata svetlobo pri različnih valovnih dolžinah. Vrednosti eksitacije in emisije za obe barvili so podane v preglednici (45).

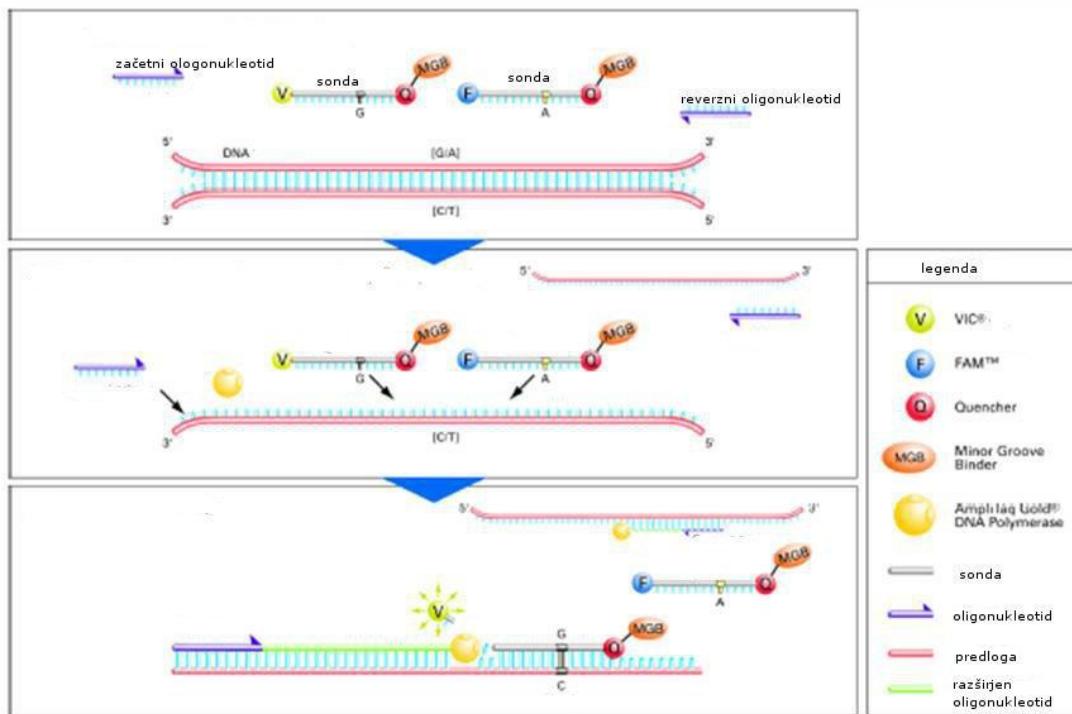
**Preglednica III:** Valovne dolžine eksitacije in emisije v nm za CAL in FAM (45).

BARVILO	EKSITACIJA (nm)	EMISIJA (nm)
FAM	485	520
CAL	534	556

### 3.3.2 Genotipizacija z hidrolizirajočimi sondami (*TaqMan* sonde)

Za genotipizacijo polimorfizma v genu *SLCO1B3* pa smo uporabili genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami.

Pri hidrolizirajočih sondah gre za kratko zaporedje DNA, ki ima na 5' koncu vezan fluorofor in na 3' koncu dušilec. Ko sta vezana skupaj, fluorofor prejeto svetlobno energijo odda v obliki fluorescence, to pa sprejme dušilec ter odda v obliki toplote. Fluorescence ne zaznamo. Nukleotidno zaporedje sonde je komplementarno izbranemu tarčnemu zaporedju in če je to prisotno, se bo nanj vezalo, v nasprotnem primeru pa ne. Če torej do povezave pride, ga med reakcijo podaljševanje verige doseže *Taq* polimeraza in ga s svojo 5' proti 3' eksonukleazno aktivnostjo razcepi. Dušilec in fluorofor nista več povezana. Pride do oddajanja fluorescence, ki se kopiči med cikličnim pomnoževanjem DNA. Za genotipizacijo potrebujemo dve sondi.



**Slika 9:** Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s *Taqman* sondami (prirejeno po viru 47).

### 3.3.3 SPLOŠNA DOLOČILA pri pripravi reakcijskih zmesi in PCR- reakcije

Reakcija PCR je zelo občutljiva na kontaminacijo s tujo DNA. Zaradi kontaminacije reakcijske zmesi dobimo lažne rezultate. Zato smo morali reakcijsko zmes pripraviti v ustrezno čistem okolju. Oblečene smo imeli halje, ki smo jih uporabljali samo v tistem laboratoriju. Preden smo začeli s pripravo reakcijske zmesi, smo komoro ter ves potreben pribor (ploščice, pipete še posebno na predelih, katerih se dotikamo) temeljito očistili s 3 % hipokloritom, centrifugo pa smo zaradi plastike očistili z 70 % etanolom ter jih pustili v komori pod UV-lučko 30 minut. Plastične epruvete, nastavke za pipete za enkratno uporabo smo dan prej avtoklavirali 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1 bar. Medtem smo odtalili reagente, ki smo jih shranjevali v zamrzovalniku pri temperaturi - 20 °C. Vzorčne raztopine DNA pa smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Prav tako smo nastavili program na aparatu za izvajanje kasnejše reakcije PCR in preračunali ustrezne volumne reagentov. Posamezne volumne reagentov smo pomnožili s številom vzorcev, ki smo jih genotipizirali.

Zaradi izgub pri pipetiranju, smo vzeli 10 % pribitek reagentov. Volumni reagentov za en vzorec in za skupno število vzorcev s pribitkom so prikazani v preglednici IV.

### 3.3.4 GENOTIPIZACIJA *SLCO 1B3 int7*

**Preglednica IV:** Sestava reakcijske zmesi ter volumen reagentov za *SLCO1B3 int 7*

Reagenti	Za 1 vzorec	Za 8 vzorcev
H <sub>2</sub> O	4,2 µL	35,0 µL
5xMix	1,6 µL	13,6 µL
P-S 40x	0,2 µL	1,7 µL
DNA (5ng/µL)	2,0 µL	-
<b>Skupni volumen</b>	<b>8,0 µL</b>	<b>6,0 µL x 8</b>

Ko smo ugasnili UV- lučko na komori, smo zamenjali rokavice brez smukca, prenesli reagente v komoro, jih dobro premešali ter centrifugirali. Nato smo v posebno označeno epruvetko, s polavtomatskimi pipetami prenesli ustrezne volumne posameznih reagentov, jo premešali in centrifugirali. Vzeli smo trakove z osmimi epruvetkami in v posamezno epruvetko z reverznim pipetiranjem odpipetirali 5,17 µL pripravljene zmesi reagentov. Potem smo v posamezno epruvetko odpipetirali po 3 µL DNA raztopin vzorcev, ki smo jih predhodno centrifugirali 2 minuti pri 2100 obratih na minuto. V slepi vzorec pa smo dodali namesto DNA, 3 µL ultra čiste vode. Trakove z osmimi epruvetkami smo dobro zaprli s pokrovčki, pri čemer smo morali paziti, da smo se jih čim manj dotikali. Nato smo jih centrifugirali 2 minuti pri 1900 obratih na minuto in jih nato vstavili v ciklični pomnoževalnik ABI PRISM® 7000 SDS, ki smo ga prižgali 15 min, preden smo začeli genotipizacijo, in zagnali predhodno nastavljen program. Za genotipizacijo smo uporabili tehniko vročega začetka (Hot Start PCR) z namenom preprečitve pomnoževanja nespecifičnih PCR- produktov, ki lahko nastanejo med samo pripravo reakcijske zmesi (nespecifična vezava začetnikov na DNA verigo). Hot Start se izvaja tako, da imamo pred začetkom PCR- reakcije nekaj minutno fazo denaturacije, znotraj katere se aktivira tudi Taq DNA-polimeraza. Pogoji za izvedbo PCR- reakcije so opisani v preglednici V.

**Preglednica V:** Thermal Cycler Protocol

Stopnja PCR	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	95 °C	15 min
Denaturacija (45 ciklov) Prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje (1 cikel)	95 °C 60 °C	15 s 1 min
Alelna diskriminacija	60 °C	1 min

**3.3.5 GENOTIPIZACIJA *SLCO1B1* A388G in T521C**

Polimorfizma smo analizirali na aparatu PCR v realnem času »Light Cycler® 480«. Vzorce ter reagente smo pipetirali v mikrotitrsko ploščico. Počistili smo komoro, kot je opisano že pri prejšnjih analizah, izračunali smo število vzorcev, slepega vzorca, tri kontrole ter 10 % pribitka reagentov, kot je prikazano v tabeli VII.

**Preglednica VI:** Sestava reakcijske zmesi ter volumen reagentov za *SLCO1B1* (A388G in T521C)

Reagenti	Za 1 vzorec	Za 8 vzorcev
H <sub>2</sub> O	1,42 µL	12,50 µL
2x Reaction mix	3,0 µL	26,4 µL
Assay (A388T oz. T521C)	0,083 µL	0,730 µL
DNA (5ng/µL)	1,5 µL	-
<b>Skupni volumen</b>	<b>6 µL</b>	<b>39,63 µL</b>

1. V tabelo smo napisali položaje vzorcev in jih po enakem zaporedju kasneje pipetirali na ploščico.
2. Pripravili smo 2 epruvetki ter odpipetirali reagente, različni reagent za zmes je Assay mix, eden za A388G ter drugi za T521C.
3. Pri pipetiranju v ploščice, smo mogli biti zelo pozorni, najprej smo razdelili reagente in nato vzorce, pri vzorcih smo za vsakega menjali nastavek za pipetiranje zaradi različnih vzorcev ter različnih reagentov.
4. Ploščico smo prilepili s folijo
5. Ploščico smo centrifugirali 2 min pri 1900 rpm
6. Med časom, ko sveti UV lučka v komori, smo pripravili aparat

Na računalniškemu programu za aparaturom PCR v realnem času »Light Cycler® 480« smo nastavili naš protokol ter označili ustrezeno mesto vzorcev v ploščici. Pogoji za PCR reakcijo na »Light Cycler® 480« je opisana v preglednici IX.

#### **Preglednica VII:** Protokol PCR reakcije

Stopnja PCR	Ponovitve	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	1x	95°C	15 min
Ciklizacija	10x	95°C	20s
		65°C	1min
Ciklizacija 2	18x	95°C	20 s
		57°C	1 min
Kvantifikacija	15x	95°C	20 s
		57°C	1 min
		37°C	5s

### 3.3.5 MATERIALI IN OPREMA

Reagenti:

- 2x KASP Reaction Mix (KBioscience) – univerzalen fluorescentni reporterski sistem, dNTP, encim Taq DNA- polimerazo in pasivno referenčno barvilo (ROX),
- Assay mix (KBioscience)- vseboval je tri neoznačene začetnike s koncentracijami 100 µM, in sicer dva alelno specifična začetnika in skupen obratnosmerni začetnik (za vsak polimorfizem svoj Assay mix),
- Vzorci DNA (konc. ~ 5ng/µL).

Pribor ter aparature:

- avtoklavirani nastavki za pipete 10 µL in 200 µL (Sarstedt, Nemčija),
- škatlice za avtoklavirane nastavke (Sarstedt, Nemčija),
- polavtomatske pipete 0,1 - 10 µL; 2 - 20 µL; 20 - 200 µL (Eppendorf, Nemčija),
- avtoklavirane epruvete 1,5 mL ( Sarstedt, Nemčija),
- delovna komora (Biosan DNA/RNA UV- Cleaner (UVC/T-M-AR, Latvija),
- mikrotitrskie ploščice 384 vdolbinicami (Roche Applied Science, Pentzberg, Nemčija),
- optična lepljiva folija (Roche Applied Science, Pentzberg, Nemčija),
- mešalnik Vortex-2 Genie (Scientific Industries),
- ciklični pomnoževalnik Light Cycler® 480 (Roche Applied Science, Pentzberg, Nemčija),
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- trakovi z osmimi epruvetami ter njihovi pokrovčki,
- ciklični pomnoževalnik ABI PRISM® 7000 SDS ( Applied Biosystems),
- avtoklav
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

### **3.4 MERJENJE KONCENTRACIJE BILIRUBINA**

Koncentracije celokupnega bilirubina v serumu so z metodo po Jendrassik-Grofu izmerili na Pediatrični kliniki v Ljubljani. Princip je opisan v poglavju diagnostika hiperbilirubinemije.

### **3.5 STATISTIČNA ANALIZA**

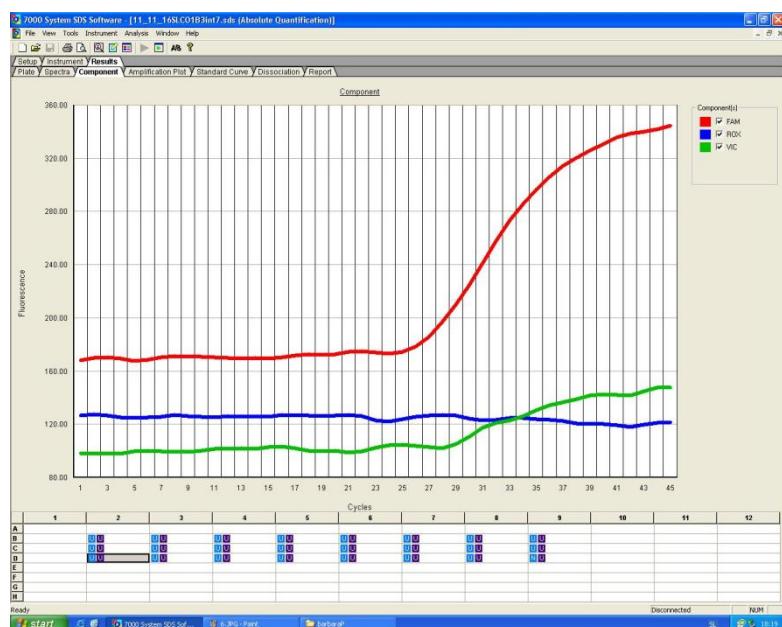
Rezultate genotipizacije smo statistično obdelali s programom SPSS for Windows verzija 20.0. Posameznim skupinam preiskovancev smo za vsak polimorfizem določili frekvence genotipov in s pomočjo  $\chi^2$  testa preverili, če so v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. S Shapiro-Wilksovim testom smo preverili normalnost porazdelitve koncentracij BLR v posameznih genotipskih podskupinah. Ker se vrednosti niso normalno porazdeljevale, smo jih logaritmirali. Za ugotavljanje povezanosti genotipov s koncentracijami BLR smo uporabili analizo variance (ANOVA) ali Studentov t-test. Za statistično značilne smo vzeli  $p$ , ki so bili manjši od 0,05.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

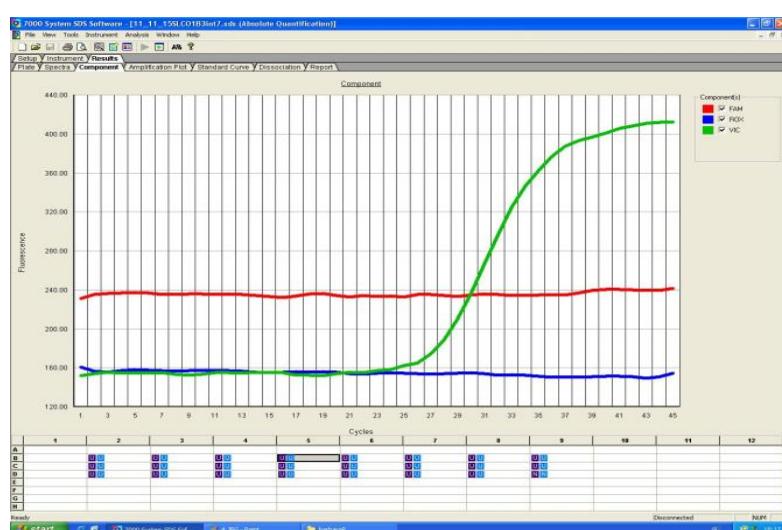
### 4.1 IZVEDBA IN OPTIMIZACIJA GENOTIPIZACIJE

Po končani reakciji PCR smo vsem vzorcem določili genotipe za vsak polimorfizem glede na porast fluorescence posameznih barvil. Porast barvila FAM je pomenilo genotip GG, porast barvila VIC pa genotip CC pri genu *SLCO1B3*. Če je prišlo do porasta fluorescenc obeh barvil, je to pomenilo prisotnost genotipa CG pri genu *SLCO1B3* (slika 10).

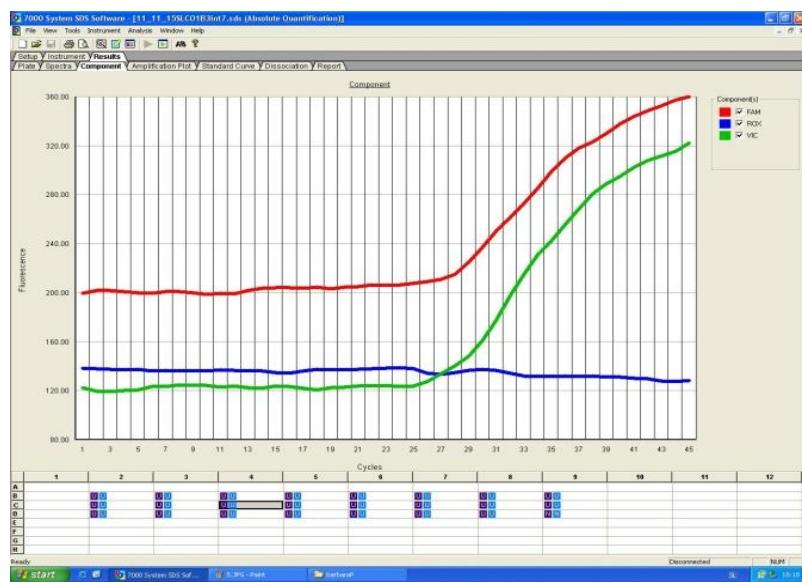
a)



b)



c)



**Slika 10:** Primer prikaza rezultatov genotipizacije za polimorfizem v genu *SLCO1B3*. a) Na sliki se vidi porast barvila FAM, b) na sliki se vidi porast barvila VIC, c) prikazan je porast obeh barvil (heterozigot).

KASP- genotipizacija je v osnovi metoda v končni točki, mi pa smo jo uporabljali kot PCR v realnem času. S tem smo lahko bolj natančno opazovali potek reakcije. Po končani reakciji smo izvedli alelno diskriminacijo, ki nam je podala še rezultate v končni točki za celotno serijo vzorcev. Protokol reakcije, ki ga je predlagal proizvajalec, je zajemal 15 minutno začetno denaturacijo pri 94 °C in nato 35-krat ponovitev cikla: 10 sekund pri 94 °C, 20 sekund pri 57 °C in 40 sekund pri 72 °C. Ker smo za genotipizacijo uporabljali PCR v realnem času, smo protokol modificirali tako, da smo od proizvajalca predlaganih 35 ponovitev cikla skrajšali na 24 ponovitev cikla ter še dodali 18 ponovitev cikla: 10 sekund pri 94 °C, 20 sekund pri 57 °C in 30 sekund pri 25 °C. To smo naredili zato, ker se porast fluorescence reporterskega barvila lahko detektira le pri 25 °C. Protokol je prikazan v preglednici V.

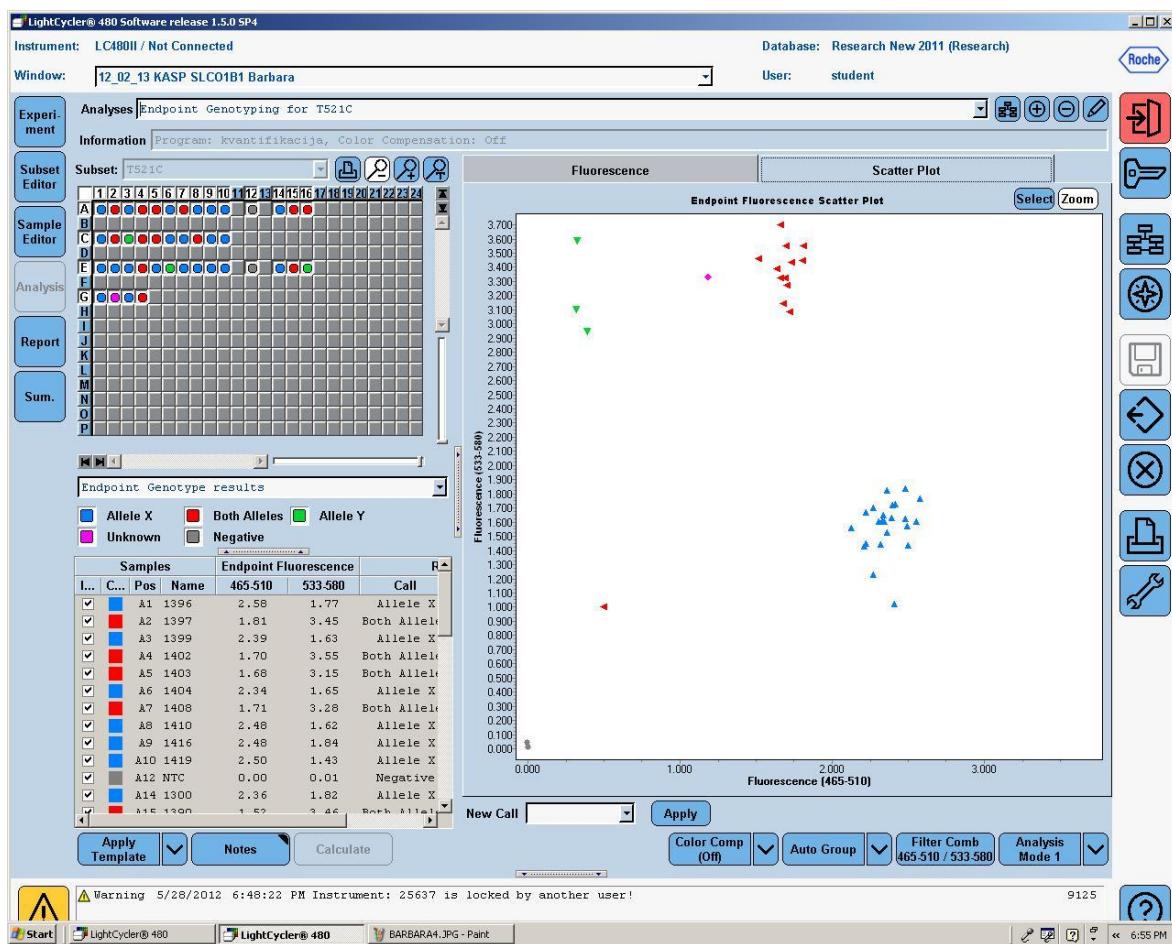
Genotipizacijo za polimorfizma A388G in T521C v genu *SLCO1B1* smo izvedli na aparatu Light Cycler® 480, ki deluje na istem principu kot ABI 7000. Genotipizacijo smo izvedli na ploščici z 384 vdolbinicami za vsak polimorfizem posebej. Po končani genotipizaciji smo vzorcem določili genotipe. Te smo ugotovili s pomočjo alelno specifičnih oligonukleotidnih začetnikov.

Povezava med fluorescenčnim signalom ter nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA je prikazana v preglednici VIII (sondi za oba polimorfizma vsebujeta enaki reporterski barvili).

**Preglednica VIII:** Povezava med fluorescenčnim signalom ter nukleotidnim zaporednjem vzorčne DNA

Porast signala	Genotip za polimorfizem <b>A388G</b>	Genotip za polimorfizem <b>T521C</b>
<b>le FAM</b>	AA	TT
<b>le CAL</b>	GG	CC
<b>FAM in CAL</b>	AG	TC

S pomočjo alelne diskriminacije smo določili genotipe za vsak vzorec na ploščici. Slika 11 prikazuje rezultate genotipizacije za eno ploščico vzorcev.



**Slika 11:** Rezultati in razpršeni prikaz rezultatov ; modra barva, genotip TT oz. AA (Allela X), rdeča barva genotip TC oz AG (Both alleles) , zelena barva: genotip CC oz. GG (Allele Y), s sivo so označene slepi vzorci, z roza barvo pa neuspeli vzorci za polimorfizma A388G in T521C v genu *SLCO1B1*.

Po prvi izvedbi genotipizacije nekateri vzorci niso uspeli, zato smo morali postopek genotipizacije ponavljati. Neuspele vzorce smo spet redčili oziroma smo analizirali polovični in dvakratni volumen vzorca. Ponovno smo izvedli reakcijo PCR in odčitali genotipe.

## 4.2 POGOSTOST POLIMORFIZMOV

**Preglednica IX:** Genotipi ter koncentracije celotnega in indirektnega bilirubina v serumu preiskovanih bolnikov.

Vzorci	Bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )		Genotip A388G	Genotip T521C	SLCO1B3
	celokupni	indirektni			
1260			AG	TT	CC
1261	51	45	AG	TT	CC
1268	64	57	AG	TC	CC
1269	37	30	GG	TT	CC
1270	149	137	AG	TT	CC
1271	52	43	AA	TT	CC
1272	67	57	AA	TT	CC
1292	46	40	AG	TC	CC
1296	73	61	GG	TT	CC
1298	81	71	AA	TT	CC
1299	27	22	AG	TT	CC
1300	81	71	GG	TT	CC
1332			AA	TT	CC
1334	37	30	AG	TT	CC
1341	29	24	AG	TT	CC
1342	34	28	AG	TC	CG
1343	74	60	GG	TT	CG

1344	48	39	GG	TC	CG
1345	30	24	AG	TC	CC
1346	55	45	AA	TT	CC
1347	39	31	AA	TT	CC
1367	78	49	GG	TC	CG
1368	23	18	GG	TT	CG
1376	77	68	GG	TC	CG
1377	32	27	AG	TT	CC
1382	37	30	AG	TC	CC
1386	37	30	AG	TT	CG
1388	77	70	GG	TC	CC
1389	31	22	AG	TT	CC
1390	31	26	AG	TC	CC
1391	26	22	GG	TT	CC
1392	51	44	AA	TT	CC
1393	27	22	AA	TT	CC
1394	81	74	AG	TC	CC
1395	58	49	GG	CC	CG
1396	44	36	AA	TT	CC
1397	62	53	GG	TC	CG
1399	51	44	AA	TT	CG

1402	27	13	AG	TC	CC
1403			AG	TC	CC
1404	44	36	GG	TT	CG
1408	37	31	AG	TC	CC
1410	94	76	AG	TT	CG
1416	74	67	AG	TT	CC
1419	53	44	AG	TT	CG
1423	62	53	AG	TT	CG
1424	64	55	AA	TC	GG
1449			GG	CC	CG
1450	41	33	AG	TC	CC
1452	106	97	GG	TC	CG
1458	21	17	AA	TT	CC
1459	27	18	AG	TT	CC
1463	38	28	AA	TC	CC
1469	71	62	AG	TT	CG
1273			AA	TT	CC
1366	45	37	AA	TT	CC
1378	37	31	AA	TT	CC
1381	39	31	AA	TT	CC
1383	53	44	AA	TC	CC

1475			AA	TT	CC
1474			AG	CC	CC
1471			AA	TT	CC
1384	52	50	AG	TT	CG
1385	32	26	AG	TT	CG
1387			AG	TT	CC
1468	27	18	AA	TT	CC
1472			AG	TC	CC
1477			AG	TT	CC
1473			AA	TC	CC
1480			GG	TT	CC
1482			AA	TC	CC
1487			AA	TT	CC
1491			AA	TT	CC
1492			AA	TT	CG
1495			GG	TT	CC
1497			AA	TT	CC
1498			AA	TT	CC
1499			AA	TT	CC
1501			AA	TT	CG
1502			AA	TC	CG

1503			AG	TT	CG
1508			AG	TC	CC
1509			AG	TT	CC
1511			AA	TT	CC
1513			AG	TC	CG
1514			GG	TC	CG
1515			AA	TT	CC
1519			AG	TC	CG
1662			AA	TT	CC
1663			AG	TT	CC
1664			GG	TT	CC
1488			GG	TT	CG
1489			AG	TC	CC
1490			AA	TT	CC
1510			AA	TT	CC

V preiskovani populaciji slovenskih bolnikov z Gilbertovim sindromom smo potrdili vse tri možne genotipe vseh proučevanih polimorfizmov. Na osnovi teh podatkov smo lahko določili odstotek prisotnosti posameznega genotipa v tej populaciji ter alelske frekvence posameznih alelov (Preglednica X).

**Preglednica X:** Genotipske in alelske frekvence

a) polimorfizma A388G v populaciji bolnikov z Gilbertovim sindromom

<b>Genotip</b>	<b>Število preiskovancev z določenim genotipom (n = 95)</b>	<b>Odstotek preiskovancev z določenim genotipom</b>
<b>AA (alel A)</b>	36 (111)	37,9 % (58,4 %)
<b>AG</b>	39	41,1 %
<b>GG (alel G)</b>	20 (79)	21,1 % (41,6 %)

b) polimorfizma T521C pri populaciji bolnikov z Gilbertovim sindromom

<b>Genotip</b>	<b>Število preiskovancev z določenim genotipom (n = 95)</b>	<b>Odstotek preiskovancev z določenim genotipom</b>
<b>TT (alel T)</b>	63 (155)	66,3 % (81,6 %)
<b>TC</b>	29	30,5 %
<b>CC (alel C)</b>	3 (35)	3,2 % (18,4 %)

c) polimorfizma v int 7 gena *SLCO1B3* pri populaciji bolnikov z Gilbertovim sindromom

<b>Genotip</b>	<b>Število preiskovancev z določenim genotipom (n = 95)</b>	<b>Odstotek preiskovancev z določenim genotipom</b>
<b>CC (alel C)</b>	67 (161)	70,5 % (84,7 %)
<b>CG</b>	27	28,4 %
<b>GG (alel G)</b>	1 (29)	1,1 % (15,3 %)

Izračun alelske frekvence (*Enačba 1*) nam pove, kolikšen je odstotek pojavnosti določenega alela v neki populaciji.

$$\text{alelska frekvenca alela } X = \frac{\text{število alelov } X \text{ v populaciji}}{\text{število vseh alelov v populaciji}} \times 100 \%$$

### ***Enačba 1* : Izračun alelske frekvence**

Pri polimorfizmu A388G je pogostost pojavljanja genotipa GG 21,1 %. Največjo pojavnost ima genotip AG 41,1 %. Frekvenca mutiranega alela je v naši skupini preiskovancev za ta polimorfizem znašala 41,6 %. To je podobno kot so v različnih študijah določili za Kavkazijce nasploh (30-51 %) (36).

Pri polimorfizmu T521C je pogostost pojavljanja genotipa CC razmeroma nizka, odstotek znaša 3,2 %. Največjo pojavnost ima genotip TT 66,3 %. Frekvenca mutiranega alela je v naši skupini preiskovancev za ta polimorfizem znašala 18,4 %. Vrednost pade v interval, ki so jo določili za Kavkazijce (14–22 %) (36).

Pri genu *SLCO1B3* je iz preglednice X razvidno, da je pogostost genotipa GG zelo nizka in je v naši raziskavi le 1,1 %. Frekvenca mutiranega alela 15,3 %.

Rezultate smo primerjali z edino razpoložljivo raziskavo, to je raziskava pri prebivalcih Sardinije. Naše frekvence so precej nižje kot frekvence prebivalcev Sardinije, katere so ugotovili Sanna in sodelavci (36). Drugih raziskav nismo zasledili, zato ne moremo z gotovostjo trditi kako je drugje.

Preverili smo tudi, ali so opažene genotipske frekvence v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Hardy- Weinbergov model predvideva, da imamo v populaciji dva alela, mutiranega A in nemutiranega a. Frekvenca prvega je p in drugega q. Za diploidne organizme, ki so v Hary- Weinbergovem ravnotežju velja, da je  $p + q = 1$  ter  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ .

Opažene frekvence so alelske frekvence, ki smo jih dobili v preiskovanem vzorcu. Izračunamo jih tako, da število mutiranih ali nemutiranih alelov delimo s številom vseh alelov. V našem vzorcu je, če za izračun Hardy-Weinbergovega ravnotežja upoštevamo genotipe A in G pri polimorfizmu A388G, število mutiranih alelov G je 59, število nemutiranih alelov a pa 131, število vseh alelov pa 190. Vrednost  $p=0,3105$  in  $q=0,6895$ .

Če upoštevamo genotipe T in C pri polimorfizmu T521C, število mutiranih alelov C je 32, število nemutiranih alelov t pa 158, število vseh alelov pa 190. Vrednost  $p=0,1684$  in  $q=0,8316$ .

Pri genu *SLCO1B3* pa upoštevamo genotipa C in G , število mutiranih alelov G je 28, število nemutiranih alelov c pa 162, število vseh alelov pa 190. Vrednost  $p=0,1474$  in  $q=0,8526$ .

Genotipske frekvence ( $p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$ ) predstavljajo delež genotipov med vsemi genotipi oseb v populaciji.

Pričakovane frekvence so produkt genotipskih frekvenc in števila vseh preiskovancev v vzorcu (n=95).

**Preglednica XI:** Izračun pričakovanih frekvenca) polimorfizma A388G gena *SLCO1B1*

	<b>Opažene Frekvence</b>	<b>Genotipske frekvence</b>	<b>Pričakovane Frekvence</b>
<b>Homozigot AA</b>	36	$q^2=0,4754$	45
<b>Homozigot GG</b>	20	$P^2=0,0964$	9
<b>Heterozigot AG</b>	39	$2pq=0,4282$	41

b) polimorfizma T521C gena *SLCO1B1*

	<b>Opažene Frekvence</b>	<b>Genotipske frekvence</b>	<b>Pričakovane Frekvence</b>
<b>Homozigot TT</b>	63	$q^2=0,6916$	66
<b>Homozigot CC</b>	3	$P^2=0,0284$	3
<b>Heterozigot TC</b>	29	$2pq=0,2801$	27

c) polimorfizma v int7 gena *SLCO1B3*

	<b>Opažene Frekvence</b>	<b>Genotipske frekvence</b>	<b>Pričakovane Frekvence</b>
<b>Homozigot CC</b>	67	$q^2=0,7269$	69
<b>Homozigot GG</b>	1	$P^2=0,0217$	2
<b>Heterozigot CG</b>	27	$2pq=0,2513$	24

Opažene frekvence smo primerjali s pričakovanimi s  $\chi^2$  testom. In za vsak polimorfizem preverili, če so frekvence genotipov v Hardy- Weinbergovem ravnotežju. Hardy-Weinbergovo načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja. Načelo velja za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer se osebki naključno razmnožujejo, ni selekcije vzorcev, dodatnih mutacij in migracij.  $\chi^2$  je pokazal, da ni statistično značilne razlike med opazovano genotipsko frekvenco, ki smo jo dobili pri eksperimentalnem delu, in pričakovano genotipsko frekvenco, ki smo jo izračunali po Hardy- Weinbergovem načelu. Vrednost  $p$  je znašala 0,176 pri polimorfizmu A388G, pri polimorfizmu T521 0,874 za gen *SLCO1B1*, za genotipe v int 7 gena *SLCO1B3* pa 0,533.

Ker je izračunani  $p > 0,05$ , to pomeni, da ni statistično značilne razlike med opaženimi in pričakovanimi frekvencami in da so frekvence genotipov za polimorfizma A388G in T521C v genu *SLCO1B1* ter genotipi v int 7 gena *SLCO1B3* pri genotipiziranih preiskovancih v Hardy- Weinbergovem ravnotežju.

S testom  $\chi^2$  smo naredili primerjavo porazdelitve alelnih frekvenc določenih v naši raziskavi s porazdelitvijo drugih študij. Vzeli smo porazdelitev alelnih frekvenc v študiji, Picarda in sodelavcev (46) za iste preiskovane polimorfizme v genu *SLCO1B1*. Vrednost  $p$  je znašala pri polimorfizmu A388G 0,454 in pri polimorfizmu T521C 0,853, kar pomeni, da ni statistično značilne razlike med frekvencami alelov v obeh populacijah (46). Pri polimorfizmu v genu *SLCO1B3* smo primerjali alelnne frekvence pri prebivalcih Sardinije ter naše alelnne frekvence. Vrednost  $p$  je bila  $< 0,001$ , kar pomeni, da obstaja statistično značilna razlika med frekvencami genotipov v obeh populacijah. Alelnne frekvence pri prebivalcih Sardinije znašajo 32,1 % za mutiran alel pri bolnikih z hiperbilirubinemijo, ter 27,1 % za mutiran alel pri zdravih preiskovancih (36).

### 4.3 UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV S SERUMSKIMI KONCENTRACIJAMI INDIREKTNEGA BILIRUBINA

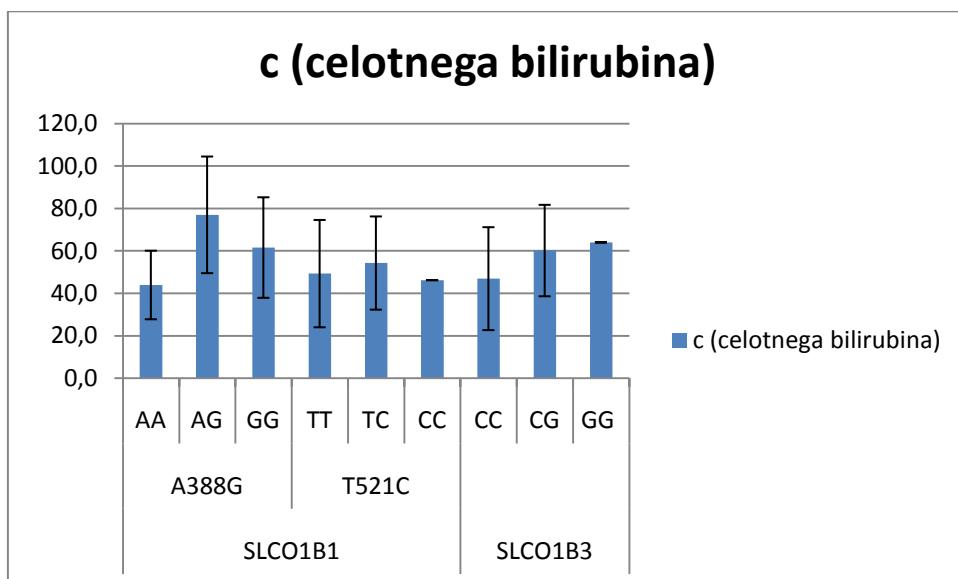
Povprečne vrednosti serumskega BLR glede na genotip preiskovancev so prikazane v preglednici XIII. Slika 12 in slika 13 pa prikazujeta odvisnost koncentracije BLR od genotipov.

**Preglednica XII:** Povprečna vrednost koncentracije bilirubina ( $\mu\text{mol/L}$ )  $\pm$  standarda deviacija pri skupini preiskovancev z genotipi AA, AG, GG za polimorfizem A388G, TT,TC,CC za polimorfizem T521C ter genotipe CC, CG,GG za polimorfizem v int 7 gena *SLCO1B3*.

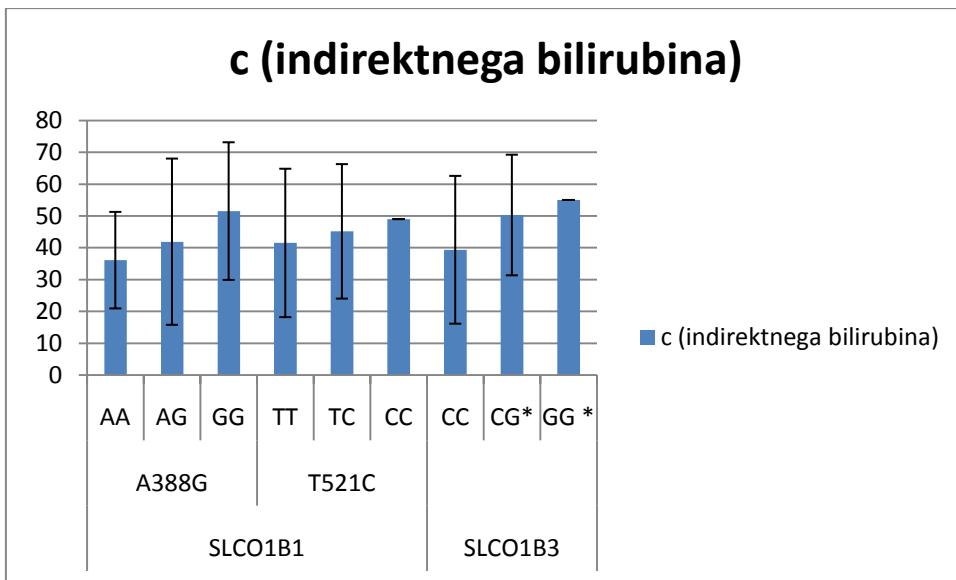
<b>Genotip A388G</b>	<b>Preiskovanci</b>	<b>Povprečna vrednost bilirubina</b>	
		<b>Celotni</b>	<b>indirektni</b>
<b>AA</b>	19	$45,3 \pm 16,2$	$36,9 \pm 15,2$
<b>AG</b>	26	$49,5 \pm 27,5$	$41,9 \pm 26,1$
<b>GG</b>	14	$61,6 \pm 23,7$	$51,5 \pm 21,6$

<b>Genotip T521C</b>	<b>Preiskovanci</b>	<b>Povprečna vrednost bilirubina</b>	
		<b>Celotni</b>	<b>indirektni</b>
<b>TT</b>	37	$49,3 \pm 25,2$	$41,5 \pm 23,3$
<b>TC</b>	18	$54,3 \pm 22,0$	$45,1 \pm 21,1$
<b>CC</b>	1	57,9	49,0

<b>Genotip int 7 gena</b> <i>SLCO1B3</i>	<b>Preiskovanci</b>	<b>Povprečna vrednost bilirubina</b>	
		<b>Celotni</b>	<b>indirektni</b>
<b>CC</b>	39	$46,9 \pm 24,2$	$39,4 \pm 23,2$
<b>CG</b>	17	$60,2 \pm 21,5$	$50,3 \pm 18,9$
<b>GG</b>	1	64,0	55,0



**Slika 12:** Odvisnost koncentracije celotnega bilirubina ( $\mu\text{mol/L}$ ) od genotipov *SLCO1B1* in *SLCO1B3*; vrednosti bilirubina so izražene kot povprečne vrednosti koncentracij, z njihovimi standardnimi deviacijami.



**Slika 13:** Odvisnost koncentracije indirektnega bilirubina ( $\mu\text{mol/L}$ ) od genotipov *SLCO1B1* in *SLCO1B3*; vrednosti bilirubina so izražene kot povprečne vrednosti koncentracij z njihovimi standardnimi deviacijami. Z \* je označena statistično značilna razlika.

Za statistično obdelavo smo pri polimorfizmih gena *SLCO1B1* T521C in polimorfizmu v int 7 gena *SLCO1B3* v eno skupino združili heterozigote in mutirane homozigote. Razlog je bil v tem, da smo pri obeh omejenih polimorfizmih v naši preiskovani skupni, pri preiskovancih, za katere smo imeli na razpolago meritve koncentracij BLR, določili le po enega mutiranega homozigota.

Najprej smo s Shapiro-Wilksovim testom preverili normalnost porazdelitve koncentracij indirektnega BLR v posameznih genotipskih skupinah. Izračunana vrednost  $p$  je bila  $< 0,001$ , kar pomeni, da porazdelitev ni normalna. Ker se vrednosti niso normalno porazdeljevale v posameznih genotipskih skupinah, smo jih logaritmirali in s tem dosegli normalno porazdelitev. S testom ANOVA smo za polimorfizem A388G v genu *SLCO1B1* izračunali  $p = 0,180$ , kar pomeni, da med genotipi ni statistično značilnih razlik v koncentracijah indirektnega BLR. S t-testom smo za polimorfizem T521C v genu *SLCO1B1* izračunali  $p = 0,410$ , kar pomeni, da med genotipi ni statistično značilnih razlik v koncentracijah indirektnega BLR.

Glede na opaženi trend zviševanja koncentracij BLR s številom kopij mutiranega alela pri obeh proučevanih polimorfizmih *SLCO1B1* in odsotnost statistično značilne povezave bi bilo smiselno izvesti študijo na večjem številu preiskovancev.

Pri polimorfizmu v int 7 gena *SLCO1B3* smo s t-testom izračunali  $p = 0,022$ , kar pomeni, da je statistično značilna razlika v koncentracijah indirektnega BLR med genotipi. Bolniki s prisotnim mutiranim alelom imajo višje koncentracije indirektnega BLR. Do takšnih zaključkov so prišli tudi Sanna ter raziskovalci pri preiskovanju tega polimorfizma pri prebivalcih Sardinije (36).

## 5. SKLEP

V diplomskem delu smo ugotavljali vpliv polimorfizmov v genih *SLCO1B1* in *SLCO1B3* na koncentracijo bilirubina pri bolnikih z Gilbertovim sindromom. Naša hipoteza je bila, da prisotnost polimorfizmov v imenovanih genih vpliva na serumsko koncentracijo indirektnega BLR.

V preiskovalni skupini 95 bolnikov z Gilbertovim sindromom smo določili naslednje frekvence genotipov:

- za polimorfizem A338G v genu *SLCO1B1*, 39 heterozigotov AG (41,1 %), 36 homozigotov AA (37,9 %), 20 homozigotov GG (21,1 %),
- za polimorfizem T521C v genu *SLCO1B1*, 29 heterozigotov TC (30,5 %), 63 homozigotov TT (66,3 %) in 3 homozigote CC (3,2 %),
- za polimorfizem v int 7 gena *SLCO1B3* pa smo določili 27 heterozigotov CG (28,4 %), 67 homozigotov CC (70,5 %) ter 1 homozigota GG (1,1 %).

Frekvence mutiranih alelov polimorfizmov A388G in T521C v genu *SLCO1B1* pri Slovencih so se ujemale z rezultati ki so jih določili za Kavkazijce nasploh (30 - 51 % za polimorfizem A388G in 14 - 22 % za polimorfizem T521C).

Frekvenca mutiranega alela polimorfizma v int 7 gena *SLCO1B3* pri Slovencih je bila 15,3 %.

Dokazali smo statistično značilno povezavo med koncentracijo indirektnega BLR in genotipom polimorfizma v int 7 gena *SLCO1B3*. Bolniki s prisotnim mutiranim aleлом imajo višje koncentracije indirektnega BLR.

Na proučevani skupini bolnikov z GS smo opazili trend zviševanja koncentracij indirektnega BLR s številom mutiranih alelov za polimorfizma A388G in T521C, vendar razlike niso bile statistično značilne. V prihodnje bi bilo zato smiselno izvesti raziskavo na večjem številu preiskovancev.

## 6. LITERATURA

1. Meisenberg G., Simmons WH. Principles of Medical Biochemistry, 2nd eds., Mosby Elsevier, Philadelphia, 2006: 453-463.
2. Abel G., Palmer-Toy D. Hem Synthesis and Catabolism. In: McClatchey MD. Clinical Laboratory Medicine, 2nd eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 401-417.
3. Kikuchi A., Park SY., Miyatake H., et al. Crystal structure of rat biliverdin reductase. In: Nature Structural Biology 2001; 8: 221-225.
4. Furlan D. Proučevanje izomerizacije biliverdina med fototerapijo otrok z neonatalno nekonjugirano hiperbilirubinemijo. Magistrsko delo 2003: 2-27.
5. Lukač Bajalo J. Molekularne oblike biliverdina v serumu. V: Kržišnik C., Urgentna pediatrija in intenzivno zdravljenje (Izbrana poglavja iz pediatrije), Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo 1993: 166-175.
6. Chowdhury JR., Wolkoff AW., Chowdhury NR., Arias IM. Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: Scriver CR., Beaudet AL., Sly WS., Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II, 7<sup>th</sup> edition 1995; 2161-2192.
7. American heart association.  
<http://circ.ahajournals.org/content/114/20/2178.full>. Dostop 20-05-2012.
8. McDonagh AF. Turning green to gold. Nature Structural Biology 2001;8: 198-200.
9. Wikimedia commons.  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bilirubin\\_H\\_bonded.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bilirubin_H_bonded.svg). Dostop: 19-05-2012.
10. Nuttall KL., Klee GG. Analytes of hemoglobin metabolism - porphyrins, iron and bilirubin. In: Burtis CA., Ashwood ER. Tietz fundamentals of clinical chemistry 5<sup>th</sup> edition 2001: 601-605.
11. Kaplan M., Hammerman C., Maisels MJ. Bilirubin genetics for the nongeneticst. In: Hereditary defects of neonatal bilirubin conjugation, Pediatrics 2003: 111: 886-893.
12. Glew RH., Ninomiya Y. Studies in medical biochemistry, 2nd. eds. 1997: 10: 115.

13. Shapino S. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatric Neurology* 2003; 29: 410-421.
14. Pic 2 Fly.  
<http://www.pic2fly.com/Elevated+Direct+and+Indirect+Bilirubin.html>. Dostop: 20-05-2012.
15. Kaplan M., Hammerman C. Bilirubin and the genome. In: The hereditary basis of unconjugated neonatal hyperbilirubinemia. *Current Pharmacogenomics* 2005; 3: 21-42.
16. Bratanic B., Lukač Bajalo J. Erythrocyte bound and total bilirubin in preterm and term jaundiced newborns. *J Perinat Med* 1992; 20: 285.
17. Watchko JF. Neonatal hyperbilirubinemia - What are the risk?, *N Engl J Med*. 2006; 354: 1947-1949.
18. Ingram LR. Liver fundaction. In: Anderson SC., Cockayne S. *Clinical chemistry concepts and applications*. 1993: 294-302.
19. Mayne PD. Clinical chemistry in diagnosis and treatment, 6<sup>th</sup> edition 1994: 281 – 292.
20. Thomas L. Bilirubin In: Thomas L., eds. *Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*, 1st ed. Frankfurt/ Main, 1998: 192 -201.
21. Radu P., Atsmon J. Gilbert's syndrome - Clinical and pharmacological implications, *IMAJ* 2001; 3: 593-598.
22. Hirschfield GM., Alexander GJ. Gilbert's syndrome: an overview for clinical biochemists. *Ann Clin Biochem* 2006; 43 (Pt5) : 340-343.
23. Ostank B., Furlan D., Mavec T. UGT1A1 (TA)<sub>n</sub> promoter polymorphism- a new case of a (TA)8 allele in Caucasians Blood Cells. *Mol. Dis.* 2007; 38: 78-82.
24. Strassburg CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 703-715.
25. Sampetro M., Iolascon A. Molecular pathology of Cigler- Najjar type I and II and Gilbert's Syndromes. *Haematologica* 1999; 84: 150-157.

26. Persico M., Persico E., Bakker CT. Hepatic uptake of organic anions affects the plasma bilirubin level in subject with Gilbert's syndrome mutations in UGT1A1. *Hepatology* 2001; 33: 627-632.
27. Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism, *J. Hepatol* 2003; 38: 107-117.
28. Ostanek B. Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma. Farmacevtski vestnik 2008; 59 : 3-7.
29. König J., Seithel A., Gradhand U. Fromm Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Narnyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 372: 432-443.
30. König J., Cui Y., Nies AT, et al. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: 156-164.
31. Jindal. C., el. al Organic anion transporter protein (OATP1B1) encoded by SLCO1B1 gene polymorphism (388A>G) & susceptibility in gallstone disease Indian J Med Res. 2009; 129: 170-5.
32. Michalski C., et. al. A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 43058-43063.
33. Kameyana, Y., et. al. Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants SLCO1B1\*5, SLCO1B\*15 and SLCO1B1\*5 + C1007G, bay using transient expression systems of Hela and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 513-22.
34. Pasanen M.: Pharmacogenetic of *SLCO1B1* population genetics and effect on Statins. Academic dissertation 2008.
35. Tsujimoto M., Hidrata S., Yukihiko D., Ohtani H., Sawada Y. Polymorphisms and Linkage Disequilibrium of the OATP8 (OATP1B3) gene in Japanse Subject, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2006; 21: 165-169.
36. Sanna S., Busanero F., Maschio A., et. al. Common variants in the SLCO1B3 locus are associated with bilirubin levels and unconjugated hyperbilirubinemia In: *Human Molecular Genetics* 2009; 2711-2718.
37. Briz O., Serrano MA., Macias R., et. al. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-

- maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. In: Biochem. J. 2003; 371: 897-905.
38. Kang T., Kim HJ., Ju H., et. al. Genome-wide association of serum bilirubin levels in Korean population. In: Human Molecular Genetics 2010; 1-7.
39. Boivin AA., Cardinal H., Barama Azemi, Pichette at. al. Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1) and OATP1B3: Genetic Variability and Haplotype Analysis in White Canadians. In: Drug Metab. Pharmacokinet. 2010; 25: 508-515.
40. NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's Manual.
41. Spletna stran študentov FFa.  
[http://farma-drustvo.si/old/gradivo\\_1/.../predavanja.doc](http://farma-drustvo.si/old/gradivo_1/.../predavanja.doc). Dostop: 20-05-2012.
42. University of ghent. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. Dostop: 20-05-2012.
43. Štrukelj B., J.K. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007; 55-58.
44. Arko, B. Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farmacevtski vestnik 2004; 55: 215-220.
45. The KASP SNP Genotyping Manual v 3.0.  
[http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP\\_manual.pdf](http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP_manual.pdf)
46. Picard N., Yee SW., Woillard J.B., at. al. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics, Clin Pharmacol Ther. 2010; 87(1): 100-108.
47. DNA vision. <http://www.dnavision.com/taqman-genotyping-assays.php>.  
Dostop: 20-05-2012.