

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA ŠLIBAR

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA ŠLIBAR

**VPLIV POLIMORFIZMOV A388G IN T521C V GENU ZA OATP1B1 NA  
NEKONJUGIRANO HIPERBILIRUBINEMIJO PRI NOVOROJENČKIH**

**INFLUENCE OF OATP1B1 GENETIC POLYMORPHISMS A388G AND T521C  
ON UNCONJUGATED HYPERBILIRUBINEMIA IN NEONATES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. Merjenje kliničnih in biokemičnih parametrov so opravili v Splošni bolnišnici Novo mesto in Splošni bolnišnici Celje.

### **Zahvale**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek, mag. farm. za vse koristne nasvete, pomoč in vzpodbudo pri nastajanju diplomske naloge. Zahvala gre tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se tudi moji družini, ki so mi stali ob strani, me spodbujali in podpirali skozi celoten čas študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.

Ljubljana, marec 2013

Špela Šlibar

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član diplomske komisije: asist. dr. Jurij Trontelj

## VSEBINA

VSEBINA.....	i
POVZETEK .....	iii
ABSTRACT .....	iv
SEZNAM OKRAJŠAV .....	v
KAZALO SLIK.....	vi
KAZALO PREGLEDNIC .....	vii
1 UVOD .....	1
1.1 BILIRUBIN .....	1
1.1.1 Nastanek bilirubina.....	2
1.1.2 Presnova bilirubina .....	3
1.2 MOTNJE V PRESNOVI BILIRUBINA .....	5
1.3 HIPERBILIRUBINEMIJA NOVOROJENČKOV .....	6
1.3.1 Fiziološka hiperbilirubinemija novorojenčkov.....	6
1.3.2 Patološka hiperbilirubinemija novorojenčkov .....	7
1.3.3 Genetski vzroki za razvoj nekonjugirane hiperbilirubinemije novorojenčkov ....	8
1.3.3.1 Genetski vzroki, povezani s povečanim nastankom BIL.....	9
1.3.3.2 Genetski vzroki, povezani z zmanjšano konjugacijo BIL .....	10
1.3.4 Diagnostika in zdravljenje hiperbilirubinemije .....	11
1.4 ORGANSKI ANIONSKI PRENAŠALNI POLIPEPTID 1B1 (OATP1B1).....	12
1.4.1 Gen za OATP1B1 .....	13
1.4.2 Vpliv polimorfizmov A388G in T521C na farmakokinetiko zdravil.....	14
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE .....	16
3.1 VZORCI.....	16
3.2 IZOLACIJA DNA .....	16
3.2.1 Izolacija DNA s kompletom reagentov FlexiGene DNA Kit iz polne krvi in krvnih strdkov .....	16
3.2.1.1 Princip izolacije .....	16
3.2.1.2 Postopek izolacije DNA s kompletom reagentov FlexiGene DNA Kit iz polne krvi.....	17
3.2.1.3 Postopek izolacije DNA s kompletom reagentov FlexiGene DNA Kit iz krvnih strdkov.....	18

3.2.1.4	Materiali in aparature .....	19
3.2.2	Izolacija DNA s kompletom reagentov QiaAmp DNA Mini Kit iz 200 µL polne krvi.....	19
3.3	OCENA KOLIČINE IN KVALITETE IZOLIRANE DNA .....	19
3.3.1	Materiali in aparature.....	20
3.4	GENOTIPIZACIJA S SISTEMOM KASP .....	20
3.4.1	Genotipizacija polimorfizmov A388G in T521C.....	22
3.4.1.1	Materiali in aparature.....	24
3.5	DOLOČANJE BIOKEMIČNIH PARAMETROV .....	25
3.6	STATISTIČNE METODE .....	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	26
4.1	IZOLACIJA DNA .....	26
4.2	MODIFIKACIJA METODE GENOTIPIZACIJE.....	27
4.3	REZULTATI GENOTIPIZACIJE.....	29
4.4	UGOTAVLJANJE POGOSTNOSTI POLIMORFIZMOV A388G IN T521C V GENU ZA OATP1B1 .....	30
4.5	DOLOČANJE HAPLOTIPOV OATP1B1*1a, OATP1B1*1b, OATP1B1*5 IN OATP1B1*15 .....	31
4.6	KLINIČNI POMEN POLIMORFIZMOV A388G IN T521C TER NJUNIH HAPLOTIPOV V GENU ZA OATP1B1 .....	31
4.6.1	Karakteristike preiskovanih skupin .....	31
4.6.2	Primerjava med skupinama .....	32
4.6.3	Povezava med koncentracijo BIL in spolom.....	34
4.6.4	Povezava med koncentracijo BIL in genotipi ter haplotipi .....	35
4.6.5	Povezava med razvojem patološke hiperbilirubinemije in genotipi ter haplotipi .....	37
4.7	PRIMERJAVA REZULTATOV Z OBJAVLJENIMI ŠTUDIAMI.....	40
5	SKLEP.....	44
6	LITERATURA.....	45

## POVZETEK

Pri večini novorojenčkov je zmerna nekonjugirana hiperbilirubinemija fiziološki pojav, ki mine v prvem tednu življenja. Vendar pri nekaterih novorojenčkih serumske koncentracije bilirubina presežejo fiziološke meje (220  $\mu\text{mol/L}$ ), kar je lahko razlog za skrb, saj je nekonjugiran bilirubin nevrotoksičen. V raziskavi, v katero je bilo vključenih 485 novorojenčkov, smo preučevali povezavo med fiziološko in nepojasnjeno patološko nekonjugirano hiperbilirubinemijo novorojenčkov in polimorfizmoma A388G in T521C v genu *SLCO1B1* ter njunimi haplotipi. Polimorfizma lahko zmanjšata transportno funkcijo OATP1B1, ki je pomemben prenašalni protein v jetrih. Zmanjšan privzem bilirubina v hepatocite ima lahko za posledico zvišano koncentracijo bilirubina v serumu in s tem pojav nekonjugirane hiperbilirubinemije. Omenjena polimorfizma nista edina, ki lahko vplivata na pojav nekonjugirane hiperbilirubinemije. Do sedaj so se v povezavi z nekonjugirano hiperbilirubinemijo izkazali kot najpomembnejši polimorfizmi v genu *UGT1A1* tako pri odraslih kot novorojenčkih.

V diplomski nalogi smo vzorcem s pomočjo alelna specifične verižne reakcije s polimerazo določili genotipe za oba polimorfizma in s statistično analizo ugotavljali njihov vpliv ter vpliv njunih haplotipov na koncentracijo bilirubina v serumu ter koncentracijo transkutanega bilirubina.

V okviru statistične analize smo za preiskovance ugotovili naslednje frekvence mutiranega alela: 41,7 % za polimorfizem A388G in 20,0 % za polimorfizem T521C. Nato smo primerjali povprečne vrednosti koncentracij bilirubina glede na prisotnost določenega genotipa polimorfizmov A388G in T521C ter glede na prisotnost števila kopij haplotipov \*1a, \*1b in \*15. Izračuni niso pokazali vpliva polimorfizmov in haplotipov na koncentracijo bilirubina. Poleg tega smo ugotavljali statistično značilne razlike v porazdelitvi genotipov oziroma števila kopij haplotipov med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo. Primerjava porazdelitve za noben polimorfizem oziroma haplotip ni pokazala statistično značilnih razlik.

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da polimorfizma A388G in T521C ter njuni haplotipi v genu za OATP1B1 ne vplivajo pomembno na pojav nekonjugirane hiperbilirubinemije pri novorojenčkih.

## ABSTRACT

The moderate unconjugated hyperbilirubinemia in newborns is a physiological phenomenon that usually resolves within the first week of life. But in some newborns, however bilirubin serum concentrations exceed the physiological level (220  $\mu\text{mol/L}$ ), which is of concern because unconjugated bilirubin is neurotoxic. The aim of our study was to find possible association between unconjugated hyperbilirubinemia in newborns and the *SLCO1B1* gene polymorphisms A388G and T521C or their haplotypes. Namely, these polymorphisms may reduce the transport function of OATP1B1, which is an important transport protein in the liver. Reduced uptake of bilirubin into hepatocytes may result in an increased serum bilirubin concentration and unconjugated hyperbilirubinemia may occur. The above mentioned polymorphisms are not the only ones that may affect the occurrence of unconjugated hyperbilirubinemia. Until now, in conjunction with unconjugated hyperbilirubinemia proved to be the most important polymorphisms in the *UGT1A1* gene, both in adults as neonates.

In this thesis, the allele-specific polymerase chain reaction was used to determine genotypes for both polymorphisms. The influence of genotypes and haplotypes on bilirubin serum concentrations and concentrations of transcutaneous bilirubin was assessed by a statistical analysis.

In the context of statistical analysis the following mutated allele frequencies: 41,7% for A388G polymorphism and 20,0% for T521C polymorphism were determined. Then the average values of bilirubin concentrations, depending on the presence of a particular genotype of polymorphisms A388G and T521C or the presence of a number of copies of the haplotypes \*1a, \*1b and 1\*5 were compared. The results did not show a significant impact of either polymorphisms or haplotypes on the concentration of bilirubin. In addition, no statistically significant differences in the distribution of genotypes or the number of copies of the haplotypes between groups of newborns with physiological and pathological hyperbilirubinemia were identified.

In conclusion, our results do not support an important role of polymorphisms A388G and T521C in OATP1B1 encoding gene or their haplotypes on the occurrence of unconjugated hyperbilirubinemia in newborns.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

Bc	konjugirani bilirubin
BDG	bilirubin-diglukuronid
BIL	bilirubin
BMG	bilirubin-monoglukuronid
Bu	nekonjugirani bilirubin
CN	Crigler-Najjarov sindrom
DNA	deoksiribonukleinska kislina
G-6-PD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
GS	Gilbertov sindrom
HO	hem-oksigenaza
OATP	organski anionski prenašalni polipeptid
OATP1B1	organski anionski prenašalni polipeptid 1B1
OATP1B3	organski anionski prenašalni polipeptid 1B3
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RES	retikuloendotelijski sistem
<i>SLCO1B1</i>	gen za organski anionski prenašalni polipeptid 1B1
<i>SLCO1B3</i>	gen za organski anionski prenašalni polipeptid 1B3
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (ang. <i>Single-nucleotide polymorphism</i> )
UGT	uridindifosfat-glukuroniltransferaze
UGT1A1	uridindifosfat-glukuroniltransferaza 1A1



**KAZALO SLIK**

Slika 1: Struktura bilirubina. ....	1
Slika 2: Tridimenzionalna struktura bilirubina.....	2
Slika 3: Sinteza bilirubina.....	3
Slika 4: Presnova bilirubina.....	4
Slika 5: Struktura OATP1B1 z označenimi položaji polimorfizmov.....	13
Slika 6: Postopek izolacije DNA s kompletom reagentov FlexiGene iz polne krvi.....	17
Slika 7: Shematski prikaz alelnno-specifičnega smernega in protismernega oligonukleotidnega začetnika pri genotipizaciji s sistemom KASP.....	21
Slika 8: Oligonukleotid, označen z barvilom, in njemu komplementaren oligonukleotid z vezanim dušilcem pri genotipizaciji s sistemom KASP.....	21
Slika 9: Prikaz rezultatov elektroforeze na 2 % agaroznem gelu.....	26
Slika 10: Odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (Protokol 2).....	28
Slika 11: Odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov pri polimorfizmu A388G (Protokol 3).....	28
Slika 12: Prikaz rezultatov genotipizacije v obliki grafa.....	29

## KAZALO PREGLEDNIC

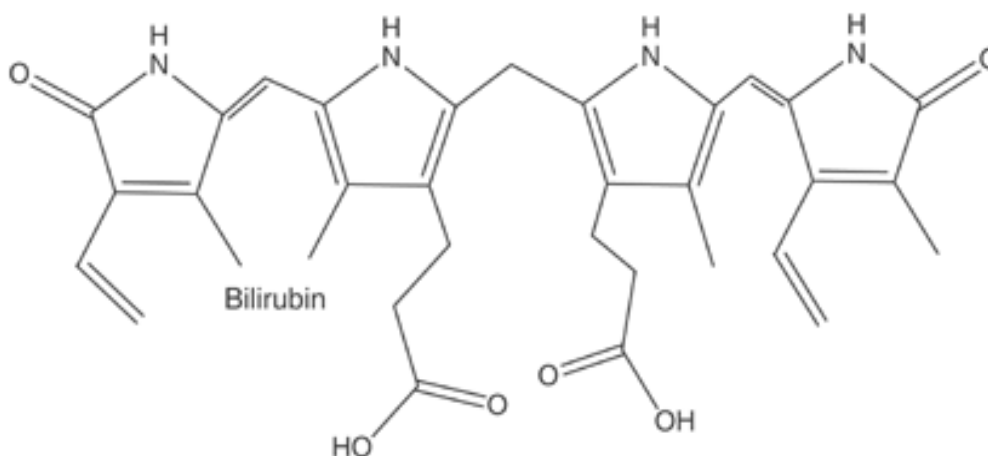
Preglednica I: Vzroki nekonjugirane in konjugirane hiperbilirubinemije.....	5
Preglednica II: Dejavniki tveganja za razvoj nekonjugirane hiperbilirubinemije.....	8
Preglednica III: Valovne dolžine ekscitacije in emisije za barvili FAM in VIC.....	22
Preglednica IV: Načrt za pripravo reakcijske zmesi za genotipizacijo s sistemom KASP.....	23
Preglednica V: Temperaturni in časovni program reakcije PCR v realnem času za oba polimorfizma (Protokol 3).....	24
Preglednica VI: Shema redčenja osnovnih nerazredčenih raztopin.....	27
Preglednica VII: Temperaturni in časovni program reakcije PCR, ki ga je predlagal proizvajalec (Protokol 1).....	27
Preglednica VIII: Modificirani temperaturni in časovni program reakcije PCR (Protokol 2).....	28
Preglednica IX: Frekvence genotipov za polimorfizem A388G.....	30
Preglednica X: Frekvence genotipov za polimorfizem T521C.....	30
Preglednica XI: Haplotipi polimorfizmov A388G in T521C in njihove frekvence (%).....	31
Preglednica XII: Povprečne vrednosti in SD izmerjenih kliničnih parametrov pri prvi preiskovani skupini.....	32
Preglednica XIII: Povprečne vrednosti in SD izmerjenih kliničnih parametrov pri drugi preiskovani skupini.....	32
Preglednica XIV: Rezultati statistične analize primerjave med skupinama.....	33
Preglednica XV: Povprečne vrednosti in SD izmerjenih kliničnih parametrov.....	34
Preglednica XVI: Primerjava vrednosti izmerjenih parametrov glede na spol.....	34
Preglednica XVII: Srednje vrednosti $\pm$ SD in p vrednosti statistične analize za polimorfizem A388G.....	35
Preglednica XVIII: Srednje vrednosti $\pm$ SD in p vrednosti statistične analize za polimorfizem T521C.....	36
Preglednica XIX: Srednje vrednosti $\pm$ SD in p vrednosti statistične analize za haplotip *1a.....	36
Preglednica XX: Srednje vrednosti $\pm$ SD in p vrednosti statistične analize za haplotip *1b.....	36
Preglednica XXI: Srednje vrednosti $\pm$ SD in p vrednosti statistične analize za haplotip *15.....	37
Preglednica XXII: Koncentracije BIL $\pm$ SD in p-vrednosti za skupine s kliničnimi značilnostmi prisotne hiperbilirubinemije.....	38
Preglednica XXIII: Porazdeljenost genotipov za polimorfizem A388G med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.....	39
Preglednica XXIV: Porazdeljenost genotipov za polimorfizem T521C med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.....	39
Preglednica XXV: Porazdeljenost števila kopij za haplotip *1a med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.....	39
Preglednica XXVI: Porazdeljenost števila kopij za haplotip *1b med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.....	40
Preglednica XXVII: Porazdeljenost števila kopij za haplotip *15 med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.....	40

# 1 UVOD

## 1.1 BILIRUBIN

Bilirubin (BIL) je žolčno barvilo, ki nastaja pri razgradnji beljakovin, ki vsebujejo hem (1). Je pomemben endogeni antioksidant, po drugi strani pa je tudi nevrotoksičen in vzrok kernikterusa, če je presežena vezavna zmogljivost albumina (2). Več kot 80 % BIL nastane v retikuloendotelijskemu sistemu (RES) iz hema pri katabolizmu hemoglobina, ki se sprosti iz razpadlih eritrocitov. Preostali BIL nastaja v jetrih iz hemoproteinov (citokromi, katalaza, peroksidaza, mioglobin) ter v majhnih količinah tudi ob propadanju novo nastalih eritrocitov v kostnem mozgu (neučinkovita eritropoeza) (1, 3, 4). Dnevno nastane od 250 do 300 mg BIL (5).

BIL sestavljajo štirje pirolovi obroči, ki so na dveh zunanjih mestih povezani z vezema -CH=, v centralnem delu pa z vezjo -CH<sub>2</sub>- (**Slika 1**). Pri obeh dvojnih vezeh sta možni dve konfiguraciji: cis (Z) in trans (E). Nativna oblika BIL je 4Z,15Z - BIL, možne pa so še tri izomere: 4Z,15E - BIL, 4E,15Z - BIL, 4E,15E - BIL. E-izomere niso stabilne. Če se ne stabilizirajo z vezavo na albumin, se hitro pretvorijo nazaj v bolj stabilno nativno obliko. Vezave na albumin pa so stabilne več ur (6).



**Slika 1:** Struktura bilirubina (7).

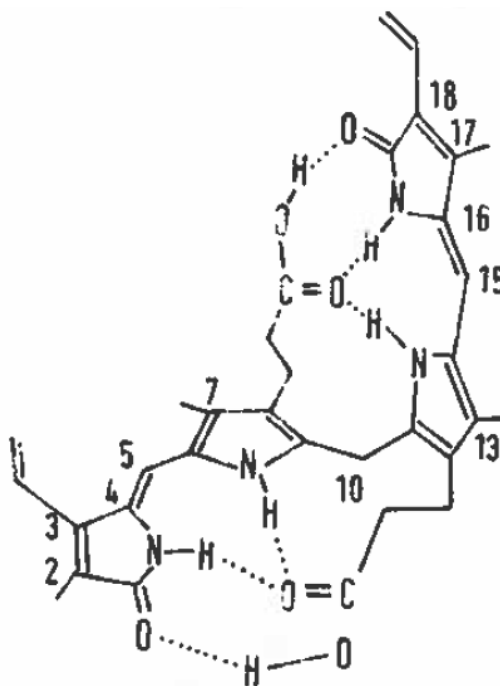
V plazmi se BIL pojavlja v številnih oblikah:

- **nekonjugirani BIL (Bu)** - na albumin nekovalentno vezan BIL,
- **prosti BIL** - nevezani nekonjugirani BIL,
- **konjugirani BIL (Bc)** - BIL-monoglukuronid (BMG) in BIL-diglukuronid (BDG),

- **$\delta$ -BIL** (na albumin kovalentno vezani Bc, ki se pojavlja pri motnjah v izločanju konjugiranega BIL iz jeter),
- **fotoizomeri BIL** (1).

Bu je pri fiziološkem pH-ju skoraj netopen. Netopnost je posledica notranje medsebojne povezanosti polarnih skupin molekule z vodikovimi vezmi. Iz tridimenzionalne strukture BIL (**Slika 2**) je razvidno, da se tvorijo vodikove vezi med skupino  $-\text{COOH}$  ene polovice molekule in skupino  $-\text{NH}$  ter skupinama  $>\text{C}=\text{O}$  druge polovice molekule. BIL se zato po krvi prenaša vezan na albumin (99,9 %). Na molekulah albumina se lahko veže na dve različni mesti – na eno z veliko in drugo z manjšo afiniteto za vezavo. Le 0,1 % Bu je v nevezani obliki, t.i prosti BIL, ki je toksičen za možgane. V jetrih z vezavo glukuronske kisline iz Bu nastane Bc, ki je v vodi topen in ni toksičen (1, 6).

BIL molekula je občutljiva na svetlobo. Pri valovnih dolžinah 450–470 nm (vidna svetloba) iz nje s fotoizomerizacijo nastajajo fotoprodukti. Ti so vodotopni, netoksični in se brez konjugacije skozi jetra izločajo v žolč (1).

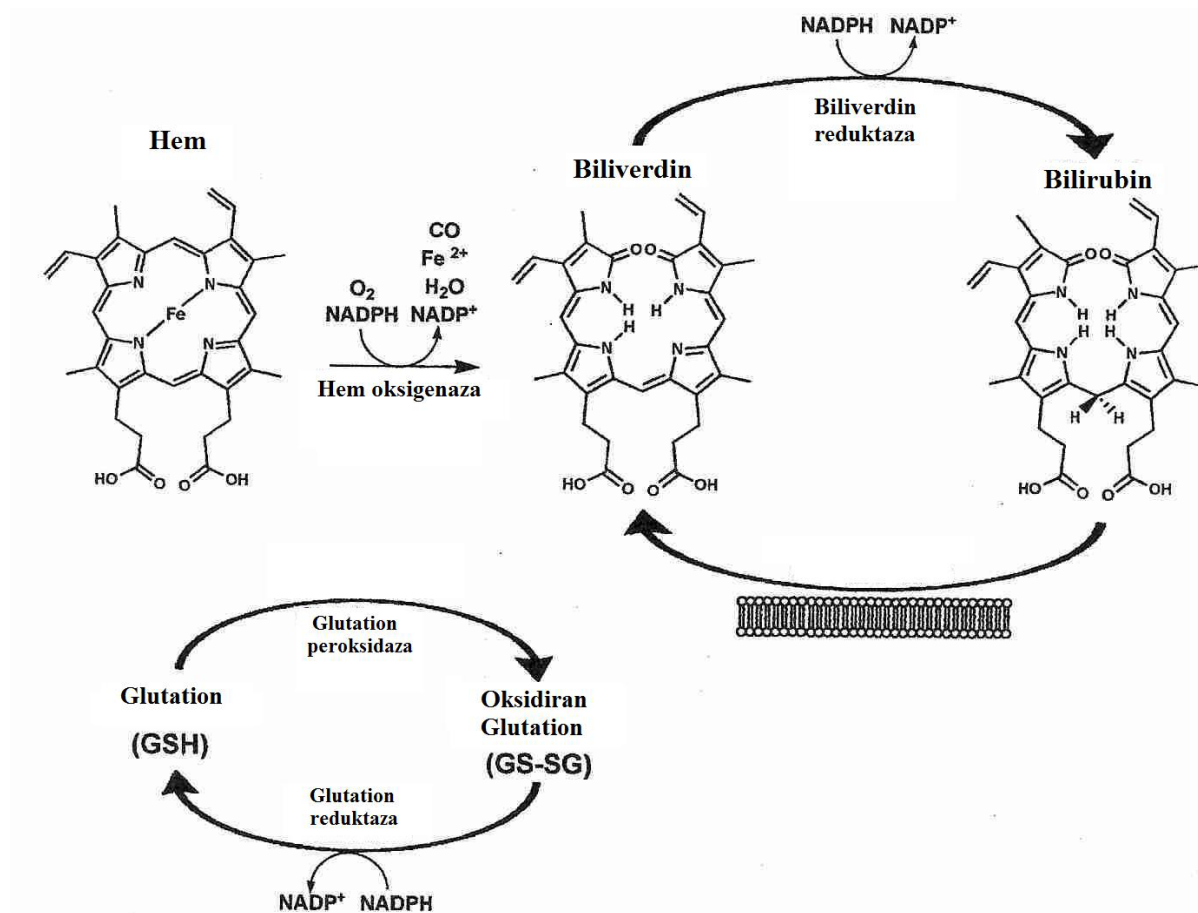


**Slika 2:** Tridimenzionalna struktura bilirubina (6).

### 1.1.1 Nastanek bilirubina

BIL nastaja iz hema v dveh korakih, ki ju katalizirata hem oksigenaza (HO) in biliverdin IX $\alpha$  reduktaza (2). Oba encima sta v velikih količinah prisotna v retikuloendotelijskih

celicah vranice, Kupfferjevih celicah jeter, makrofagih in črevesnem epiteliju. Encim HO katalizira oksidacijo alfa-metilenskega mostu hema in s tem odprtje porfirinskega obroča, kar vodi do sprostitve železa, nastanka ogljikovega monoksida in biliverdina IX $\alpha$  (4). V reakciji sproščeno železo se ponovno uporabi pri sintezi hemoglobina in citokromov, ogljikov monoksid pa se izloči skozi pljuča (6). Ob prisotnosti biliverdin-reduktaze se biliverdin reducira do BIL, ki se po sprostitvi iz RES veže na albumin ter transportira do jeter (8, 9). BIL je lahko v večjih količinah prisoten v prosti obliki, če je vezalna kapaciteta albumina presežena ali ga z vezavnih mest izrinejo zdravila (sulfisoksazol, streptomycin, kloramfenikol, ibuprofen) (10). Prosti BIL lahko prehaja krvno-možgansko pregrado in se nalaga v bazalnih ganglijih v možganih (3).



Slika 3: Sinteza bilirubina (13).

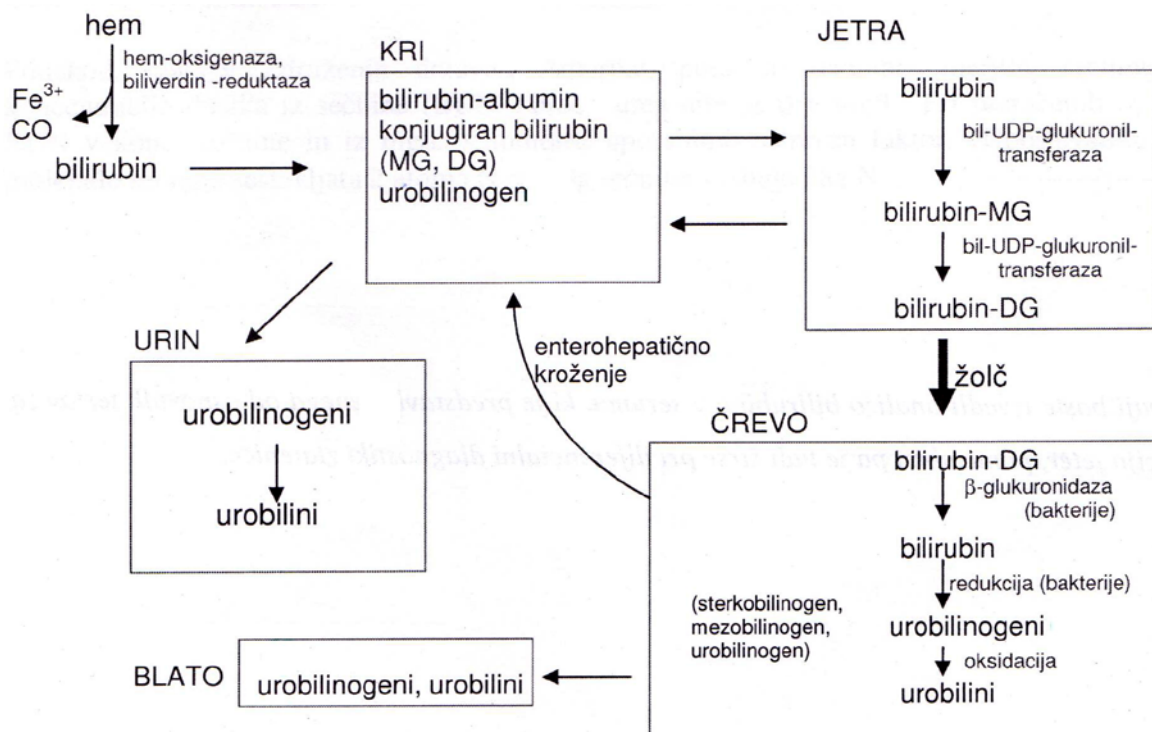
### 1.1.2 Presnova bilirubina

V jetrih se BIL odcepi z albumina in s pomočjo enega ali več membranskih prenašalcev (bilitranslokaza) ali s procesom pasivne difuzije prenese v notranjost hepatocitov. V citosolu se veže na prenašalno beljakovino ligandin, ki ga prenese do endoplazemskega

retikuluma (1). Poleg transporta skozi celične membrane je ta vezava pomembna še zato, ker preprečuje refluks BIL v kri in njegovo toksično delovanje v jetrni celici (5).

Sledi konjugacija z encimom UGT1A1 (uridindifosfat glukuroniltransferaza), pri kateri se BIL zaestri z glukuronsko kislino do BMG in BDG. Pri novorojenčkih se Bc izloča večinoma v obliki monoglukuronida (1). Količina encima UGT1A1 v jetrih se močno poveča v prvih nekaj tednih po rojstvu. V 30 do 40 tednu nosečnosti je količina UGT1A1 približno 1% vrednosti pri odraslih, pri 14 tednih starosti pa doseže vrednost odraslih (4, 10).

Po končani konjugaciji se BIL preko kanalikularne (apikalne) membrane hepatocitov izloča v žolčni kanal s prenašalcem MRP2 (ang. *Multidrug resistance - associated protein 2*) (4). V črevesju se konjugati BIL hidrolizirajo z intestinalno  $\beta$ -glukuronidazo (pri novorojenčkih) oziroma z bakterijskimi encimi (pri odraslih). Nastane Bu, ki se pod vplivom bakterij reducira do urobilinogenov (4, 11, 12). Ti se v manjšem delu (20 %) ponovno absorbirajo v kri, ostali pa se izločijo z blatom. Privzeti urobilinogeni se ponovno izločijo z žolčem (enterohepatični obtok), nekaj pa se jih izloči s sečem. V črevesju se urobilinogeni oksidirajo v urobiline, ki dajejo barvo blatu (1).



**Slika 4:** Presnova bilirubina (14).

## 1.2 MOTNJE V PRESNOVI BILIRUBINA

Poznamo pridobljene in prirojene motnje za večino korakov v presnovi in izločanju BIL. Te motnje vodijo do stanja povišane koncentracije BIL v serumu, ki ga imenujemo **hiperbilirubinemija**, in sicer o njej govorimo, ko vrednosti BIL v serumu odraslih presežejo 17  $\mu\text{mol/L}$ , pri novorojenčkih pa, ko presežejo prag 220  $\mu\text{mol/L}$  (8, 14, 15). Glede na prevladajočo obliko BIL jo delimo na konjugirano in nekonjugirano hiperbilirubinemijo. Kadar vrednosti celotnega BIL presežejo 43  $\mu\text{mol/L}$  pri odraslih oziroma 120  $\mu\text{mol/L}$  pri novorojenčkih, govorimo o zlatenici (ikterus), ki se kaže kot rumeno obarvanje kože, vidnih sluznic in beločnic. Glede na vzrok ločimo tri tipe zlatenice: prehepatično, hepatično in posthepatično. Pri zelo visokih koncentracijah nekonjugiranega BIL se lahko ta začne kopičiti v živčnih celicah, kar povzroči okvare možganov (kernikterus) (14).

Hiperbilirubinemija lahko nastane:

- zaradi čezmerne tvorbe BIL zaradi povečanega razpada eritrocitov,
- zaradi okvarjenega vstopa BIL v jetrno celico iz krvi,
- zaradi znižane konjugacije ob prirojenem ali pridobljenem pomanjkanju ali odsotnosti konjugacijskega encima,
- zaradi okvarjenega izločanja BIL (intra- ali ekstra- hepatalna holestaza) (5).

Prvi trije mehanizmi povzročajo nastanek nekonjugirane (indirektne) hiperbilirubinemije, medtem ko zadnji, ne glede na to, ali gre za intra- ali ekstrahepatalno oviro, povzroči v glavnem konjugirano (direktno) hiperbilirubinemijo (**Preglednica I**) (5).

**Preglednica I:** Vzroki nekonjugirane in konjugirane hiperbilirubinemije (4, 14).

Nekonjugirana hiperbilirubinemija	Konjugirana hiperbilirubinemija
<p><b>1. <u>Povečana produkcija BIL</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ hemolize (npr. pomanjkanje glukoza-6-fostat dehidrogenaze)</li> <li>✓ neučinkovita eritropoeza (npr. talasemija, megaloblastna anemija)</li> <li>✓ hematomi</li> </ul>	<p><b>1. <u>Zmanjšano izločanje v žolč</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dubin-Johnsonov sindrom</li> <li>✓ Rotorjev sindrom</li> <li>✓ ciroza</li> <li>✓ zdravila in toksini (npr. sulfonilureje)</li> <li>✓ proces infiltracije (npr. sarkoidoza, amiloidoza)</li> <li>✓ popolna parenteralna prehrana</li> <li>✓ zavrnitev presaneje ledvice</li> <li>✓ hepatocelularne poškodbe (npr. hepatitis A)</li> </ul>
<p><b>2. <u>Moten privzem v jetrne celice</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ zdravila</li> </ul>	

✓ Gilbertov sindrom	✓ paraneoplastični sindrom (npr. limfom)
<b>3. <u>Zmanjšana konjugacija v jetrih</u></b> ✓ Crigler-Najjarov sindrom (tip I in II) ✓ Gilbertov sindrom ✓ zdravila (npr. klorpromazin, rifampin, inhibitorji HIV proteaze)	<b>2. <u>Obstrukcija pretoka žolča</u></b> ✓ tumorji (npr. karcinom trebušne slinavke, hepatocelularni karcinom) ✓ infekcije s paraziti (npr. z <i>Ascaris lumbricoides</i> )
<b>4. <u>Kombinacija več dejavnikov</u></b> ✓ neonatalna zlatenica ✓ zlatenica zaradi sepse ✓ Wilsonova bolezen ✓ Zieve sindrom	

### 1.3 HIPERBILIRUBINEMIJA NOVOROJENČKOV

Zlatenica je najpogostejše stanje, ki zahteva zdravniško pomoč pri novorojenčkih. Pojavi se v prvem tednu življenja pri 60 % donošenih in 80 % nedonošenih novorojenčkov. Pri novorojenčkih se zlatenica klinično pokaže, ko je presežena serumska koncentracija BIL 120  $\mu\text{mol/L}$ . Rumena obarvanost kože in beločnic je posledica kopičenja Bu (14, 16, 17, 18).

#### 1.3.1 Fiziološka hiperbilirubinemija novorojenčkov

Fiziološka hiperbilirubinemija novorojenčkov ni prisotna takoj ob rojstvu, temveč se razvije v prvih dneh življenja in v večini primerov ne traja več kot dva tedna. Zelo pogosto se pojavi pri donošenih novorojenčkih, še pogosteje pa pri nedonošenčkih. Vrednosti BIL v krvi pri fiziološki zlatenici ne presežejo 220  $\mu\text{mol/L}$ , 90 % BIL je nekonjugiranega (19).

Fiziološko zlatenico lahko razdelimo na dve obdobji. Prvo obdobje zajema prvih 5 dni življenja donošenih novorojenčkov, ko v prvih 3 dneh pride do hitrega porasta Bu v serumu. Takoj po porodu je koncentracija celotnega BIL v plazmi približno 25  $\mu\text{mol/L}$ . Najvišjo koncentracijo v plazmi BIL doseže tretji dan po porodu, med 102 in 120  $\mu\text{mol/L}$  pri kavkaških (belih) in afriško ameriških novorojenčkih. Pri azijskih novorojenčkih so koncentracije celotnega BIL višje, dosežejo približno 171  $\mu\text{mol/L}$ . Pri nedonošenčkih je najvišja koncentracija med 171 in 205  $\mu\text{mol/L}$  in nastopi nekoliko kasneje, med 5. in 7. dnem življenja.

Pri donošenih novorojenčkih po 3. dnevu koncentracija BIL naglo upada do 5. dne, ko se prične drugo obdobje. Do konca prvih 14 dni je koncentracija Bu sorazmerno stabilna na



vrednosti okoli 36  $\mu\text{mol/L}$ . Pri nedonošenčkih lahko traja drugo obdobje do konca prvega meseca starosti. Po tem obdobju se BIL zniža na raven koncentracije odraslih, ki je pod 17  $\mu\text{mol/L}$  (10, 20).

Vzroki za nastanek fiziološke zlatenice so lahko:

- povečano nastajanje BIL  
Vzrok je povečan obseg hemolize ob rojstvu (večja prostornina eritrocitov v obtoku in njihova krajša življenjska doba (70 do 90 dni, odrasli – 120 dni) ali modrice, ki nastanejo ob porodu) (4, 10).
- zmanjšano izločanje ali konjugacija BIL  
Glavni vzrok za zmanjšano konjugacijo BIL je fiziološka nezrelost jetrnega encima glukuronil transferaze. Vzrok je lahko tudi manjša koncentracija ligandina v jetrnih celicah v prvih petih dneh po porodu (1, 4).
- večje enterohepatično kroženje BIL  
V črevesju je zvišana koncentracija Bu zaradi postnatalnega pomanjkanja črevesnih bakterij, ki sicer omogočajo pretvorbo BIL v urobilinogene, in visoke aktivnosti črevesnega encima  $\beta$ -glukuronidaze. Posledica je povečana reabsorbcija Bu iz črevesja novorojenčkov, kar še dodatno obremeni jetra (4).
- kombinacija vseh mehanizmov (4).

Ker za fiziološko zlatenico ni očitnega bolezenskega vzroka, je zvišana koncentracija BIL morda posledica potrebe novorojenčka po večji zaščiti pred prostimi radikali, saj je v prvih dneh življenja delovanje antioksidativnega sistema nepopolno in vlogo zaščite prevzame BIL s svojimi antioksidativnimi lastnostmi (19).

### **1.3.2 Patološka hiperbilirubinemija novorojenčkov**

Zlatenica je patološka, če se pojavi v prvih 24 urah po rojstvu, če koncentracija BIL hitro narašča (več kot 86  $\mu\text{mol/L}$  na dan), če je koncentracija celotnega BIL v serumu višja od 221  $\mu\text{mol/L}$  pri donošenih in 257 pri nedonošenih novorojenčkih ali če ima novorojenček znake in simptome, ki kažejo na resno bolezen. Razlog za skrb je tudi podaljšana zlatenica (zlatenica je prisotna še po prvem tednu življenja pri donošenih in po drugem tednu pri nedonošenih novorojenčkih), dokaz osnovne bolezni ali konjugirana zlatenica (zvišanje

koncentracije Bc v plazmi za več kot 20% koncentracije celotnega BIL). Patološki vzroki so lahko motnje, kot so sepsa, rdečke, toksoplazmoza ali okultna krvavitev (20, 21).

Ker jasni vzroki za razvoj nekonjugirane hiperbilirubinemije pri novorojenčkih najpogosteje niso znani, so v zadnjem času naredili mnogo raziskav, da bi ugotovili dejavnike tveganja (**Preglednica II**) (19).

**Preglednica II:** Dejavniki tveganja za razvoj nekonjugirane hiperbilirubinemije (10).

Povečano nastajanje BIL	Zmanjšana kojugacija BIL	Zmanjšano izločanje BIL	Drugo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemoliza</li> <li>– ABO neskladnost</li> <li>– Rh neskladnost</li> <li>– Pomanjkanje encima 6-G-PD</li> <li>– Pomanjkanje encima piruvat- kinaze</li> <li>– Strukturne nepravilnosti               <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Sferocitoza</li> <li>✓ Eliptocitota</li> </ul> </li> <li>• Travma ob rojstvu               <ul style="list-style-type: none"> <li>– kefalohematom</li> <li>– modrice</li> </ul> </li> <li>• Policitemija</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gilbertov sindrom</li> <li>• Crigler-Najjar sindrom (tip I in II)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obstrukcija pretoka žolča               <ul style="list-style-type: none"> <li>– biliarna atrezija</li> <li>– hloedohalna cista</li> <li>– Dubin-Johnsonov sindrom</li> <li>– Rotorjev sindrom</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Azijska rasa *</li> <li>• Prezgodnje rojstvo</li> <li>• Presnovne motnje               <ul style="list-style-type: none"> <li>– hipotiroidizem</li> <li>– galaktozemija</li> </ul> </li> <li>• Materina sladkorna bolezen</li> <li>• Infekcije               <ul style="list-style-type: none"> <li>– okužba sečil</li> <li>– sepsa</li> </ul> </li> <li>• Dojenje</li> <li>• Zdravila               <ul style="list-style-type: none"> <li>– sulfosoksazol</li> <li>– streptomycin</li> <li>– kloramfenikol</li> </ul> </li> </ul>

\* vzrok, zakaj ima večji odstotek Azijcev izraženo hiperbilirubinemijo, ni znan.

### 1.3.3 Genetski vzroki za razvoj nekonjugirane hiperbilirubinemije novorojenčkov

Mnogi raziskovalci poročajo, da k razvoju neonatalne hiperbilirubinemije prispevajo številne mutacije v mnogih različnih genih, ki se razlikujejo od populacije do populacije (19).

### 1.3.3.1 Genetski vzroki, povezani s povečanim nastankom BIL

- **Neskladnost krvnih skupin matere in novorojenčka – Rh in ABO neskladnost**

Rh imunizacija, nekoč zelo pogost vzrok hude hemolize, danes večinoma preprečijo z aplikacijo anti-D globulina vsem Rh negativnim materam med nosečnostjo in po porodu tistim, ki rodijo Rh pozitivnega dojenčka. Prav zato je danes ABO neskladje najpogostejši vzrok hemolize (3).

- **Pomanjkanje encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G-6-PD)**

G-6-PD ima pomembno vlogo pri stabilizaciji membrane eritrocita. Encim katalizira prvi korak v heksoza monofosfatni poti. Pri reakciji pride do redukcije NADP do NADPH. Omenjena pot je v eritrocitih edini vir NADPH. NADPH je bistvenega pomena za eritrocite, potreben je za redukcijo oksidirane glutationa v reducirano obliko, ki je pomemben korak v antioksidativnem mehanizmu proti vodikovemu peroksidu (pretvori ga v vodo). Ta pot prav tako sodeluje pri spodbujanju katalaz, ki so pomembne za antioksidativno obrambo eritrocitov. V odsotnosti G-6-PD, NADPH ne bo na voljo eritrocitom, celica bo izpostavljena oksidativnemu stresu, kar lahko privede do hemolize. V genu za G-6-PD so odkrili mnogo mutacij, ki se razlikujejo med posameznimi etničnimi skupinami (3).

- **Pomanjkanje encima piruvat-kinaze**

Encim piruvat-kinaza katalizira pretvorbo fosfoenolpiruvata v piruvat in tvorbo adenozin trifosfata iz adenozin difosfata v Embden-Meyerhof poti. Pomanjkanje encima piruvat-kinaza vodi v pomanjkanje adenozin trifosfata za presnovo eritrocita, ki ima lahko za posledico anemijo, retikulocitozo in hudo zlatenico. Pomanjkanje tega encima je mnogo manj pogosto kot pomanjkanje encima G-6-PD. Stanje povezujejo s štirimi mutacijami, deduje se avtonomno recesivno (3).

- **Hereditarna sferocitoza**

Napake v proteinih v membrani eritrocita povzročijo, da se eritrociti pri prehodu čez vranico poškodujejo. Pride do hemolize, ki lahko povzroči zlatenico, anemijo in splenomegalijo. Hereditarna sferocitoza je pogosto povezana z neonatalno hiperbilirubinemijo in potreba po fototerapiji je visoka. Povzročajo jo mutacije v vsaj petih genih (3).

- **Zvečana aktivnost hem-oksigenaze (HO)**

Encim hem-oksigenaza ima tri izoencime, HO-1, HO-2 in nedavno odkrit HO-3. HO-1 ima glavno vlogo pri pretvorbi hema v biliverdin. Oksidativni stres lahko inducira izražanje

gena za izoencim HO-1. Poleg tega se na promotor gena lahko vežejo transkripcijski faktorji, ki povečajo izražanje gena za HO-1. Pride do povečanega katabolizma hema in nastanka BIL. Gen za HO-1 ima polimorfno (GT)<sub>n</sub> ponovitev v svojem promotorju. Izražanje gena je pogojeno s številom GT ponovitev. Aktivnost encima je v obratno sorazmerna s številom GT ponovitev (3).

- **Zmanjšan privzem BIL v hepatocite**

Bu prehaja iz jetrnih sinusoidov skozi membrano hepatocitov v celico. Ta proces je olajšan s prenašalno molekulo OATP (organski anionski prenašalni polipeptid), ki se nahaja na membrani hepatocitov (3).

Možna gena, ki bi lahko vplivala na privzem BIL v jetrne celice, sta gen za organski anionski prenašalec 1B1 (*SLCO1B1*) in gen za organski anionski prenašalec 1B3 (*SLCO1B3*). Odkrili so več mutacij v genu *SLCO1B1*, ki bi lahko bile omejitveni dejavnik privzema BIL v hepatocit (glej poglavje 1.4). Nedavna študija je pokazala povezanost nukleotidne zamenjave G>C v intronu *SLCO1B3* s koncentracijo BIL pri prebivalcih Sardinije (3, 22).

- **Pomanjkanje ligandina v hepatocitih novorojenčkov**

V hepatocitih se BIL veže na prenašalni protein glutation-S-transferazo (GST), poznano tudi kot ligandin ali Y-protein. Ti citosolni proteini so pomembni pri zmanjšanem izplavljanju nekonjugiranega in konjugiranega BIL nazaj v plazmo. Novorojenčki imajo običajno manjšo koncentracijo ligandina v jetrnih celicah, kar lahko vpliva na povečano izplavljanje BIL nazaj v krvni obtok (3). Odkrili so povezavo med polimorfizmom gena *GSTM1* in vrednostmi celotnega BIL pri novorojenčkih z zlatenico. Polimorfizem bi lahko vplival na izražanje gena za ligandin in s tem na funkcijo ligandina (23, 24).

### 1.3.3.2 Genetski vzroki, povezani z zmanjšano konjugacijo BIL

Za zmanjšano konjugacijo BIL je odgovoren gen *UGT1A1*, ki pripada družini uridin-difosfat glukuronil transferaz (UGT). (18) Posledici mutacij v genu *UGT1A1* sta **Gilbertov sindrom (GS)** in **Crigler-Najjarov sindrom (CN)** (tip I in tip II) (3).

GS je pogosta avtosomno recesivna dedna motnja v presnovi BIL. Pri različnih populacijah se frekvence mutiranega alela razlikujejo: 32 – 39 % pri belcih, 16 – 33 % pri Azijcih in 40 – 42 % pri Afričanih. GS je opisan kot prisotnost blage nekonjugirane hiperbilirubinemije, ki se pojavi v odsotnosti jetrnih bolezni in hemolize. Pri bolnikih z GS je aktivnost UGT zmanjšana na 30 % normalne vrednosti. Hiperbilirubinemija je običajno blaga, vendar se

lahko v kombinaciji z drugimi dejavniki, kot so dojenje, pomanjkanje encima G-6-PD, talasemija, sferocitoza ali cistična fibroza, pojavi huda hiperbilirubinemija (5, 25, 26).

CN je v nasprotju z GS redka dedna motnja v presnovi BIL. Značilne so zelo visoke vrednosti Bu v serumu, ki lahko vodijo v bilirubinsko encefalopatijo in smrt, če jih ne zdravimo. CN je posledica zmanjšane aktivnosti UGT1A1. Pri tipu I, ki je težja oblika bolezni, je aktivnost encima popolnoma odsotna, medtem ko je tip II bolj blaga oblika bolezni, mutacija gena zniža katalitično delovanje glukoronilne transferaze na do 10 % normalne aktivnosti (3, 5, 27).

### **1.3.4 Diagnostika in zdravljenje hiperbilirubinemije**

#### **Diagnostika**

Določanje koncentracije BIL v serumu je sorazmerno problematično zaradi same narave BIL, saj obstaja v različnih molekularnih oblikah, je občutljiv na svetlobo in netopen v vodi, bilirubinskih standardov in zaradi interference drugih substanc v postopkih določanja (6).

Prisotnost hiperbilirubinemije ugotavljamo s presejalnimi in potrditvenimi testi. Presejalni testi vključujejo klinično (vizualno) oceno zlatenice, uporabo transkutanega ikterometra ter bilirubinometra. Koncentracijo BIL v serumu pa merimo s potrditvenimi testi, kot so reakcija diazotiranja po Jendrassik-Grofu, peroksidazna metoda, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, reakcija na večslojni reagenčni ploščici, kapilarna elektroforeza in encimska metoda (27).

#### **Zdravljenje**

Glavni razlog za zdravljenje hiperbilirubinemije je preprečitev bilirubinske encefalopatije. Zdravljenje prve izbire je fototerapija, ko pa le-ta ne zadostuje, se uporablja izmenjalna transfuzija krvi (4).

- Fototerapija je postopek, pri katerem novorojenčka obsevajo z vidno svetlobo valovne dolžine 460 nm. Pod vplivom svetlobe se BIL pretvori v topne produkte, ki se lahko brez konjugacije v jetrih izločijo z urinom ali žolčem (4, 18, 21).
- Izmenjalna transfuzija krvi je poseg, s katerim pri novorojenčku nadomestijo določen volumen krvi z enakim volumnom ustrezne krvi dajalca (4).

## 1.4 ORGANSKI ANIJSKI PRENAŠALNI POLIPEPTID 1B1 (OATP1B1)

OATP so od natrija neodvisni membranski transportni proteini, ki uravnavajo privzem mnogih endogenih in eksogenih snovi v celice (28, 29). Geni, ki kodirajo OATP prenašalce, tvorijo veliko družino SLCO (solute carrier organic anion transporters) znotraj SLC naddružine (30). Prenášalci znotraj OATP/SLCO naddružine so razdeljeni v družine na osnovi > 40 % ujemanja aminokislinskega zaporedja (npr. OATP1/SLCO1), v poddružine na osnovi > 60 % ujemanja aminokislinskega zaporedja (npr. OATP1B/SLCO1B) ter na individualne gene in njihove produkte – proteine (npr. OATP1B1/SLCO1B1) (31). Danes poznamo 11 človeških OATP prenašalcev (OATP1A2, 1B1, 1B3, 1C1, 2A1, 2B1, 3A1, 4A1, 4C1, 5A1 in 6A1), ki so razdeljeni v 6 družin (28, 29). OATP prenašalci so glikoproteini (643-722 aminokislin), ki imajo zelo podobno transmembransko organizacijo domen (29). Vsi predstavniki OATP/SLCO družine imajo 12 transmembranskih domen in veliko peto zunajcelično zanko (28). Medtem, ko se večina OATP proteinov izraža v več tkivih, se OATP1B1 in OATP1B3 pretežno izražata v jetrih (30).

OATP1B1, imenovan tudi OATP2, OATP-C ali LST-1, je eden glavnih organskih anionskih prenašalcev v jetrih (30). V glavnem je izražen na bazolateralni membrani hepatocitov. SLCO1B1 mRNA so našli tudi v drugih tkivih, in sicer v enterocitih tankega črevesja (28). OATP1B1 je glikoprotein, sestavljen iz 691 aminokislin, z molekularno maso 84 kDa, ki se po deglikozilaciji zmanjša na 54 kDa (30).

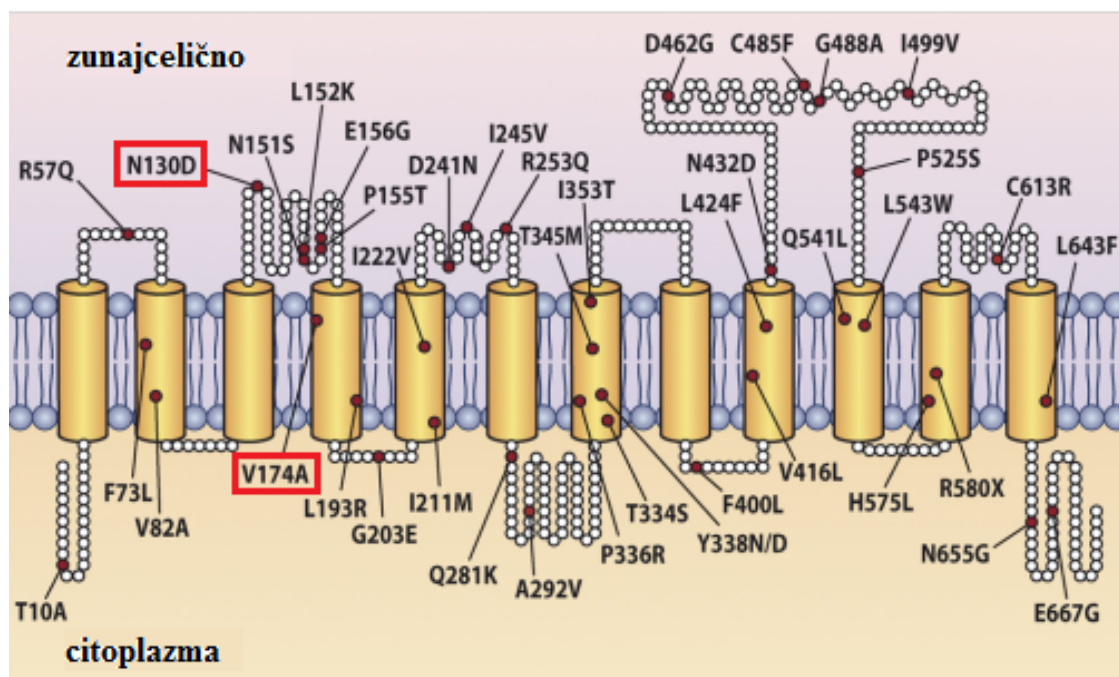
Substrati za OATP1B1 so večinoma anionske amfipatične molekule s precej visoko molekularno maso (> 350 g/mol). Primeri endogenih substratov so: žolčne kisline (holat in tauroholat), konjugirani steroidi (estradiol-17β-glukuronid, estron-3-sulfat), BIL in BIL glukuronid, eikozanoidi (levkotrien C4 in E4, prostaglandin E2 in tromboksan B2) in ščitnični hormoni (tiroksin in trijodotironin) (28, 30, 32). Eksogeni substrati so številne zdravilne učinkovine, in sicer nekateri ACE inhibitorji, antagonisti angiotenzina II, statini, antibiotiki (rifampicin in benzilpenicilin), metotreksat, aktivni metabolit irinotekana (SN-38), antagonista endotelinskih receptorjev atrasentan in bosentan, troglitazon sulfat in feksofenadin (28, 29).

Transportni mehanizem OATP prenašalcev še ni popolnoma pojasnjen. Meier-Abt in sodelavci predvidevajo, da naj bi OATP-ji prenašali substrate skozi centralno, pozitivno nabito poro po t.i. »rocker – switch« tipu mehanizma. Ta transport je neodvisen od

gradienta natrija, klorida in kalija, membranskega potenciala in ATP-ja. Študija iz leta 2004 je pokazala, da OATP1B1 substrati tvorijo farmakoporo, ki vsebuje dve akceptorski vodikovi vezi, eno donorsko vodikovo vez in dve hidrofobni območji. Weaver in sodelavci so izvedli študijo, ki je pokazala, da so za vezavo substrata in translokacijo pomembne aminokislina arginin na mestu 57, lizin na mestu 361 in arginin na mestu 580 (32).

### 1.4.1 Gen za OATP1B1

OATP1B1 protein kodira gen *SLCO1B1*, ki leži na kromosomu 12 (lokus gena 12p12) (28, 30). V genu *SLCO1B1* so odkrili številne polimorfizme, katerih alelne frekvence se močno razlikujejo med različnimi etničnimi skupinami (28). Mnogi od teh polimorfizmov vplivajo na transportno funkcijo proteinov *in vitro* in *in vivo* (glej **Slika 5**) (30).



**Slika 5:** Struktura OATP1B1 z označenimi položaji polimorfizmov. Z redečo sta označena SNP-ja, ki smo ju preučevali (32).

Eden najpogostejših polimorfizmov *SLCO1B1* gena je zamenjava adenozina z gvaninom na mestu 388 (A388G), ki se kaže kot sprememba aminokislina asparagin v aspartat (Asn130ASP) v drugi zunajcelični zanki (30, 33). Ta polimorfizem je precej pogost pri vseh populacijah (28). Frekvence mutiranega 388G alela (\*1b) so približno 30 – 45 % pri Kavkazijcih, 72 – 81 % pri Afričanih in 62 – 86 % pri Azijcih (30, 31, 33).

Drugi pogosti polimorfizem je T521C, pri katerem pride do zamenjave timina s citozinom na mestu 521. V tem primeru se v proteinu to pokaže kot zamenjava aminokislina valin z

alaninom (Val174Ala) v četrti transmembranski domeni. Ta alel (SLCO1B1\*5) ima frekvence približno 15 – 20 % pri Kavkazijcih, 1 – 4 % pri Afričanih in 8 – 16 % pri Azijcih (30, 31, 33).

Oba polimorfizma skupaj tvorita več haplotipov. Haplotip 388A-521T je poznan kot \*1a (referenčni haplotip), **388G-521T** kot \*1b, 388A-**521C** kot \*5 in **388G-521C** kot \*15 (30).

#### **1.4.2 Vpliv polimorfizmov A388G in T521C na farmakokinetiko zdravil**

Za prenašalne proteine, ki so izraženi na membranah tkiv, pomembnih za farmakokinetiko, je bilo dokazano, da pomembno vplivajo na absorpcijo, porazdelitev in izločanje zdravilnih učinkovin. Danes je znano, da so prenašalni proteini delno odgovorni za koncentracijo, ki jo zdravilne učinkovine dosežejo v plazmi in perifernih tkivih, kar vpliva na učinkovitost in toksičnost zdravila. Nedavne študije so pokazale, da mednje spada tudi OATP1B1 (32).

Prisotnost polimorfizma T521C in haplotipov \*5 in \*15 zmanjša transportno funkcijo OATP1B1, kar ima za posledico izrazito povečano koncentracijo v plazmi večine substratov OATP1B1 (estron-3-sulfat, 17 $\beta$ -estradiol glukuronid, nekateri statini, rifampicin,...) (31, 32). S kliničnega vidika je najpomembnejši vpliv na statine. Zvišana plazemska koncentracija mnogih statinov, zlasti aktivnega simvastatina, povečuje tveganje za pojav s statini povzročene miopatije in zmanjšuje terapevtski indeks statinov. Polimorfizem prav tako izrazito vpliva na farmakokinetiko več drugih zdravilnih učinkovin (31, 32).

Študije, s katerimi so preučevali funkcionalne posledice polimorfizma A388G in haplotipa OATP1B1\*1b, so pokazale nasprotujoče si rezultate. Nekatere študije so pokazale zmanjšano, nekatere zvečano ter nekatere nespremenjeno transportno funkcijo OATP1B1. Te razlike lahko pojasni uporaba različnih ekspresijskih sistemov ali pogojev eksperimenta. V kombinaciji s polimorfizmom T521C, torej kot haplotip OATP1B1\*15, pa naj bi bil polimorfizem A388G povezan z zmanjšano transportno funkcijo OATP1B1 (31, 32).

Nekatera zdravila (ciklosporin, gemfibrozil, klaritromicin, indinavir, itd.) močno inhibirajo aktivnost OATP1B1, kar povzroča klinično pomembne interakcije med zdravili. Zaradi inhibicije OATP1B1 se močno zviša plazemska koncentracija mnogih substratov za OATP1B1 (31, 32).



## 2 NAMEN DELA

Pri večini novorojenčkov je zmerna nekonjugirana hiperbilirubinemija fiziološki pojav, ki se pojavi 3. do 4. dan po rojstvu in mine v prvem tednu življenja. Pri nekaterih novorojenčkih pa serumske koncentracije BIL narastejo do nevarno visokih vrednosti, kar je razlog za skrb, saj je Bu nevrotoksičen.

Vzroki za pojav neonatalne hiperbilirubinemije so številni, tako prirojeni kot pridobljeni. Med prirojene uvrščamo tudi polimorfizme v genih, ki sodelujejo v presnovi BIL. OATP1B1 je eden glavnih prenašalcev organskih anionov iz krvi v jetra, katerega substrat je tudi BIL. V genu *SLCO1B1* so odkrili številne polimorfizme, katerih alelne frekvence se močno razlikujejo med različnimi etničnimi skupinami. Najpogostejša polimorfizma, ki bi lahko bila omejitveni dejavnik privzema BIL v hepatocite, sta A388G ali T521C.

Namen diplomske naloge je določiti pogostnost polimorfizmov A388G in T521C v genu *SLCO1B1* ter njihovih haplotipov in ugotoviti njihovo povezanost s koncentracijami BIL pri slovenskih novorojenčkih s fiziološko ali z nepojasnjeno patološko nekonjugirano hiperbilirubinemijo. Poskušali bomo torej potrditi ali ovreči hipotezo, da je za pojav povišanih koncentracij BIL lahko odgovoren polimorfizem A388G in/ali T521C v genu *OATP1B1* oziroma kateri od njihovih haplotipov.

V ta namen bomo:

- v raziskavo vključili 485 novorojenčkov, ki jim je bila odvzeta kri in izmerjena koncentracija BIL v serumu ter koncentracija transkutanega BIL;
- iz odvzete krvi izolirali DNA;
- s pomočjo alelno specifične verižne reakcije s polimerazo preiskovancem določili genotip za preiskovana polimorfizma (A388G, T521C) v genu *SLCO1B1*;
- s programom PHASE preiskovancem določili haplotipe;
- s statističnimi metodami ugotavljali povezavo med genotipi oziroma haplotipi preiskovancev in neonatalno hiperbilirubinemijo.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 VZORCI

#### **Prva preiskovana skupina: novorojenčki, rojeni v SB Novo mesto**

Izmed 322 novorojenčkov, rojenih v Splošni bolnišnici Novo mesto, smo iz raziskave izključili vse tiste, pri katerih bi lahko bil vzrok za hiperbilirubinemijo sepsa. V raziskavi je ostalo 300 novorojenčkov, od tega 159 dečkov (53,0 %) in 141 (47,0 %) deklic. Vzorci, ki smo jih prejeli, so bili epruvete s polno krvjo. V petih epruvetah je bila kri koagulirana, vendar smo te vzorce kljub temu uporabili za nadaljnje analize. Do uporabe smo vzorce popkovne krvi hranili v zamrzovalniku.

#### **Druga preiskovana skupina: novorojenčki, rojeni v SB Celje**

Druga preiskovana skupina je vključevala 185 novorojenčkov, rojenih v Splošni bolnišnici Celje, od tega 100 dečkov (54,1 %) in 85 (45,9 %) deklic. Vzorci so bili epruvetke z izolirano DNA, ki smo jih do uporabe hranili v zamrzovalniku.

Študijo je odobrila etična komisija RS (številka odobritve: 31/02/11), starši vseh vključenih novorojenčkov pa so pred odvzemom vzorcev podali pisno soglasje za sodelovanje.

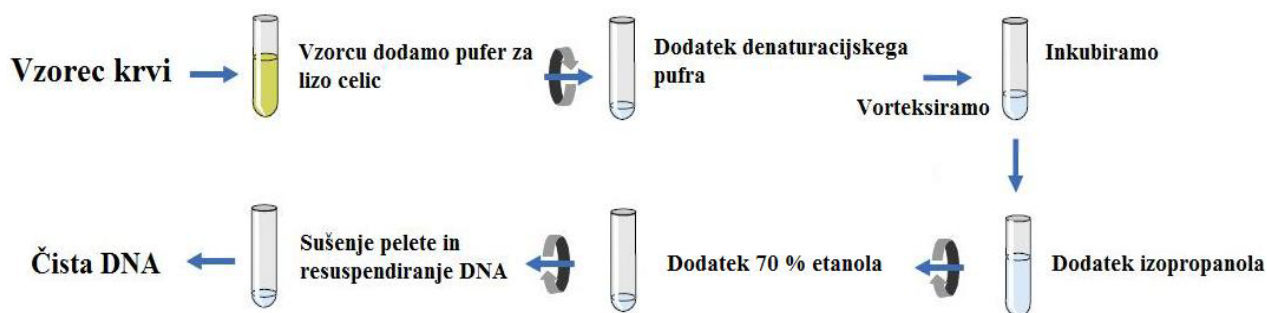
### 3.2 IZOLACIJA DNA

Za izolacijo DNA iz polne krvi in krvnih strdkov smo uporabili komplet reagentov FlexiGene DNA Kit (250). V poglavjih 3.2.1.2 in 3.2.1.3 sta opisana postopka izolacije za posamezne vrste krvnih vzorcev. Izolacija DNA iz 200  $\mu$ L krvi je bila izvedena s kompletom reagentov QiaAmp DNA Mini Kit.

#### **3.2.1 Izolacija DNA s kompletom reagentov FlexiGene DNA Kit iz polne krvi in krvnih strdkov**

##### **3.2.1.1 Princip izolacije**

FlexiGene sistem za izolacijo DNA iz krvi uporablja preprosto precipitacijo z alkoholom. V prvi stopnji vzorcu dodamo pufer za lizo celičnih membran ter nato centrifugiramo. Sproščena celična jedra in mitohondriji se po centrifugiranju oborijo v obliki pelete. V naslednjem koraku peleto raztopimo in inkubiramo v denaturacijskemu puftru s proteazo, kar povzroči razgradnjo proteinov. DNA oborimo z dodatkom izopropanola, jo speremo z etanolom, posušimo ter na koncu raztopimo v hidrationskem puftru (34).



Slika 6: Postopek izolacije DNA s kompletom reagentov FlexiGene iz polne krvi (34).

### 3.2.1.2 Postopek izolacije DNA s kompletom reagentov FlexiGene DNA Kit iz polne krvi

1. Zamznjeno kri smo odtalili v vodni kopeli na 37°C in jo do analize hranili na ledu.
2. V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 6,25 / 5,0 / 3,75 / 2,5 mL pufru FG1 za lizo celic in dodali 2,5 / 2,0 / 1,5 / 1,0 mL krvi ter premešali z obračanjem 5-krat.
3. Vzorce smo dali na stresalnik za 10 minut.
4. Vzorce smo centrifugirali 9 minut na 2500 x g.
5. Pazljivo smo odlili supernatant in pustili centrifugirko obrnjeno 2 minuti na čistem papirju, da se je odstranil še ostanek. Pazili smo, da je usedlina ostala v centrifugirki.
6. Vsakemu vzorcu smo dodali 1,25 / 1,0 / 0,75 / 0,5 mL mešanice pufru FG2 (denaturacijski pufer) in raztopljene Qiagen proteaze, ki smo jo pripravili največ eno uro pred izolacijo. Za vsak mL krvi smo uporabili 500 µL pufru FG2 in 5 µL proteaze.
7. Po dodatku mešanice smo vzorec takoj premešali na vrtinčastem mešalu, da se je peleta popolnoma homogenizirala. Če se peleta ni popolnoma homogenizirala, smo dodali še 250 / 200 / 150 / 100 µL pufru FG2 in dobro premešali.
8. Centrifugirko smo 3-krat obrnili in vzorce za 10 minut postavili v vodno kopel na 65°C. Vzorca so spremenili barvo iz rdeče v zeleno, kar je dokaz razgradnje proteinov.
9. Vzorcem smo dodali 1,25 / 1,0 / 0,75 / 0,5 mL izopropanola in premešali z obračanjem centrifugirke vsaj 20-krat. DNA se je oborila in postala vidna.
10. Vzorce smo centrifugirali 6 minut na 2500 x g.
11. Pazljivo smo odlili supernatant in centrifugirko obrnili na čist papir.
12. Vzorcem smo dodali 1,25 / 1,0 / 0,75 / 0,5 mL 70 % etanola in 5 sekund mešali na vrtinčastem mešalu.
13. Vzorce smo centrifugirali 6 minut na 2500 x g.

14. Pazljivo smo odlili supernatant in pustili obrnjeno centrifugirko na čistem papirju 10 minut, da je etanol čim bolj izhlapel.
15. Vzorcem smo dodali 300 / 200 / 200 / 200  $\mu\text{L}$  pufru FG3 (hidratacijski pufer), mešali na vrtničastem mešalu 5 sekund na majhni hitrosti in za 1 uro postavili v vodno kopel na  $65^{\circ}\text{C}$ , da se je DNA raztopila.
16. Raztopino smo odpipetirali v 1,5 mL označeno epruvetko in jo do analize shranili v hladilniku.

### **3.2.1.3 Postopek izolacije DNA s kompletom reagentov FlexiGene DNA Kit iz krvnih strdkov**

1. Zmrznjene krvne strdke smo odtalili v vodni kopeli na  $37^{\circ}\text{C}$  in jih do analize shranili na ledu. Krvnim strdkom smo dodali ultračisto avtoklavirano vodo v razmerju 1:1, nato smo jih homogenizirali s pomočjo nastavkov za pipete, in sicer s premikanjem nastavka gor in dol 10-krat.
2. V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 6,25 / 5,0 / 3,75 / 2,5 mL pufru FG1 za lizo celic in dodali 2,5 / 2,0 / 1,5 / 1,0 mL homogeniziranega krvnega strdka ter premešali z obračanjem 5-krat.
3. Vzorce smo dali na stresalnik za 10 minut.
4. Vzorce smo dodatno homogenizirali z ultrazvokom 30 s, oziroma dokler ni bilo več vidnih koščkov strdka.
5. Vzorce smo centrifugirali 9 minut na 2500 x g.
6. Pazljivo smo odlili supernatant ter ponovno dodali 6,25 / 5,0 / 3,75 / 2,5 mL pufru FG1 za lizo celic, stresali in centrifugirali 9 minut na 2500 x g.
7. Pazljivo smo odlili supernatant in pustili centrifugirko obrnjeno 2 minuti na čistem papirju, da se je odstranil še ostanek. Pazili smo, da je usedlina ostala v centrifugirki.
8. Vsakemu vzorcu smo dodali 1,25 / 1,0 / 0,75 / 0,5 mL mešanice pufru FG2 (denaturacijski pufer) in raztopljene Qiagen proteinaze, ki smo jo pripravili največ eno uro pred izolacijo. Za vsak mL krvi smo uporabili 500  $\mu\text{L}$  pufru FG2 in 5  $\mu\text{L}$  proteinaze.
9. Po dodatku mešanice smo vzorec takoj premešali na vrtničastem mešalu, da se je peleta popolnoma homogenizirala. Če se peleta ni popolnoma homogenizirala, smo dodali še 250/200/150/100  $\mu\text{L}$  pufru FG2 in dobro premešali.
10. Centrifugirko smo 3-krat obrnili in vzorce za 25 minut postavili v vodno kopel na  $65^{\circ}\text{C}$ . Vzorci so spremenili barvo iz rdeče v zeleno, kar je dokaz razgradnje proteinov.

11. Vzorce smo mešali na vrtnčastem mešalu 5 sekund.
12. Od tu naprej je bil postopek enak kot je opisan v poglavju 3.2.1.2. od točke 9 do 16.

#### **3.2.1.4 Materiali in aparature**

- komplet reagentov FlexiGene DNA Kit (250) (QIAGEN) (pufer FG1 – pufer za lizo celic, pufer FG2 - denuracijski pufer, pufer FG3 - hidratacijski pufer)
- 100 % izopropanol, 70 % etanol
- ultračista avtoklavirana voda
- Qiagen proteaza v viali (raztopili smo jo v 1,4 mL pufera FG3 in jo raztopljeno hranili v hladilniku)
- polavtomatske pipete (1-5 mL, 100-1000  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 2-20  $\mu$ L) (Eppendorf, Nemčija)
- nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- 15 mL centrifugirke (Sarstedt, Nemčija)
- 1,5 mL epruvice (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga: Centrifuge 5804R (Eppendorf, Nemčija)
- vodna kopel: Water bath - thermostat WB-4MS (Biosan)
- vrtnčasto mešalo: Bio Vortex V1 (Biosan)
- stresalnik: Vibromix 314 EUT
- ultrazvok: 4710 series Ultrasonic Homogenizer COLE-PARMER

#### **3.2.2 Izolacija DNA s kompletom reagentov QiaAmp DNA Mini Kit iz 200 $\mu$ L polne krvi**

Zaradi manjšega razpoložljivega volumna polne krvi, smo za izolacijo enega vzorca uporabili komplet reagentov QiaAmp DNA Mini Kit. Vzorec smo izolirali po navodilih proizvajalca (Qiagen - Blood and Body Fluid Spin Protocol) (35).

### **3.3 OCENA KOLIČINE IN KVALITETE IZOLIRANE DNA**

Količino in čistoto izolirane DNA smo preverili spektrofotometrično z merjenjem absorbanc. Koncentracijo izolirane DNA lahko določimo neposredno z merjenjem absorbance pri 260 nm, pri kateri imajo organske baze absorpcijski maksimum. Merilo čistote DNA je razmerje med absorbancama pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm. Čista DNA ima razmerje  $A_{260}/A_{280}$  med 1,7 in 1,9. Kontaminacija s proteini in fenoli ima

za posledico nižjo vrednost (34, 36). Integriteto izolirane DNA smo preverili z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu.

### 3.3.1 Materiali in aparature

- izolirana DNA
- pufer FG3 - hidrationski pufer
- ultračista voda
- polavtomatska pipeta 0,1 – 2,5 µL (Eppendorf, Nemčija)
- nastavki za pipeto (Sarstedt, Nemčija)
- NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies)

## 3.4 GENOTIPIZACIJA S SISTEMOM KASP

Polimorfizma A388G in T521C smo analizirali z uporabo tehnologije KASP (The Kbiosciences Competitive Allele-Specific PCR genotyping system). Genotipizacijski sistem KASP je homogena tehnologija, ki temelji na merjenju fluorescence na koncu postopka («endpoint-genotyping»). V diplomski nalogi smo jo prilagodili tako, da smo signal detektirali tudi v realnem času.

Postopek predstavlja enostaven način določevanja polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) in insercij ali delecij nukleotidov.

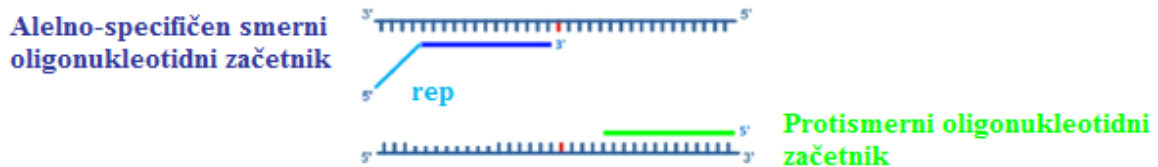
Sistem je sestavljen iz dveh komponent:

- prve, ki je specifična za preučevano spremembo in vsebuje tri neoznačene oligonukleotidne začetnike (Assay Mix),
- druge, ki vsebuje vse ostale potrebne komponente, vključno z univerzalnim fluorescentnim sistemom poročanja in posebno razvito Taq DNA-polimerazo (univerzalna reakcijska zmes - Reaction Mix) (40).

### Princip

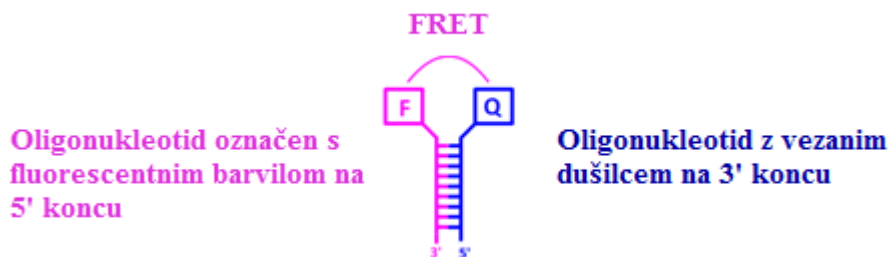
Za delovanje sistema so ključni naslednji oligonukleotidni začetniki:

- **Dva alelno-specifična smerna oligonukleotidna začetnika** (za posamezen alel polimorfizma enega). Vsak začetnik ima na 5' koncu neoznačeno repno zaporedje (t.i. rep).
- **En skupni protismerni oligonukleotidni začetnik.**



**Slika 7:** Shematski prikaz alelnost specifičnega smernega in protismernega oligonukleotidnega začetnika pri genotipizaciji s sistemom KASP.

- **Dva oligonukleotida, označena s fluorescentnim barvilom na 5' koncu.** Eden je označen z barvilom FAM, drugi z barvilom VIC. Ta dva oligonukleotida se vežeta na repno zaporedje na 5' koncih alelnost specifičnih oligonukleotidnih začetnikov.
- **Dva oligonukleotida z vezanima dušilcema na 3' koncu.** Zaporedja teh dveh oligonukleotidov so komplementarna zaporedjem oligonukleotidom z vezanim fluorescentnim barvilom. Ta zaporedja vežejo komplementarna zaporedja označena s fluorescentnim barvilom, ter tako dušijo signal fluorescence (40).



**Slika 8:** Oligonukleotid, označen z barvilom, in njemu komplementaren oligonukleotid z vezanim dušilcem pri genotipizaciji s sistemom KASP. Na začetku reakcije sta oligonukleotida povezana – prihaja do FRET (angl. *Fluorescence resonance energy transfer*). Med potekom reakcije se ločita, ker se razdalja med njima poveča, ni več FRET, kar ima za posledico porast fluorescence (40).

V začetnem koraku PCR se ustrezen alelnost specifični začetnik veže na komplementarni odsek verige DNA neposredno navzgor od mesta polimorfizma. 3' konec začetnega oligonukleotida je tako vezan na polimorfno mesto. Na komplementarno verigo DNA se veže skupni protismerni začetnik in *Taq* DNA-polimeraza začne z izgradjo komplementarnih verig DNA. V tej stopnji z barvilom označena oligonukleotida ostaneta vezana s komplementarnimi oligonukleotidi z vezanim dušilcem, zato ni porasta fluorescence.

V nadaljevanju reakcije PCR se na repe alelnost specifičnih smerne začetnikov vežejo ustrezni komplementarni oligonukleotidi z vezanim barvilom, ki se predhodno odcepijo od oligonukleotidov z vezanim dušilcem. Ker ni več prestrzanja fluorescence, le-ta poraste.

V kolikor je oseba homozigot za določen polimorfizem, bomo zaznali le enega od fluorescentnih signalov. Če pa je oseba heterozigot, bomo zaznali mešan fluorescentni signal. Uporabljata se barvili FAM in VIC, ki emitirata svetlobo pri različnih valovnih dolžinah. Valovne dolžine ekscitacije in emisije za obe barvili so podane v **Preglednici III** (40).

**Preglednica III:** Valovne dolžine ekscitacije in emisije za barvili FAM in VIC (40).

Barvilo	Ekscitacija (nm)	Emisija (nm)
FAM	485	520
VIC	534	556

### 3.4.1 Genotipizacija polimorfizmov A388G in T521C

#### Postopek

Pri delu smo uporabljali čisto delovno haljo in rokavice brez smukca. Ultra čisto vodo, KASP Reaction Mix in Assay Mix smo pred izvedbo genotipizacije razdelili na alikvote in jih shranjevali v zamrzovalniku. Na ta način smo postopke taljenja in ponovnega zamrzovanja zmanjšali na minimum. Alikvote KASP Reaction Mix-a smo zavili v alufilijo, da smo jih zaščitili pred svetlobo, saj so fluorescentna barvila občutljiva na svetlobo. Zmesi reagentov in vzorcev DNA smo pripravljali v čisti komori s pipetami, ki so namenjene izključno pripravi teh zmesi.

#### Predpriprava:

1. Plastičen pribor (nastavki za pipete in epruvetke) smo redno avtoklavirali.
2. Pred začetkom dela v komori smo s 3 % hipokloritom očistili delovno površino komore in ves potreben pribor (pipete, škatle z nastavki za pipete, kozarci z epruvetkami, stojala, flomastri) in za 30 minut prižgali UV lučko.
3. Iz zamrzovalnika smo dali vse reagente v hladilnik.
4. Mikrotitrsko ploščico z vzorci DNA smo centrifugirali 2 minuti pri 1900 obratih/min in jo postavili v predal, kjer je bila zaščitena pred svetlobo.
5. Na računalniku smo nastavili ustrezen protokol ter označili branje ustreznih vdolbinic na mikrotitrski ploščici.
6. Načrt za reakcijsko zmes (**Preglednica IV**) smo napisali vnaprej in ga pustili izven komore. Načrt je vključeval potrebne reagente, njihove količine in količine vzorcev



DNA. Reagente smo pripravili v skupni količini za ustrezno število vzorcev, slepo zmes (negativna kontrola), kontrolne vzorce ter upoštevali 10 % prebitek zaradi izgub pri pipetiranju.

**Preglednica IV:** Načrt za pripravo reakcijske zmesi za genotipizacijo s sistemom KASP.

Reagent	Volumen za 1 vzorec ( $\mu\text{L}$ )	Volumen za 60,5 vzorcev ( $\mu\text{L}$ )
Ultračista voda	1,42	85,91
2 x Reaction Mix	3,0	181,5
Assay Mix	0,083	5,0215
$\Sigma$	4,5	4,5 x 60,5
DNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ )	1,5	1,5

#### **Priprava reakcijske zmesi:**

1. Reagente smo prinesli v komoro, jih dobro premešali in centrifugirali.
2. Pripravili in označili smo dve epruvetki, za vsak polimorfizem svojo (A388G, T521C).
3. Po načrtu smo odpipetirali ustrezne volumne posameznih reagentov v epruvetki, ju dobro premešali in centrifugirali.
4. V posamezno vdolbinico na mikrotitrski ploščici s 384 vdolbinicami smo z reverznim pipetiranjem odpipetirali 4,5  $\mu\text{L}$  pripravljene reakcijske zmesi.
5. Nato smo v posamezne vdolbinice z 12-kanalno polavtomatsko pipeto dodali še ustrezne volumne raztopin DNA. Slepa zmes je namesto vzorca DNA vsebovala ultračisto vodo.
6. Ploščico smo prekrili s samolepilno folijo in jo centrifugirali 2 minuti pri 1900 obratih/min.

#### **Izvedba reakcije PCR v realnem času:**

1. Ploščico smo vstavili v aparat »LightCycler 480 II«.
2. V računalniškem programu smo zagnali predhodno nastavljen protokol. Uporabljali smo »Touchdown protocol« - protokol za PCR s padajočo temperaturo prileganja, kjer z vsakim ciklom PCR pade temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov za 0,8 °C. Temperaturni in časovni program reakcije PCR v realnem času (protokol) je podan v **Preglednici V**.
3. Postopek PCR je trajal 1 uro in 40 minut.

**Preglednica V:** Temperaturni in časovni program reakcije PCR v realnem času za oba polimorfizma (Protokol 3).

	Temperatura	Čas	Število ciklov
1.	95 °C	15 minut	1
2.	95 °C	20 sekund	10 (koraka 2 in 3 ponovimo 9-krat, da dosežemo temperaturo prileganja 57 °C)
3.	65 °C	60 sekund	
4.	Padec - 0,8 °C/na cikel		
5.	95 °C	20 sekund	18
6.	57 °C	60 sekund	
7.	95 °C	20 sekund	15
8.	57 °C	60 sekund	
9.	37 °C	5 sekund	

### **Rezultati:**

Po končani PCR reakciji smo izvedli alelni diskriminacijo, s katero smo določili genotipe posameznim vzorcem.

#### **3.4.1.1 Materiali in aparature**

- vzorci DNA (konc. ~ 10 ng/μL)
- ultračista voda
- 2 x KASP Reaction Mix (KBioscience): vsebuje univerzalni fluorescentni reporterski sistem, dNTP, encim Taq DNA-polimerazo, pasivno referenčno barvilo (ROX), MgCl<sub>2</sub> (50 mM), DMSO
- Assay Mix za A388G in T521C (KBioscience): oba vsebujeta tri neoznačene začetnike s koncentracijami 100 μM, in sicer dva alelni-specifična smerna začetnika in skupen protismerni začetnik
- polavtomatske pipete (20-200 μL in 0,1-10 μL) (Eppendorf, Nemčija)
- 12-kanalna polavtomatska pipeta 0,1–100 μL (Eppendorf, Nemčija)
- nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- epruvetke (1,5 mL in 0,5 mL) (Eppendorf, Nemčija)
- mikrotitrne ploščice z 384 vdolbinicami in samolepilna folija (Roche Applied Science, Nemčija),
- delovna komora (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner (UVC/T-M-AR), Latvija)

- LightCycler 480 II (Roche, Nemčija)
- centrifuga: Centric 322A (tehtnica, Železniki, Slovenija)
- mikrocentrifuga z vorteksom (Biosan)

### 3.5 DOLOČANJE BIOKEMIČNIH PARAMETROV

Koncentracija BIL pri novorojenčkih, rojenih v SB Celje, je bila določena z Jendrassik – Grofovo metodo na analizatorju Vitros Ektachem (Kodak) iz popkovnične krvi in vzorca krvi, odvzetega 3. dan po rojstvu (19). Novorojenčkom, rojenih v SB Novo mesto, so koncentracijo BIL v popkovnični krvi in vzorcu krvi 3. dan po rojstvu prav tako določili z Jendrassik – Grofovo metodo. Poleg koncentracije BIL so novorojenčkom določili tudi transkutani BIL. Transkutano merjenje BIL so izvedli z uporabo merilnika, ki oddaja svetlobo na kožo in meri njen odboj pri 460 nm (absorpcijski maksimum BIL) in pri 550 nm zaradi korekcije vpliva hemoglobina (bilirubinmeter Bilicheck) (41).

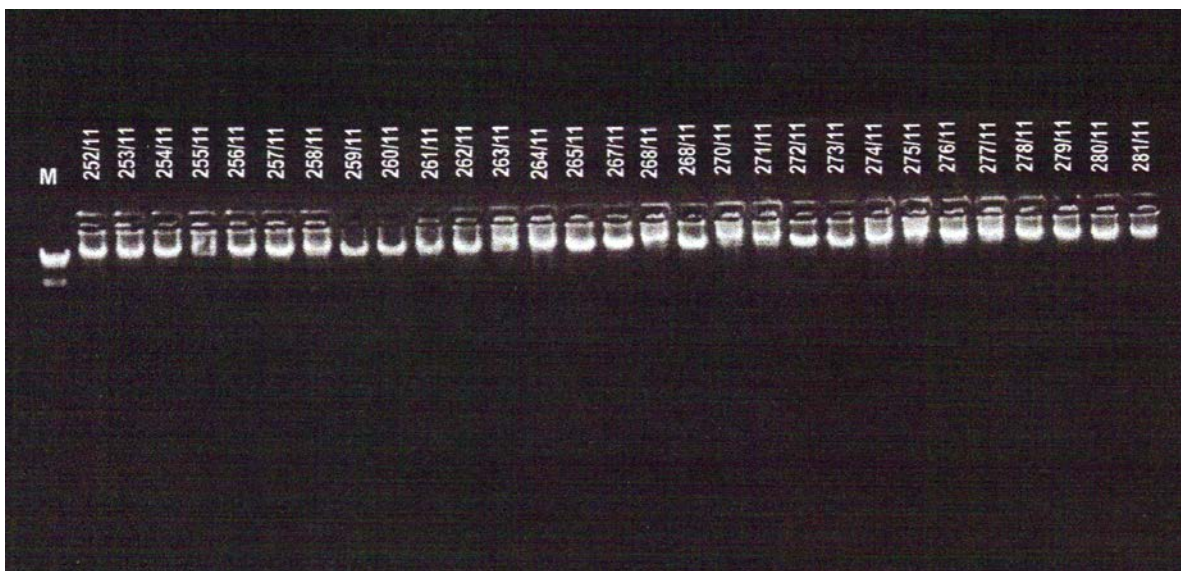
### 3.6 STATISTIČNE METODE

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabljali program SPSS Statistics 20.0. Pri vseh analizah smo vrednost  $p < 0,05$  opredelili za statistično značilno. Povezanost polimorfizmov A388G in T521C ter njihovih haplotipov z izbranimi spremenljivkami smo ugotavljali s pomočjo parametričnih in neparametričnih testov. S Kolmogorov-Smirnovim testom smo preverili normalnost porazdelitve spremenljivk. V primeru normalne porazdelitve smo uporabili parametrične teste, in sicer t-test (za dve neodvisni spremenljivki) in ANOVA (za več neodvisnih spremenljivk). Če se spremenljivke niso porazdeljevale normalno, smo poskušali podatke transformirati z naravnim logaritmom. Če je transformacija dala normalno porazdelitev, smo uporabili parametrične teste. V primeru nenormalne porazdelitve smo uporabili neparametrične teste, in sicer Mann-Whitneyev test (za dve neodvisni spremenljivki) in Kruskal-Wallisov test (za več neodvisnih spremenljivk). Za ugotavljanje statistično značilnih razlik v porazdelitvi genotipov oziroma števila kopij med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo smo uporabili izračun  $\chi^2$ .

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 IZOLACIJA DNA

DNA smo uspešno izolirali iz vseh 300 vzorcev, in sicer smo 294 vzorcev izolirali iz 1 / 1,5 / 2 / 2,5 mL polne krvi, 5 vzorcev iz krvnih strdkov ter 1 vzorec iz 200  $\mu$ L polne krvi. Količino in čistoto izolirane DNA smo preverili spektrofotometrično. Koncentracije DNA se med seboj zelo razlikujejo, saj so odvisne od števila levkocitov v krvi novorojenčkov. Vsi vzorci izolirane DNA so bili ustrezno čisti, saj imajo razmerje  $A_{260}/A_{280}$  med 1,7 in 1,9. Izolirano DNA smo preverili tudi z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu, ki nam je potrdila, da DNA v nobenem vzorcu ni fragmentirana (glej **Slika 9**). Iz zgoraj napisanega lahko zaključimo, da je kvaliteta izolirane DNA pri vseh vzorcih ustrezna.



**Slika 9:** Prikaz rezultatov elektroforeze na 2 % agaroznem gelu (napotost: 90 V; čas: 20 minut; volumen nanosa vzorca: 2  $\mu$ L; uporabljen označevalec dolžin: Molecular Weith Marker II (dolžini obeh vidnih lis označevalca sta 9416 in 23130 bp)).

Sledilo je redčenje vzorcev. Iz osnovnih nerazredčenih raztopin smo najprej pripravili t.i. delovne raztopine, tako da smo osnovne raztopine glede na koncentracijo DNA v le-teh raztopinah redčili v razmerjih 1:2, 1:5, 1:15 in 1:20 (glej **Preglednico VI**). Delovnim raztopinam smo izmerili koncentracije DNA s spektrofotometrom Nanodrop ND-1000. Na osnovi teh koncentracij smo delovne raztopine redčili do končne koncentracije 10 ng/ $\mu$ L in končnega volumna 50  $\mu$ L. Končne raztopine vzorčnih DNA smo pripravili v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami.

**Preglednica VI:** Shema redčenja osnovnih nerazredčenih raztopin.

Koncentracija DNA v osnovni nerazredčeni raztopini (ng/ $\mu$ L)	Redčenje	Osnovna raztopine DNA ( $\mu$ L) + ultračista voda ( $\mu$ L)
< 100	1:2	15 + 15
100 - 400	1:5	6 + 24
400 – 700	1:15	2 + 28
> 700	1:20	3 + 57

## 4.2 MODIFIKACIJA METODE GENOTIPIZACIJE

Modifikacija metode je bila potrebna iz razloga, da smo signal lahko detektirali tudi v realnem času, saj KASP genotipizacija temelji na merjenju fluorescence le na koncu postopka. S uvedbo te modifikacije smo lahko bolj natančno opazovali potek reakcije (npr. v katerem ciklu začne fluorescenca naraščati).

Protokol reakcije, ki ga je predlagal proizvajalec, je zajemal 15-minutno začetno denaturacijo pri 95 °C, 10-krat ponovitev cikla: 20 sekund pri 95°C, 60 sekund pri 65°C in padec 0,8°C na cikel, 26-krat ponovitev cikla: 20 sekund pri 95°C in 60 sekund pri 57°C, in nato 2-krat ponovitev cikla: 5 sekund pri 37°C – kvantifikacija (**Preglednica VII**).

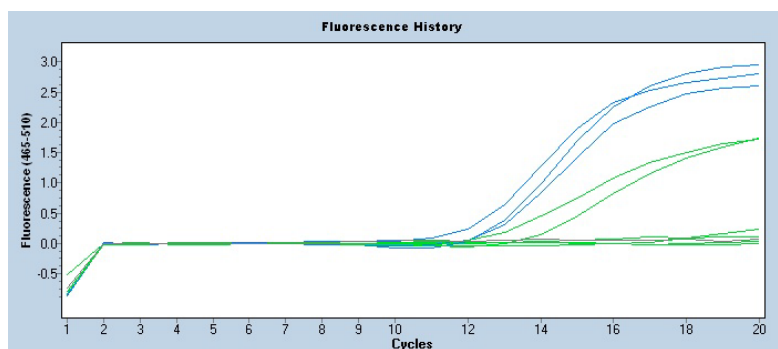
**Preglednica VII:** Temperaturni in časovni program reakcije PCR, ki ga je predlagal proizvajalec (Protokol 1).

	Temperatura	Čas	Število ciklov
1.	95 °C	15 minut	1
2.	95 °C	20 sekund	10 (koraka 2 in 3 ponovimo 9-krat, da dosežemo temperaturo prileganja 57 °C)
3.	65 °C	60 sekund	
4.	Padec - 0,8 °C/na cikel		
5.	95 °C	20 sekund	26
6.	57 °C	60 sekund	
7.	37 °C	5 sekund	2

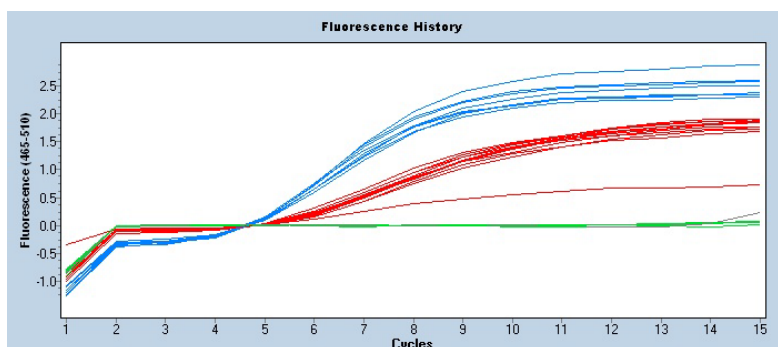
Protokol 1 smo modificirali tako, da smo od proizvajalca predlaganih 26 ponovitev cikla skrajšali na 10 ponovitev in dodali še 20 ponovitev cikla: 20 sekund pri 95°C, 60 sekund pri 57°C in 5 sekund pri 37°C – kvantifikacija (celoten protokol je podan v **Preglednici VIII**). Z uvedbo te prilagoditve metode smo signal lahko detektirali tudi v realnem času.

**Preglednica VIII:** Modificirani temperaturni in časovni program reakcije PCR (Protokol 2).

	Temperatura	Čas	Število ciklov
1.	95 °C	15 minut	1
2.	95 °C	20 sekund	10 (koraka 2 in 3 ponovimo 9-krat, da dosežemo temperaturo prileganja 57 °C)
3.	65 °C	60 sekund	
4.	Padec - 0,8 °C/na cikel		
5.	95 °C	20 sekund	10
6.	57 °C	60 sekund	
7.	95 °C	20 sekund	20
8.	57 °C	60 sekund	
9.	37 °C	5 sekund	

**Slika 10:** Odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (Protokol 2).

Iz **Slike 10** je razvidno, da začne fluorescenca pri Protokolu 2 naraščati šele po 10 ciklih. Zato smo Protokol 2 še dodatno modificirali, in sicer smo 10 ponovitev cikla (20 sekund pri 95°C in 60 sekund pri 57°C) dodali 8 ponovitev in 20 ponovitev cikla skrajšali na 15 ponovitev. Celoten končni modificirani protokol reakcije, ki smo ga uporabili za genotipizacijo, je podan v poglavju 3.4.1 v **Preglednici V**.

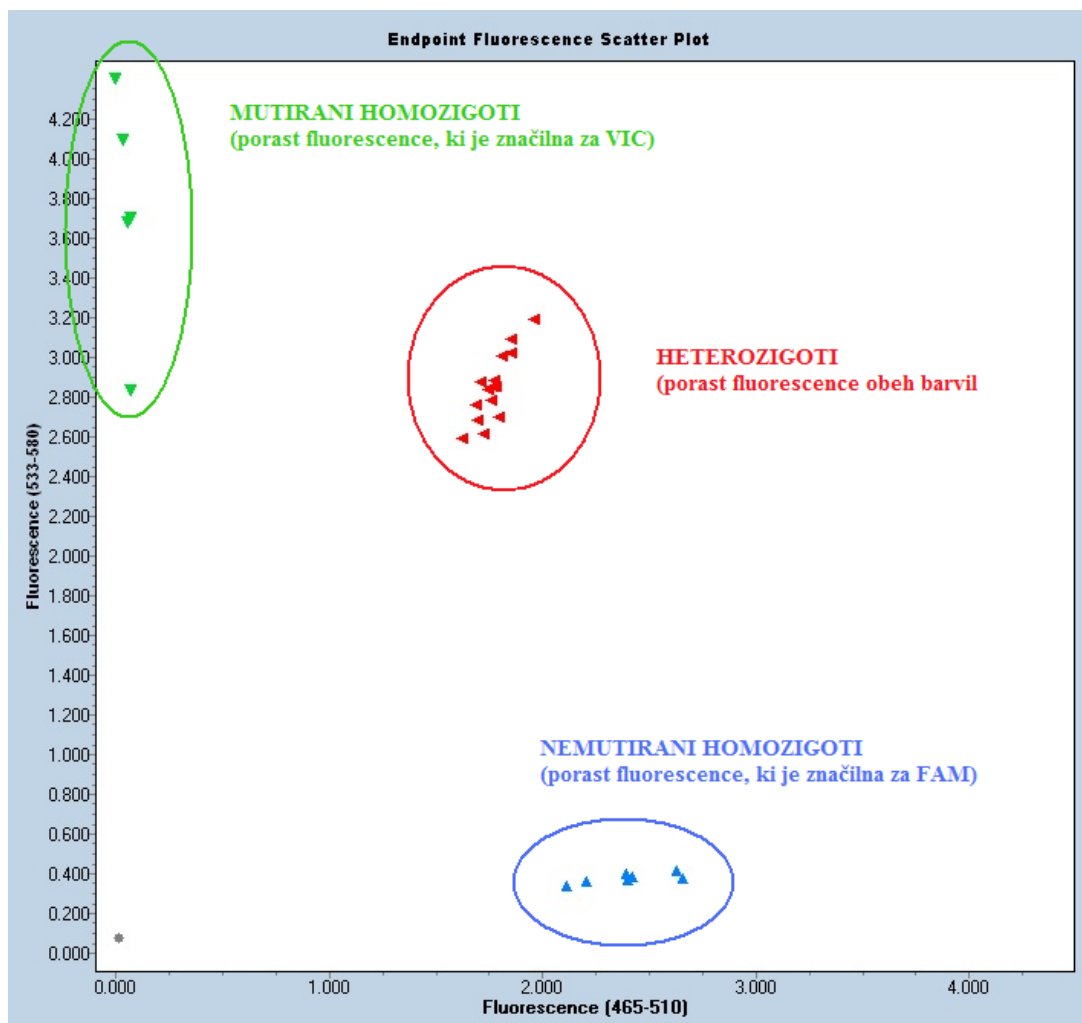
**Slika 11:** Odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov pri polimorfizmu A388G (Protokol 3).

### 4.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJE

Po končanem pomnoževanju in branju fluorescence smo dobili rezultate v obliki tabele in grafa (glej **Slika 12**). Vzorcem smo določili genotipe glede na razporeditev točk na grafu.

Pri določitvi genotipa za polimorfizma A388G in T521C smo upoštevali naslednje:

- če je porasla samo fluorescenca značilna za fluorofor FAM, smo določili, da je oseba homozigot za normalen alel (v primeru A388G: A/A in v primeru T521C: T/T);
- če je porasla samo fluorescenca značilna za fluorofor VIC, smo določili, da je oseba homozigot za mutiran alel (v primeru A388G: G/G in v primeru T521C: C/C);
- v primeru porasta fluorescence obeh fluoroforov smo določili heterozigota z enim normalnim in enim mutiranim alelom (v primeru A388G: A/G in v primeru T521C: T/C).



**Slika 12:** Prikaz rezultatov genotipizacije v obliki grafa.

#### 4.4 UGOTAVLJANJE POGOSTNOSTI POLIMORFIZMOV A388G IN T521C V GENU ZA OATP1B1

Na podlagi genotipov, ki smo jih določili z genotipizacijo vseh 485 vzorcev, smo izračunali relativne frekvence genotipov v slovenski populaciji. Relativne frekvence genotipov za posamezne polimorfizme so predstavljene v **Preglednicah IX** in **X**.

**Preglednica IX:** Frekvence genotipov za polimorfizem A388G.

n	AA n (%)	AG n (%)	GG n (%)
485	158 (32,6)	250 (51,5)	77 (15,9)

**Preglednica X:** Frekvence genotipov za polimorfizem T521C.

n	TT n (%)	TC n (%)	CC n (%)
485	310 (63,9)	156 (32,2)	19 (3,9)

Iz preglednic IX in X je razvidno, da je pogostost pojavljanja genotipa CC razmeroma nizka (3,9 %), medtem ko se genotip GG pojavlja dosti pogosteje (15,9 %). Pri polimorfizmu A388G prevladuje genotip AG (51,5 %), pri polimorfizmu T521C pa genotip TT (63,9 %). Frekvenca mutiranega alela pri naših preiskovancih za polimorfizem A388G znaša 41,7 %, za polimorfizem T521C pa 20,0 %. Frekvence alelov, ugotovljene v naši raziskavi, so podobne, kot so jih določili v različnih študijah za Kavkazijce (30 – 45 % za A388G in 15 – 20 % za T521C) (31).

Za vsak polimorfizem smo s  $\chi^2$ -testom za dva neodvisna vzorce preverili, če so frekvence genotipov v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Hardy-Weinbergovo načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja in velja za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer se osebkni naključno razmnožujejo, kjer ni selekcije vzorcev in dodatnih mutacij in migracij (42).  $\chi^2$ -test 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 ( $p = 0,1827$  za A388G in  $p = 0,9096$  za T521C). To pomeni, da so frekvence genotipov za oba polimorfizma v genu za OATP1B1 v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.



#### 4.5 DOLOČANJE HAPLOTIPOV OATP1B1\*1a, OATP1B1\*1b, OATP1B1\*5 IN OATP1B1\*15

Haplotip je kombinacija alelov, ki se nahaja na istem kromosomu. Glede na položaj so v genskem zapisu običajno blizu skupaj in se skupaj dedujejo. Za napovedovanje haplotipov smo uporabili program PHASE, v katerega smo vnesli genotipe vseh vzorcev za oba polimorfizma. Program nam za vsak vzorec izračuna možne pare haplotipov, verjetnost, da je določen haplotip prisoten na alelu in frekvenca posameznih haplotipov, ki so predstavljene v **Preglednici XI** (43).

**Preglednica XI:** Haplotipi polimorfizmov A388G in T521C in njihove frekvenca (%) (V stolpcu Oznaka so podane oznake, ki smo jih uporabljali pri analizi, v oklepajih pa so splošno uporabljane oznake za haplotipe).

Oznaka	Haplotip	Frekvenca (%)
*1a (OATP1B1*1a)	AT	53,9
*1b (OATP1B1*1b)	GT	26,1
*5 (OATP1B1*5)	AC	4,5
*15 (OATP1B1*15)	GC	15,5

#### 4.6 KLINIČNI POMEN POLIMORFIZMOV A388G IN T521C TER NJUNIH HAPLOTIPOV V GENU ZA OATP1B1

V statistično obdelavo smo vključili 283 novorojenčkov, rojenih v SB Novo mesto (prva preiskovana skupina) in 180 novorojenčkov, rojenih v SB Celje (druga preiskovana skupina). Vključeni so bili vsi novorojenčki, ki so dopolnili 37 tednov gestacije in so bili težji od 2400 g ter niso imeli nobenih znanih zdravstvenih zapletov, ki bi lahko povzročil hiperbilirubinemijo (neskladnost krvnih skupin med mamo in otrokom, prirojena hemolitična anemija, infekcije).

##### 4.6.1 Karakteristike preiskovanih skupin

Vsem novorojenčkom je bila določena teža ob porodu, tedni gestacije in koncentracija BIL v popkovnični krvi in v kontrolnem vzorcu 3. dan starosti. Novorojenčkom iz prve preiskovane skupine je bila poleg tega določena še koncentracija transkutano merjenega BIL. V **Preglednicah XII** in **XIII** so podani izračuni srednjih vrednosti in standardne deviacije zgoraj omenjenih kliničnih značilnosti za obe preiskovani skupini. Za

novorojenčke iz prve preiskovane skupine smo imeli na voljo podatek o fototerapiji, in sicer ali je bil novorojenček pred 3. dnem starosti izpostavljen fototerapiji ali ne. Pred 3. dnem starosti je bilo fototerapiji izpostavljenih 50 novorojenčkov prve preiskovane skupine. Pri novorojenčkih, ki so bili obsevani, se je koncentracija BIL posledično znižala. Za statistično obdelavo smo imeli na voljo le podatek o koncentraciji, merjeni 3. dan starosti, ne pa tudi podatka o koncentraciji BIL pred izvedbo fototerapije. Torej podatkov o najvišjih vrednostih BIL nismo imeli.

**Preglednica XII:** Povprečne vrednosti in SD izmerjenih kliničnih parametrov pri prvi preiskovani skupini.

Klinične značilnosti	Vsi novorojenčki	deklice	dečki
Število n (%)	283 (100 %)	135 (47,7 %)	148 (52,3 %)
Gestacija ± SD (tedni)	39,5 ± 1,0	39,6 ± 1,0	39,5 ± 1,1
Teža ob porodu ± SD (g)	3511,0 ± 429,1	3467,0 ± 398,7	3551,1 ± 452,6
BIL ± SD popkovična kri (μmol/L)	34,2 ± 7,8	33,6 ± 7,5	34,7 ± 8,0
BIL ± SD vzorec 3. dan (μmol/L)	167,7 ± 60,3	153,0 ± 60,5	180,9 ± 57,1
Transkutani BIL ± SD (mmol/L)	173,3 ± 61,5	159,8 ± 65,4	185,7 ± 55,1

**Preglednica XIII:** Povprečne vrednosti in SD izmerjenih kliničnih parametrov pri drugi preiskovani skupini.

Klinične značilnosti	Vsi novorojenčki	deklice	dečki
Število n (%)	180 (100 %)	82 (45,6 %)	98 (54,4 %)
Gestacija ± SD (tedni)	39,5 ± 1,0	39,4 ± 1,0	39,6 ± 1,0
Teža ob porodu ± SD (g)	3538,6 ± 493,3	3377,6 ± 420,0	3673,3 ± 511,3
BIL ± SD popkovična kri (μmol/L)	30,6 ± 8,2	30,9 ± 7,3	30,4 ± 9,0
BIL ± SD vzorec 3. dan (μmol/L)	172,4 ± 73,1	170,8 ± 72,9	173,7 ± 73,5

#### 4.6.2 Primerjava med skupinama

Naš cilj je bil, da bi obe preiskovani skupini lahko obravnavali kot eno in imeli s tem večji in bolj reprezentativen vzorec. Da bi skupini lahko združili, med posameznimi parametri

obeh skupin ne bi smelo biti statistično značilnih razlik. **Preglednica XIV** podaja rezultate primerjave med skupinama.

**Preglednica XIV:** Rezultati statistične analize primerjave med skupinama.

	<b>1. preiskovana skupina</b>	<b>2. preiskovana skupina</b>	<b>p – vrednost</b>
<b>Število (n)</b>	283	180	/
<b>Gestacija ± SD (tedni)</b> *	39,5 ± 1,0	39,5 ± 1,0	0,613
<b>Teža ob porodu ± SD (g)</b> *	3511,0 ± 429,1	3538,6 ± 493,3	0,704
<b>BIL ± SD popkovična kri (μmol/L)</b> *	34,2 ± 7,8	30,6 ± 8,2	<b>&lt; 0,0005</b>
<b>BIL ± SD vzorec 3. dan (μmol/L)</b> *	167,7 ± 60,3	172,4 ± 73,1	0,182

\* Mann-Whitneyev test

Iz preglednice je razvidno, da je pri primerjavi koncentracije BIL v popkovnični krvi statistično značilna razlika med obema skupinama. Razlog za to razliko bi lahko bil čas od odvzema vzorca do izvedbe analize. V SB Novo Mesto so namreč vzorce krvi analizirali prej kot v SB Celje, zato bi lahko bile vrednosti BIL v popkovnični krvi pri novorojenčkih prve preiskovane skupine višje. V bolnišnici so to preverili in ugotovili, da ni bilo razlik v koncentracijah, merjenih v različnih časih od odvzema vzorca. Torej je najverjetneje do razlik med skupinama prišlo, ker je v prvi skupini več novorojenčkov z višjimi koncentracijami BIL. V nadaljevanju zato skupin pri preučevanju povezave spola oziroma genotipov/haplotipov s koncentracijami BIL v popkovnični krvi nismo obravnavali skupaj. Upoštevali smo le podatke prve preiskovane skupine, ker je bilo vanjo vključenih večje število preiskovancev.

Pri ostalih treh parametrih statistično značilnih razlik med skupinama ni. Vendar kljub temu, da so razlike pri koncentraciji BIL 3. dan starosti med obema skupinama nesignifikantne, lahko vidimo, da so koncentracije pri prvi preiskovani skupini nižje. V SB Novo Mesto je bilo pred 3. dnem starosti opravljenih več fototerapij kot v SB Celje, kar bi lahko bil vzrok za nižje koncentracije BIL, izmerjene 3. dan starosti, pri novorojenčkih prve skupine. Ker statistično značilnih razlik med skupinama ni, smo v nadaljnjih statističnih analizah pri preučevanju teh treh parametrov skupini združili.

### 4.6.3 Povezava med koncentracijo BIL in spolom

V okviru statistične analize smo primerjali povprečne vrednosti spremenljivk glede na spol novorojenčkov. V **Preglednici XV** so podani izračuni srednjih vrednosti in standardne deviacije izmerjenih kliničnih parametrov, v **Preglednici XVI** pa so podane p vrednosti statistične analize.

**Preglednica XV:** Povprečne vrednosti in SD izmerjenih kliničnih parametrov.

Klinične značilnosti	Vsi novorojenčki	deklice	dečki
Število n (%)	463 (100 %)	217 (46,9 %)	246 (53,1 %)
Gestacija ± SD (tedni)	39,5 ± 1,0	39,5 ± 1,0	39,5 ± 1,1
Teža ob porodu ± SD (g)	3521,7 ± 454,8	3433,2 ± 408,3	3600,0 ± 479,6
BIL ± SD vzorec 3. dan (μmol/L)	169,5 ± 65,6	159,8 ± 66,0	178,0 ± 64,1
Število n (%)	283 (100 %)	135 (47,7 %)	148 (52,3 %)
BIL ± SD popkovična kri (μmol/L)	34,2 ± 7,8	33,6 ± 7,5	34,7 ± 8,0
Transkutani BIL ± SD (mmol/L)	173,3 ± 61,5	159,8 ± 65,4	185,7 ± 55,1

**Preglednica XVI:** Primerjava vrednosti izmerjenih parametrov glede na spol.

	Teža ob porodu *	BIL popkovična kri (μmol/L) **	BIL vzorec 3. dan (μmol/L) **	Transkutani BIL (mmol/L) **
p - vrednost	< 0,0005	0,464	0,002	0,001

\* t-test, \*\* Mann-Whitneyev test

S t-testom smo ugotavljali razliko v teži med spoloma. Novorojenčki se med spoloma razlikujejo v porodni teži ( $p < 0,0005$ ), in sicer so dečki pričakovano težji. Z Mann-Whitneyevim testom smo ugotavljali razliko v koncentraciji BIL med spoloma. Med spoloma so statistično značilne razlike v koncentraciji BIL (kontrolni vzorec krvi 3. dan:  $p = 0,002$ , transkutani BIL:  $p = 0,001$ ). Tako kot smo razliko v porodni teži med spoloma pričakovali, so tudi ti rezultati pričakovani, saj je iz drugih študij znano, da imajo dečki višje koncentracije BIL kot deklice (41).

#### 4.6.4 Povezava med koncentracijo BIL in genotipi ter haplotipi

Preiskovance smo za oba polimorfizma razdelili na tri genotipske podskupine (AA, AG in GG za A388G in TT, TC in CC za T521C). Ker je relativna frekvenca genotipa CC zelo nizka, smo pri polimorfizmu T521C združili podskupini heterozigotov in mutiranih homozigotov.

Preiskovance smo razdelili tudi glede na število kopij posameznega haplotipa, ki jih ima posameznik (0 – nobene kopije, 1 – eno kopijo, 2 – dve kopiji). V analizo smo vključili haplotipe \*1a, \*1b in \*15, medtem ko haplotipa \*5 zaradi nizke frekvence nismo analizirali.

V okviru statistične analize smo tako primerjali povprečne vrednosti spremenljivk glede na prisotnost določenega genotipa v primeru polimorfizmov A388C in T521C ter glede na prisotnost števila kopij posameznega haplotipa.

V spodnjih preglednicah so podani izračuni srednjih vrednosti BIL po genotipih in haplotipih ter rezultati statistične analize vpliva polimorfizmov A388G in T521C ter njihovih haplotipov na koncentracijo BIL.

**Preglednica XVII:** Srednje vrednosti  $\pm$  SD in p vrednosti statistične analize za polimorfizem A388G.

	<b>BIL <math>\pm</math> SD popkovnična kri (<math>\mu\text{mol/L}</math>) *</b>	<b>BIL <math>\pm</math> SD vzorec 3. dan (<math>\mu\text{mol/L}</math>) *</b>	<b>Transkutani BIL <math>\pm</math> SD (<math>\text{mmol/L}</math>) *</b>
<b>Število (n)</b>	283	463	283
<b>AA</b>	34,3 $\pm$ 8,3	165,8 $\pm$ 65,7	<b>163,4 <math>\pm</math> 65,4</b>
<b>AG</b>	33,8 $\pm$ 7,7	171,7 $\pm$ 65,2	<b>178,1 <math>\pm</math> 59,8</b>
<b>GG</b>	35,6 $\pm$ 6,4	170,4 $\pm$ 67,7	<b>178,8 <math>\pm</math> 56,5</b>
<b>p - vrednost</b>	0,234	0,682	0,312

\* Kruskal-Wallisov test

Izračuni niso pokazali statistično značilnih razlik v koncentracijah BIL med posameznimi genotipi, kar je razvidno iz rezultatov v zgornji preglednici (vse p – vrednosti so višje od 0,05). Pri transkutanem BIL je sicer opazen trend naraščanja s številom kopij mutiranega alela, vendar razlike niso statistično značilne.

**Preglednica XVIII:** Srednje vrednosti  $\pm$  SD in p vrednosti statistične analize za polimorfizem T521C.

	<b>BIL <math>\pm</math> SD popkovična kri (<math>\mu\text{mol/L}</math>) *</b>	<b>BIL <math>\pm</math> SD vzorec 3. dan (<math>\mu\text{mol/L}</math>) *</b>	<b>Transkutani BIL <math>\pm</math> SD (mmol/L) *</b>
<b>Število (n)</b>	283	463	283
<b>TT</b>	34,2 $\pm$ 7,7	171,3 $\pm$ 64,7	<b>170,2 <math>\pm</math> 60,5</b>
<b>TC + CC</b>	34,2 $\pm$ 7,9	166,4 $\pm$ 67,2	<b>179,2 <math>\pm</math> 63,2</b>
<b>p - vrednost</b>	0,904	0,315	0,163

\* Mann-Whitneyev test

S statistično analizo nismo ugotovili vpliva polimorfizma T521C na koncentracijo BIL. Pri transkutanem BIL so koncentracije pri skupini heterozigotov in mutiranih homozigotov višje kot pri skupini nemutiranih homozigotov, vendar razlike med skupinama niso statistično značilne.

**Preglednica XIX:** Srednje vrednosti  $\pm$  SD in p vrednosti statistične analize za haplotip \*1a.

<b>Haplotip *1a</b>	<b>BIL <math>\pm</math> SD popkovična kri (<math>\mu\text{mol/L}</math>) *</b>	<b>BIL <math>\pm</math> SD vzorec 3. dan (<math>\mu\text{mol/L}</math>) **</b>	<b>Transkutani BIL <math>\pm</math> SD (mmol/L) **</b>
<b>Število (n)</b>	283	463	283
<b>0 kopij</b>	34,9 $\pm$ 7,0	168,9 $\pm$ 70,8	176,0 $\pm$ 62,6
<b>1 kopija</b>	33,9 $\pm$ 7,9	168,8 $\pm$ 64,6	175,4 $\pm$ 61,1
<b>2 kopiji</b>	34,3 $\pm$ 7,8	171,3 $\pm$ 64,9	168,0 $\pm$ 62,2
<b>p - vrednost</b>	0,669	0,793	0,657

\* ANOVA, \*\* Kruskal-Wallisov test

**Preglednica XX:** Srednje vrednosti  $\pm$  SD in p vrednosti statistične analize za haplotip \*1b.

<b>Haplotip *1b</b>	<b>BIL <math>\pm</math> SD popkovična kri (<math>\mu\text{mol/L}</math>) *</b>	<b>BIL <math>\pm</math> SD vzorec 3. dan (<math>\mu\text{mol/L}</math>) *</b>	<b>Transkutani BIL <math>\pm</math> SD (mmol/L) *</b>
<b>Število (n)</b>	283	463	283
<b>0 kopij</b>	34,1 $\pm$ 7,9	<b>168,1 <math>\pm</math> 66,1</b>	172,5 $\pm$ 64,0
<b>1 kopija</b>	34,1 $\pm$ 7,6	<b>170,9 <math>\pm</math> 64,1</b>	174,8 $\pm$ 57,8
<b>2 kopiji</b>	35,1 $\pm$ 7,5	<b>175,1 <math>\pm</math> 70,1</b>	172,7 $\pm$ 61,1
<b>p - vrednost</b>	0,848	0,637	0,976

\* Kruskal-Wallisov test

**Preglednica XXI:** Srednje vrednosti  $\pm$  SD in p vrednosti statistične analize za haplotip \*15.

Haplotip *15	BIL $\pm$ SD popkovična kri ( $\mu\text{mol/L}$ ) *	BIL $\pm$ SD vzorec 3. dan ( $\mu\text{mol/L}$ ) *	Transkutani BIL $\pm$ SD (mmol/L) *
Število (n)	283	463	283
0 kopij	34,1 $\pm$ 8,0	168,7 $\pm$ 65,1	167,9 $\pm$ 62,3
1 kopija	34,1 $\pm$ 7,6	173,1 $\pm$ 66,9	188,5 $\pm$ 56,6
2 kopiji	35,1 $\pm$ 4,5	154,3 $\pm$ 64,2	166,0 $\pm$ 67,7
p - vrednost	0,755	0,608	0,062

\* Kruskal-Wallisov test

S statistično analizo nismo dokazali vpliva haplotipov \*1a, \*1b in \*15 na koncentracijo BIL. Pri koncentraciji BIL, merjeni 3. dan starosti, se srednje vrednosti razlikujejo med podskupinami z nič, eno in dvema kopijama haplotipa \*1b, vendar ne statistično značilno ( $p = 0,637$ ).

#### 4.6.5 Povezava med razvojem patološke hiperbilirubinemije in genotipi ter haplotipi

Novorojenčke smo glede na klinične značilnosti prisotne hiperbilirubinemije razdelili v dve skupini (fiziološka in patološka hiperbilirubinemija) in izračunali srednje vrednosti ter SD koncentracij BIL. Kot mejo med fiziološkim in patološkim območjem smo upoštevali koncentracijo BIL 220  $\mu\text{mol/L}$  v kontrolnem vzorcu 3. dan. Ker za novorojenčke druge preiskovane skupine nimamo podatkov, pri katerih novorojenčkih je bila izvedena fototerapija pred 3. dnem starosti, smo pri statistični analizi uporabili le podatke prve preiskovane skupine. Novorojenčke druge preiskovane skupine, ki so bili obsevani, bi namreč lahko napačno uvrstili v skupino s fiziološko hiperbilirubinemijo, saj so se koncentracije BIL zaradi fototerapije znižale.

Od 283 novorojenčkov jih je 197 (69,6 %) razvilo fiziološko hiperbilirubinemijo (BIL 3. dan manj od 220  $\mu\text{mol/L}$ ) s povprečno koncentracijo BIL v popkovnični krvi 32,2  $\mu\text{mol/L}$ , 86 (30,4 %) novorojenčkov pa je v prvih 3 dneh življenja razvilo patološko hiperbilirubinemijo (BIL 3. dan več 220  $\mu\text{mol/L}$ ) s povprečno koncentracijo BIL v popkovnični krvi 38,7  $\mu\text{mol/L}$ . V času hospitalizacije je 72 novorojenčkov doseglo tako visoko koncentracije BIL, da so potrebovali fototerapijo, ti pa so imeli povprečno koncentracijo BIL v popkovnični krvi 39,6  $\mu\text{mol/L}$ .

Pri 35 novorojenčih s patološko hiperbilirubinemijo smo v vzorcu krvi, odvzetem 3. dan, določili koncentracijo BIL manj kot 220  $\mu\text{mol/L}$  in smo jih kljub temu šteli med patološke, ker so že pred odvzemom kontrolnega vzorca krvi prejeli fototerapijo in se je koncentracija znižala zaradi izločitve topnih fotoizomerov.

Srednje vrednosti koncentracij BIL, standardne deviacije in izračun statističnih značilnosti za koncentracije BIL med skupino novorojenčkov s prisotno fiziološko in skupino novorojenčkov s prisotno patološko hiperbilirubinemijo so podani v **Preglednici XXII**.

**Preglednica XXII:** Koncentracije BIL  $\pm$  SD in p-vrednosti za skupine s kliničnimi značilnostmi prisotne hiperbilirubinemije

Klinične značilnosti skupine	Fiziološka hiperbilirubinemija	Patološka hiperbilirubinemija	p - vrednost
Število (n)	n = 197	n = 86	/
BIL $\pm$ SD popkovnična kri ( $\mu\text{mol/L}$ ) *	32,2 $\pm$ 6,5	38,7 $\pm$ 8,6	< 0,0005
BIL $\pm$ SD vzorec 3. dan ( $\mu\text{mol/L}$ ) **	146,4 $\pm$ 54,9	216,9 $\pm$ 39,9	< 0,0005
Transkutani BIL $\pm$ SD (mmol/L) **	154,1 $\pm$ 57,0	217,4 $\pm$ 47,2	< 0,0005

\* t-test, \*\* Mann-Whitneyev test

S t-testom in Mann-Whitneyevim testom smo ugotavljali razliko v koncentraciji BIL med skupino novorojenčkov s fiziološko in skupino novorojenčkov s patološko hiperbilirubinemijo. Med skupinama so statistično značilne razlike v koncentraciji BIL (popkovnična kri:  $p < 0,0005$ ; kontrolni vzorec krvi 3. dan:  $p < 0,0005$ , transkutani BIL:  $p < 0,0005$ ).

Zanimala nas je pogostnost pojavljanja posameznega genotipa za polimorfizma A388G in T521C ter števila kopij za haplotipe \*1a, \*1b ter \*15 pri novorojenčkih s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.



**Preglednica XXIII:** Porazdeljenost genotipov za polimorfizem A388G med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.

Skupine novorojenčkov (n)	AA	AG	GG
Fiziološka hiperbilirubinemija (197)	70 (35,5 %)	102 (51,8 %)	25 (12,7 %)
Patološka hiperbilirubinemija (86)	24 (27,9 %)	50 (58,1 %)	12 (14,0 %)
p - vrednost	0,456		

S statistično analizo (izračun  $\chi^2$ ) smo ugotovili, da ni razlik v porazdelitvi genotipov polimorfizma A388G med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo, saj je p - vrednost večja od 0,05.

**Preglednica XXIV:** Porazdeljenost genotipov za polimorfizem T521C med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.

Skupine novorojenčkov (n)	TT	TC + CC
Fiziološka hiperbilirubinemija (197)	130 (66,0 %)	67 (34,0 %)
Patološka hiperbilirubinemija (86)	56 (65,1 %)	30 (34,9 %)
p - vrednost	0,887	

Primerjava porazdelitve genotipov med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo ne kaže statistično značilne razlike ( $p = 0,887$ ).

**Preglednica XXV:** Porazdeljenost števila kopij za haplotip \*1a med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.

Skupine novorojenčkov (n)	0 kopij	1 kopija	2 kopiji
Fiziološka hiperbilirubinemija (197)	26 (13,2 %)	111 (56,3 %)	60 (30,5 %)
Patološka	13	52	21

<b>hiperbilirubinemija (86)</b>	(15,1 %)	(60,5 %)	(24,4 %)
<b>p - vrednost</b>	0,577		

**Preglednica XXVI:** Porazdeljenost števila kopij za haplotip \*1b med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.

<b>Skupine novorojenčkov (n)</b>	<b>0 kopij</b>	<b>1 kopija</b>	<b>2 kopiji</b>
<b>Fiziološka hiperbilirubinemija (197)</b>	120 (60,9 %)	68 (34,5 %)	9 (4,6 %)
<b>Patološka hiperbilirubinemija (86)</b>	47 (54,7 %)	31 (36,0 %)	8 (9,3 %)
<b>p - vrednost</b>	0,263		

**Preglednica XXVII:** Porazdeljenost števila kopij za haplotip \*15 med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo.

<b>Skupine novorojenčkov (n)</b>	<b>0 kopij</b>	<b>1 kopija</b>	<b>2 kopiji</b>
<b>Fiziološka hiperbilirubinemija (197)</b>	140 (71,1 %)	48 (24,4 %)	9 (4,6 %)
<b>Patološka hiperbilirubinemija (86)</b>	59 (68,6 %)	27 (31,4 %)	0 (0 %)
<b>p - vrednost</b>	0,078		

Izračun  $\chi^2$  za noben haplotip ni pokazal statistično značilnih razlik v porazdelitvi števila kopij med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo, kar je razvidno iz rezultatov v zgornjih preglednicah (vse p – vrednosti so višje od 0,05). Od vseh treh haplotipov je p – vrednost haplotipa \*15 še najbližje 0,05, kar je pričakovano, saj omenjeni haplotip tvorita mutirana genotipa obeh polimorfizmov (388G-521C).

#### **4.7 PRIMERJAVA REZULTATOV Z OBJAVLJENIMI ŠTUDIJAMI**

Do leta 2004 so bile odkrite številne mutacije v genu *SLCO1B1*, in sicer zamenjave nukleotidov na mestih 388, 463, 521 in 1462. Vendar povezava teh mutacij s hiperbilirubinemijo do takrat še ni bila raziskana (44).

Raziskava na 172 tajvanskih novorojenčih leta 2004 je pokazala, da pri novorojenčkih z prisotnim polimorfizmom na mestu 388 obstaja veliko tveganje za razvoj neonatalne hiperbilirubinemije. Raziskovali so le zamenjave nukleotidov na mestih 388, 463, 521 in 1462, ki so bile do takrat znane pri belcih in Japoncih. Ugotovili so, da se pri Tajvancih pojavljata le polimorfizma A388G in T521C. Povezava polimorfizma T521C z neonatalno hiperbilirubinemijo ni bila statistično značilna (44).

Watchko in sodelavci so leta 2009 ugotavljali, če se polimorfizmi genov *G-6-PD*, *UGT1A1* in *SLCO1B1* pojavljajo pogosteje pri novorojenčkih s patološko hiperbilirubinemijo. V raziskavi, v katero so vključili 452 novorojenčkov, so preučevali 18 različnih polimorfizmov gena *SLCO1B1*. Trije od teh polimorfizmov so se pojavljali pogosteje, in sicer A388G, T521C in C463A, zato so se v okviru statistične analize osredotočili nanje. Povezave med posameznimi polimorfizmi in razvojem patološke hiperbilirubinemije niso našli (45).

Wong in sodelavci so leta 2009 v študiji, v katero so vključili 175 malezijskih novorojenčkov, določili frekvence genotipov za štiri različne polimorfizme gena *SLCO1B1* in ugotavljali njihovo povezavo s hudo hiperbilirubinemijo. Študija je pokazala, da so vsi štiri preiskovani polimorfizmi pogosti med novorojenčki v Maleziji. Povezave med polimorfizmi, med drugim A388G in T521C, in hudo nekonjugirano hiperbilirubinemijo niso našli (46).

V raziskavi na 177 tajvanskih novorojenčih so leta 2009 preučevali povezavo med polimorfizmi genov *UGT1A1*, *SLCO1B1* in *GST* in neonatalno hiperbilirubinemijo ter povezavo med pomanjkanjem G-6-PD in polimorfizmi *UGT1A1* gena pri neonatalni hiperbilirubinemiji. V okviru *SLCO1B1* gena so preiskovali dva polimorfizma, in sicer zamenjavi nukleotidov na mestih 388 in 463. Polimorfizma na mestu 463 niso našli, kar potrjuje rezultate študije iz leta 2004 (Huang), kjer so prav tako preučevali tajvanske novorojenčke. Povezave med polimorfizmom A388G in neonatalno hiperbilirubinemijo, v nasprotju z študijo Huanga, niso našli (44, 47).

Zhang in sodelavci so leta 2010 na kitajski populaciji ugotavljali povezavo med polimorfizmi *OATP1B1* gena (A388G in T521C) in neonatalno hiperbilirubinemijo. Primerjali so frekvence alelov in genotipov med skupino bolnikov in kontrolno skupino. Poleg tega so med različnimi genotipi polimorfizmov A388G in T521C primerjali koncentracije celotnega BIL, Bc in Bu v serumu. Rezultati raziskave nakazujejo, da ima polimorfizem A388G opazen vpliv na koncentracije BIL v serumu pri novorojenčkih s prisotno neonatalno hiperbilirubinemijo. Ugotovili so, da bi alel 521T lahko bil možen

dejavnik tveganja za razvoj nekonjugirane hiperbilirubinemije pri novorojenčkih. Zaključili so, da je *SLCO1B1* pomemben polimorfen gen, povezan z neonatalno hiperbilirubinemijo (48).

V študiji, izvedeni leta 2011 na 155 novorojenčkih v Turčiji, so preiskovali povezavo med polimorfizmi *SLCO1B1* gena in nepojasnjeno hiperbilirubinemijo. Ugotovili so, da moški spol in dve polimorfni obliki *SLCO1B1* gena (388/411-411 A→G in 388-411 A→G) povečujeta tveganje za pojav patološke hiperbilirubinemije. Zaključili so, da je polimorfizem A388G dejavnik tveganja za pojav nepojasnjene patološke hiperbilirubinemije pri novorojenčkih (49).

Pri vseh zgoraj omenjenih raziskavah, razen pri študiji Zhanga in sodelavcev, so v okviru statistične analize primerjali porazdelitve genotipov posameznih polimorfizmov med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo (skupina bolnikov in kontrolna skupina). V raziskavi leta 2011 v Turčiji so primerjali porazdelitve genotipov med tremi skupinami (kontrolna skupina, skupina s pojasnjeno patološko hiperbilirubinemijo ter skupina z nepojasnjeno patološko hiperbilirubinemijo) (44 – 49).

V primerjavi z drugimi študijami smo mi novorojenčke izbirali bolj skrbno. Izključili smo vse novorojenčke s prisotnimi dejavniki tveganja, kot so nedonošeni novorojenčki, neskladnost krvnih skupin med mamo in otrokom, prirojena hemolitična anemija, infekcije. Poleg tega smo upoštevali podatke o fototerapiji, in sicer ali, je bila le-ta izvedena pred 3. dnem starosti novorojenčkov. Če primerjamo z drugimi raziskavami, so podatke o fototerapiji upoštevali le še pri študiji Watchka in sodelavcev (45).

Večina raziskovalcev je pri statistični analizi gledala samo frekvence preiskovancev, mi pa smo gledali tako frekvence genotipov kot tudi koncentracije BIL. Poleg tega smo povezavo med koncentracijo BIL in genotipi ovrednotili z različnimi parametri, imeli smo podatke za popkovni BIL, transkutani BIL ter BIL v vzorcu 3. dan. Slabost naše raziskave pa je, da nismo imeli podatkov o najvišjih vrednostih BIL, saj so novorojenčkom z najvišjimi vrednostmi s fototerapije koncentracijo BIL znižali že pred 3. dnem življenja. Tako smo imeli samo podatek o koncentraciji BIL 3. dan življenja, ki pa je nižja, kot je dejansko bila. V nekaterih drugih študijah so preučevali širši spekter polimorfizmov, medtem ko smo v naši študiji preučevali dva polimorfizma, A388G in T521C. Vendar smo mi za razliko od zgoraj nevedenih raziskav v statistično obravnavo poleg genotipov vključili tudi haplotipe. Poleg tega smo v našo raziskavo vključili več preiskovancev, kot so jih v večino drugih raziskav. S tem smo imeli večji in bolj reprezentativen vzorec kot ostali.

Pri primerjavi izsledkov naše raziskave z izsledki drugih raziskav naprej izključimo raziskave, v katere so bile vključeni preiskovanci drugih rasah, saj takih rezultatov ne moremo direktno primerjati med seboj. Za primerjavo rezultatov nam tako ostaneta le dve raziskavi, in sicer študija Jon F. Watchka in sodelavcev iz leta 2009 in študija iz leta 2011 v Turčiji. Jon F. Watchko in sodelavci povezave med posameznimi polimorfizmi in razvojem patološke hiperbilirubinemije niso našli, kar se sklada z isledki naše raziskave. Rezultati raziskave iz leta 2011 pa našim naspotujejo, saj so zaključili, da je polimorfizem A388G dejavnik tveganja za pojav nepojasnjene patološke hiperbilirubinemije pri novorojenčkih (45, 49).

## 5 SKLEP

V raziskavi, v katero je bilo vključenih skupno 485 novorojenčkov, smo preučevali povezavo med koncentracijami BIL pri novorojenčkih s fiziološko ali z nepojasnjeno patološko nekonjugirano hiperbilirubinemijo in polimorfizmoma A388G in T521C v genu *SLCO1B1* ter njunimi haplotipi. Naša hipoteza je bila, da prisotnost teh polimorfizmov oziroma njunih haplotipov povzroči zmanjšan privzem bilirubina v hepatocite in s tem povišane koncentracije BIL v serumu, kar bi imelo za posledico pojav nekonjugirane hiperbilirubinemije pri novorojenčkih.

Za celotno skupino preiskovancev smo določili naslednje frekvence mutiranega alela: 41,7 % za polimorfizem A388G in 20,0 % za polimorfizem T521C. Frekvence, ugotovljene v naši raziskavi, so znotraj intervala, ki so ga v različnih študijah določili za Kavkazijce nasploh (30 – 45 % za polimorfizem A388G in 15 – 20 % za polimorfizem T521).

S statistično analizo nismo dokazali vpliva polimorfizmov A388G in T521C ter njunih haplotipov \*1a, \*1b in \*15 na koncentracijo BIL v popkovnični krvi, koncentracijo BIL 3. dan starosti ter na koncentracijo transkutano merjenega BIL.

Primerjava porazdelitve genotipov in števila kopij haplotipov med skupinama novorojenčkov s fiziološko in patološko hiperbilirubinemijo za noben polimorfizem oziroma haplotip ni pokazala statistično značilne razlike.

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da povezave med polimorfizmoma A388G in T521C ter njunimi haplotipi v genu za *OATP1B1* in hiperbilirubinemijo pri novorojenčkih nismo našli. Vendar bi kljub temu bilo pri novorojenčkih smiselno izvesti genotipizacijo za omenjena polimorfizma v genu za *OATP1B1*, saj polimorfizma sama ali še pogosteje v obliki haplotipov vplivata na farmakokinetiko mnogih zdravilnih učinkovin. Genetske spremembe v genu *SLCO1B1* lahko spreminjajo posameznikov odziv na zdravilno učinkovino in genotipizacija bi pripomogla k učinkovitejšemu zdravljenju.

## 6 LITERATURA

1. Groleger K, Bratanič B, Veličković Perat M. Nekonjugirana hiperbilirubinemija pri novorojenčku. MED RAZGL, 1998; 37: 355–366
2. Kikuchi A, Park SY, Miyatake H et al. Crystal structure of rat biliverdin reductase. Nature Structural Biology, 2001 Mar; 8(3): 221-5.
3. Kaplan M, Hammerman C. Bilirubin and the Genome: The Hereditary Basis of Unconjugated Neonatal Hyperbilirubinemia. Current Pharmacogenomics, Volume 3, Number 1, 2005; 3: 21-42.
4. Johnson L. R. Encyclopedia of Gastroenterology. Volume 2-3. 1st edition. Academic Press, 17.11.2003. ISBN: 978-0-12-386860-2.
5. Košnik M. et al. Interna medicina. 4. izdaja. Ljubljana: Littera picta: Slovensko medicinsko društvo, 2011. ISBN: 978-961-6030-80-9 (Littera picta).
6. Lukač Bajalo J: Molekularne oblike bilirubina v serumu. V: Križišnik C. Urgentna pediatrija in intenzivno zdravljenje (Izbrana poglavja iz pediatrije, 4). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo 1993; 166-175.
7. Struktura bilirubina. Dostopno na: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/B/bilirubin.html>. Dostop: maj 2012.
8. McClatchey KD, Amin HM, Curry JL. Clinical laboratory medicine. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. ISBN-10: 0683307517. ISBN-13: 978-0683307511.
9. Chowdhury JR, Wolkoff AW, Chowdhury NR et al. Hereditary Jaundice and Disorders of Bilirubin Metabolism. V: Sciver CD, Beaudet AL, Sly WS, Valle d: The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II, 7<sup>th</sup> edition 1995: 2161-2192.
10. Lauer BJ, Spector ND. Hyperbilirubinemia in the newborn. Pediatr Rev, 2011 Aug; 32(8): 341-9.
11. Meisenberg G, Simmons WH. Principles of Medical Biochemistry. 3rd edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA. 2011; 463-471.
12. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6th edition. Saunders Elsevier, Missouri. 2008; 520-527.
13. Sinteza bilirubina. Dostopno na: <http://www.benbest.com/nutrceut/AntiOxidants.html>. Dostop: maj 2012.

14. Karas Kuželički N, Mencej Bedrač S, Mlinar B et al. Vaje iz klinične kemije II. Študijsko gradivo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, 2009.
15. Meise1berg G, Simmons WH. Principles of Medical Biochemistry, 2nd eds. 2006; Mosby Elsevier, Philadelphia, PA:503-510.
16. Thor WR Hansen, MD, PhD, MHA, FAAP. Neonatal Jaundice. Dostopno na: <http://emedicine.medscape.com/article/974786-overview>. Dostop: maj 2012.
17. Maimburg RD, Bech BH, Vaeth M et al. Neonatal Jaundice, Autism, and Other Disorders of Psychological Development Pediatrics. 2010 Nov; 126(5):872-8. Epub 2010 Oct 11.
18. Furlan D, Ilijaš-Trofenik A, Ostanek B et al. Patološka zlatenica donošenih novorojenčkov in Gilbertov sindrom. Zdravniški vestnik, 2011; 80: 188–93.
19. Bratinič B, Felc Z, Furlan D et al. Bilirubin v popkovnični krvi kot napovednik neonatalne hiperbilirubinemije. Zdravniški vestnik, 2010; 79: 482–7.
20. Bratanič B, Paro D: Nekonjugirana hiperbilirubinemija pri novorojencih. V: Križišnik C. Urgentna pediatrija in intenzivno zdravljenje (Izbrana poglavja iz pediatrije, 4). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo 1993; 192-201.
21. Porter ML, Dennis BL. Hyperbilirubinemia in the term newborn. Am Fam Physician. 2002 Feb 15; 65(4): 599-606.
22. Sanna S, Busonero F, Maschio A et al. Common variants in the SLCO1B3 locus are associated with BIL levels and unconjugated hyperbilirubinemia. Hum Mol Genet. 2009 Jul 15; 18(14): 2711-8.
23. Muslu N, Dogruer ZN, Eskandari G et al. Are glutathione S-transferase gene polymorphisms linked to neonatal jaundice? Eur J Pediatr. 2008 Jan; 167(1): 57-61. Epub 2007 Feb 22.
24. Abdel Ghany EA, Hussain NF, Botros SK. Glutathione s-transferase gene polymorphisms in neonatal hyperbilirubinemia. J Investig Med. 2012 Jan; 60(1): 18-22.
25. Saki F, Hemmati F, Haghghat M. Prevalence of Gilbert syndrome in parents of neonates with pathologic indirect hyperbilirubinemia. Ann Saudi Med. 2011 Mar-Apr; 31(2): 140–144.
26. Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O et al. Eur J Pediatr. 2012 Jan; 171(1): 11-5. Epub 2011 Dec 9.



27. Furlan D: Nekonjugirana bilirubinemija novorojenčkov in spremembe v genu za UDP-glukuronil transferazo 1A1. Doktorska disertacija. Ljubljana 2011.
28. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 2009 Oct; 158(3): 693-705. Epub 2009 Sep 25.
29. Svoboda M, Riha J, Wlcek K, Jaeger W et al. Organic anion transporting polypeptides: regulation of expression and function. *Curr Drug Metab.* 2011; 12(2): 139-53.
30. König J, Seithel A, Gradhand U et al. Pharmacogenomics of human OATP transporters *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006 Mar; 372(6): 432-43. Epub 2006 Mar 9.
31. Pasanen, M.: Pharmacogenetics of SLCO1B1: population genetics and effect on Statins. Academic dissertation, 2008.
32. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1: a Genetically Polymorphic Transporter of Major Importance for Hepatic Drug Uptake. *Pharmacol Rev.* 2011 Mar; 63(1): 157-81. Epub 2011 Jan 18.
33. G. You, M. Morris. Drug transporters - Molecular Characterization and Role in Drug Disposition. Wiley, 2007.
34. FlexiGene® DNA Handbook, <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=382>.
35. QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook, [http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1018831\\_HB\\_QA\\_BT\\_092001WW.pdf](http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1018831_HB_QA_BT_092001WW.pdf)
36. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual, <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>.
37. Borut Štrukelj, J.K., Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 2007, Slovensko farmacevtsko društvo: Ljubljana. p. 55-58.
38. Arko, B. Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmaceutski vestnik*, 2004, 55: 215-220.
39. Povzeto po: <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>. Dostop: maj 2012.
40. KASP version 4.0 SNP Genotyping Manual. Dostopno na: <http://www.kbioscience.co.uk/download/KASP%20SNP%20Genotyping%20Manual%20V4%200.pdf>. Dostop: 14.01.2012.
41. Oštir Mevželj D: Neinvazivno odkrivanje hiperbilirubinemije novorojenčkov. Magistrska naloga. Ljubljana 2012.
42. Hamilton MB: Population genetics. Wiley-Blackwell, 2009; 9-28.

43. Stephens M, Smith N, and Donnelly P: PHASE: software for haplotype reconstruction, and recombination rate estimation from population data, version 2.1. Seattle 2004. Dostopno na: <http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>. Dostop: december 2012.
44. Huang MJ, Kua K, Teng H et al. Risk factors for Severe hyperbilirubinemia in Neonates. *Pediatric Research*, 2004; 56, 682–689.
45. Watchko JF, Lin Z, Clark RH et al. Complex Multifactorial Nature of Significant Hyperbilirubinemia in Neonates. *Pediatrics*, 2009; 124; e868.
46. Wong FL, Boo NY, Ainoon O et al. Variants of organic anion transporter polypeptide 2 gene are not risk factors associated with severe neonatal hyperbilirubinemia. *Malays J Pathol*. 2009 Dec; 31(2): 99-104.
47. Prachukthum S, Nunnarumit P, Pienvichit P et al. Genetic polymorphisms in Thai neonates with hyperbilirubinemia. *Acta Paediatr*. 2009 Jul; 98(7): 1106-10. Epub 2009 Apr 21.
48. Zhang HX, Zhao X, Yang Z et al. [OATP 1B1 T521C/A388G is an important polymorphism gene related to neonatal hyperbilirubinemia]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2010 Sep; 48(9): 650-5.
49. Büyükkale G, Turker G, Kasap M et al. Neonatal hyperbilirubinemia and organic anion transporting polypeptide-2 gene mutations. *Am J Perinatol*. 2011 Sep; 28(8): 619-26. Epub 2011 Apr 15.