



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA DELIĆ

VPLIV POLIMORFIZMOV V GENIH ZA PRENAŠALNE PROTEINE
OATP1B1, OATP1B3, P-GP IN MRP2 NA ZDRAVLJENJE Z
RALOKSIFENOM PRI BOLNICAH Z OSTEOPOROZO

THE INFLUENCE OF OATP1B1, OATP1B3, P-GP AND MRP2 GENETIC
POLYMORPHISMS ON RALOXIFENE TREATMENT IN
OSTEOPOROTIC WOMEN

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. s Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo, kjer so določili serumske koncentracije raloksifena ter njegovih presnovkov. Meritve kostne alkalne fosfataze so opravili na Kliniki za nuklearno medicino Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani, fizikalne in ostale laboratorijske preiskave pa v Univerzitetnem Kliničnem centru v Mariboru.

Zahvala

Zahvaljujem se predvsem mentorici doc. dr. Barbari Ostanek za zaupanje, usmerjanje ter praktične in strokovne nasvete pri laboratorijskem delu, statistični obdelavi podatkov in pisanju magistrske naloge ter somentorju asist. dr. Juriju Trontlju za izkazano strokovno pomoč in nasvete pri opravljanju magistrske naloge.

Iztoku, staršem, Teu in prijateljem se zahvaljujem za nesebično podporo v času študija.

Zahvala tudi vsem ostalim, ki ste mi svetovali in pomagali pri znanstveno raziskovalnem delu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Katja Delić

Ljubljana, 2012

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
1. UVOD	1
1.1 Kostí	1
1.2 Osteoporoza	3
1.2.1 Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze	3
1.2.2 Diagnostika in spremljanje zdravljenja osteoporoze	4
1.2.2.1 Merjenje mineralne kostne gostote	4
1.2.2.2 Biokemični označevalci kostne premene (BOKP)	5
1.2.3 Zdravljenje osteoporoze	6
1.3 Raloksifen	8
1.3.1 Učinki raloksifena	9
1.3.2 Farmakokinetika raloksifena	10
1.4 Prenašalni proteini	11
1.4.1 P-glikoprotein (P-gp)	13
1.4.2 Prenašalni protein MRP2 («multidrug resistance-associated protein»)	14
1.4.3 Prenašalna proteina OATP1B1 in OATP1B3 («organic anion transporting polypeptide»)	15
1.5 Polimorfizmi v genih za prenašalne proteine	16
1.5.1 Polimorfizmi v genu za P-gp (<i>ABCB1</i>)	16
1.5.2 Polimorfizmi v genu za MRP2 (<i>ABCC2</i>)	18
1.5.3 Polimorfizmi v genu za OATP1B1 (<i>SLCO1B1</i>)	19
1.5.4 Polimorfizmi v genu za OATP1B3 (<i>SLCO1B3</i>)	21
2. NAMEN DELA	22
3. PREISKOVANKE, MATERIALI IN METODE	23
3.1 Preiskovanje	23
3.2 Določanje serumskih koncentracij raloksifena in njegovih presnovkov	23
3.3 Določanje farmakodinamskih parametrov	23
3.4 Določanje koncentracij osnovnih in priprava razredčenih raztopin vzorčnih DNA	25
3.5 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	25
3.5.1 Genotipizacija polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i> , 3435C>T v genu <i>ABCB1</i> , 3972C>T v genu <i>ABCC2</i> in C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i>	26

3.6 Statistična analiza.....	28
3.7 Materiali	29
4. REZULTATI.....	30
4.1 Določitev genotipov in njihovih pogostnosti	30
4.2 Analiza haplotipov za polimorfizma 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i>	31
4.3 Povezanost polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i> in njihovih haplotipov ter polimorfizmov 3435C>T v genu <i>ABCB1</i> , 3972C>T v genu <i>ABCC2</i> in C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i> s serumskimi koncentracijami raloksifena in njegovih presnovkov	32
4.3.1 Povezanost polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i> in njihovih haplotipov s serumskimi koncentracijami raloksifena in njegovih presnovkov	32
4.3.2 Povezanost polimorfizmov 3435C>T v genu <i>ABCB1</i> , 3972C>T v genu <i>ABCC2</i> in C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i> s serumskimi koncentracijami raloksifena in njegovih presnovkov 37	
4.4 Povezanost polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i> in njihovih haplotipov ter polimorfizmov 3435C>T v genu <i>ABCB1</i> , 3972C>T v genu <i>ABCC2</i> in C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i> s farmakodinamskimi parametri.....	38
4.4.1 Vpliv polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i> in njihovih haplotipov na BOKP, MKG in vrednosti UZ-parametrov	39
4.4.2 Vpliv polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i> in njihovih haplotipov na dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja	48
4.4.3 Povezanost polimorfizma 3435C>T v genu <i>ABCB1</i> s farmakodinamskimi parametri.....	57
4.4.4 Povezanost polimorfizma 3972C>T v genu <i>ABCC2</i> s farmakodinamskimi parametri.....	61
4.4.5 Povezanost polimorfizma C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i> s farmakodinamskimi parametri	65
5. RAZPRAVA	69
5.1 Vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na serumske koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov	69
5.2 Vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na farmakodinamske parametre	71
5.2.1 Vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na MKG, UZ-parametre in BOKP pred zdravljenjem z raloksifenom in po njem	72
5.2.2 Vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja pred zdravljenjem z raloksifenom in po njem.....	75
6. SKLEP.....	78
7. LITERATURA IN VIRI	81
8. PRILOGE.....	93

POVZETEK

Raloksifen, ki se uporablja za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze pri ženskah v pomenopavzi, zmanjša število in aktivnost osteoklastov ter posledično zveča mineralno kostno gostoto (MKG) hrbtenice in vratu stegenice ter zmanjša tveganje za zlome vretenc. Poleg tega zniža koncentracije biokemičnih označevalcev kostne premene (BOKP), ne zveča pa tveganja za akutne srčno-žilne dogodke. Na farmakokinetiko raloksifena lahko, poleg presnovnih encimov, vplivajo tudi prenašalni proteini. Naše predhodne študije *in vitro* in nekatere druge raziskave so pokazale, da so raloksifen in njegovi presnovki lahko substrati prenašalnih proteinov P-gp, MRP2, OATP1B1 in OATP1B3, zato smo se odločili raziskati, ali obstaja povezava med genotipi teh prenašalnih proteinov in farmakokinetiko ter farmakodinamiko raloksifena.

Genotipizacijo vzorcev, odvzetih 63 pacientkam s pomenopavzno osteoporozo na terapiji z raloksifenom, smo izvedli z uporabo hidrolizirajočih sond. Serumske koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov so določili na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo, farmakodinamske parametre pa v Univerzitetnih Kliničnih centrih v Ljubljani in Mariboru.

Statistična analiza naših rezultatov je pokazala statistično značilen vpliv polimorfizma 388A>G v genu za OATP1B1 na koncentracije raloksifena, raloksifen-6,4'-diglukuronida (M3) ter na seštevek molarne koncentracij vseh raloksifenovih zvrsti (TRHP). Koncentracije raloksifena in omenjenih presnovkov so bile statistično značilno višje pri nosilkah genotipa GG, v primerjavi s tistimi z genotipoma AG in AA. Ta isti polimorfizem je statistično značilno vplival tudi na spremembo MKG vratu stegenice in koncentracij trigliceridov po zdravljenju z raloksifenom. MKG vratu stegenice se je zvišala le pri nosilkah genotipa AG polimorfizma 388A>G v genu za OATP1B1. Pri isti genotipski podskupini so se koncentracije trigliceridov po terapiji znižale. Genotipi polimorfizma 521T>C v genu *SLCO1B1* so značilno vplivali na spremembo vrednosti kvantitativnega ultrazvočnega indeksa (QUI) po zdravljenju z raloksifenom. Vrednosti tega parametra so se zvišale le pri nemutiranih homozigotih. Ugotovili smo, da haplotipa *1b (388A>G) in *1a (referenčni haplotip) statistično značilno vplivata na koncentracije raloksifena ter presnovkov M3 in TRHP. Najvišje vrednosti raloksifena, M3 in TRHP so imele preiskovanke z dvema kopijama haplotipa *1b. Prav tako so bile, v skladu z našimi pričakovanji, koncentracije raloksifena in omenjenih presnovkov najvišje pri

preiskovankah, ki nimajo nobene kopije haplotipa *1a. Ob prisotnosti haplotipa *1b so se koncentracije C-terminalnega telopeptida kolagena tipa I (CTX) značilno znižale po zdravljenju z raloksifenom. Največje znižanje koncentracij CTX smo ugotovili pri posameznicah z dvema kopijama tega haplotipa. Vrednosti parametra QUI in hitrosti širjenja ultrazvočnega signala (SOS) so se po zdravljenju z raloksifenom značilno zvišale pri preiskovankah, ki nimajo nobene kopije haplotipa *15 (388A>G in 521T>C). Povezanost smo dokazali tudi v primeru polimorfizma 3435C>T v genu *ABCB1* in spremembe MKG celotnega kolka ter vrednosti parametra QUI po zdravljenju z raloksifenom. Prirastek je bil v obeh primerih značilno večji pri polimorfni homozigotih polimorfizma 3435C>T v genu *ABCB1*. Polimorfizem 3435C>T v genu *ABCB1* je značilno vplival tudi na endotelijsko neodvisno vazodilatacijo (END), kjer smo pri nosilkah genotipov CC in CT ugotovili statistično značilno zvišanje vrednosti END po zdravljenju z raloksifenom. Polimorfizem 3972C>T v genu *ABCC2* je značilno vplival na spremembo celotnega in LDL-holesterola ter endotelijsko odvisne vazodilatacije (EOD). Koncentracije celotnega in LDL-holesterola so se pri nosilkah genotipov CC in TT polimorfizma 3972C>T v genu *ABCC2* znižale, EOD pa se je pri nosilkah genotipov CT in TT omenjenega polimorfizma značilno zvečala. Polimorfizem C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* je statistično značilno vplival na spremembo koncentracij osteokalcina (OC) po 12 mesecih zdravljenja. Znižanje OC je bilo pri nosilkah genotipa ne-CC statistično značilno večje kot pri preiskovankah z genotipom CC polimorfizma C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*.

Naši rezultati kažejo, da lahko del interindividualne variabilnosti koncentracij raloksifena in njegovih presnovkov pojasnimo z vplivom polimorfizma 388A>G v genu *SLCO1B1*.

Del interindividualne variabilnosti tako kostnih farmakodinamskih parametrov kot dejavnikov tveganja za bolezni srca in ožilja po zdravljenju z raloksifenom lahko pojasnimo z vplivom proučevanih polimorfizmov v genih *SLCO1B1* in *ABCB1*. Polimorfizmi v genih *SLCO1B3* in *ABCC2* pa lahko bolj ciljano vplivajo na učinek raloksifena. Tako lahko proučevani polimorfizem v genu *SLCO1B3* prispeva k interindividualni variabilnosti kostnih farmakodinamskih parametrov, medtem ko lahko proučevani polimorfizem v genu *ABCC2* prispeva k interindividualni variabilnosti dejavnikov tveganja za bolezni srca in ožilja po zdravljenju z raloksifenom.

ABSTRACT

Raloxifene has been approved for the treatment and prevention of postmenopausal osteoporosis. It reduces the number and activity of osteoclasts, increases the bone mineral density (BMD) of the lumbar spine and femoral neck, and reduces the risk for vertebral fractures. Raloxifene also decreases biochemical markers of bone turnover and does not increase the risk for acute cardiovascular disease. In addition to metabolic enzymes, the pharmacokinetics of raloxifene may also be affected by transport proteins. Our *in vitro* results, as well as other studies, showed that raloxifene and its metabolites may be substrates for the P-gp, MRP2, OATP1B1 and OATP1B3 transport proteins. Therefore, we decided to determine the relationship between the genetic variants of these transport proteins and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of raloxifene.

Genotyping of DNA samples from 63 postmenopausal female patients with osteoporosis on raloxifene therapy was performed by polymerase chain reaction (PCR) with a hydrolysable probe. Serum concentrations of raloxifene species were determined on the Chair of Biopharmacy and Pharmacokinetics on Faculty of Pharmacy and pharmacodynamic parameters were determined in University Medical Centres in Ljubljana and Maribor using the same samples.

Statistical analysis of our results showed a strong influence of *SLCO1B1* c.388A>G polymorphism on the concentrations of raloxifene, raloxifene-6,4'- diglucuronide (M3) and total raloxifene in hydrolyzed plasma (TRHP). Concentrations of raloxifene and these metabolites were significantly higher in patients with a GG genotype when compared to those with the AG and AA genotypes. Statistically significant associations of *SLCO1B1* c.388A>G polymorphism with BMD of the femoral neck and triglyceride concentrations were observed after raloxifene therapy. The BMD of the femoral neck was significantly increased only in patients with the AG genotype, whereas triglyceride concentrations decreased in patients with this genotype. Statistical significance was observed between *SLCO1B1* c.521T>C polymorphism and the quantitative ultrasound index (QUI) after raloxifene treatment. Parameter QUI significantly increased in wild-type individuals. We also observed that the concentrations of raloxifene, M3 and TRHP significantly differed between patients with one copy, two copies and no copies of the *1b (c.388A>G) and *1a (reference haplotype) haplotypes. Concentrations of raloxifene and its metabolites were significantly higher in patients with two copies of the *1b haplotype and in patients with

no copies of the *1a haplotype. The presence of the *1b haplotype significantly decreased C-terminal telopeptides type I collagen (CTX) concentrations after raloxifene therapy. The largest decrease of CTX was observed in individuals with two copies of the *1b haplotype. A significant increase in parameter QUI and the speed of sound (SOS) after therapy was observed in patients with no copies of the *15 haplotype (c.388A>G and c.521T>C). Statistically significant associations of *ABCB1* c.3435C>T polymorphism with BMD of the hip, parameter QUI and endothelium-independent vasodilation were observed after raloxifene therapy. The BMD of the hip and the QUI parameter significantly increased in patients with TT genotype of the *ABCB1* c.3435C>T polymorphism. Endothelium-independent vasodilation significantly increased in individuals with CC and CT genotypes after raloxifene therapy. Concentrations of total and LDL cholesterol and the endothelium-dependent vasodilation differed significantly between the genotypes of the *ABCC2* c.3972C>T polymorphism after raloxifene therapy. Concentrations of total and LDL cholesterol significantly decreased in patients with the CC and TT genotypes, whereas endothelium-dependent vasodilation significantly increased in individuals with the CT and TT genotypes. Statistical significance was observed between *SLCO1B3* int7C>G polymorphism and osteocalcin (OC) concentrations after raloxifene treatment. Decrease in OC concentration was significantly higher in patients with non-CC genotypes than in those with the CC genotype of the *SLCO1B3* int7C>G polymorphism.

Our results suggest that *SLCO1B1* c.388A>G polymorphism could contribute to the inter-individual variability in concentrations of raloxifene and its metabolites.

The presented data implicate that at least a part of inter-individual variability in pharmacodynamic parameters could be explained by genetic influence of polymorphisms in the *SLCO1B1* and *ABCB1* genes after raloxifene therapy. Effect of the studied polymorphism in the *SLCO1B3* gene was more specific and could contribute to the inter-individual variability in bone pharmacodynamic parameters only, while studied polymorphism in *ABCC2* gene could contribute to the inter-individual variability in risk factors for cardiovascular disease after raloxifene therapy.

SEZNAM OKRAJŠAV

<i>ABCB1</i>	gen za P-glikoprotein	M3	raloksifen-6,4'-diglukuronid
<i>ABCC2</i>	gen za protein povezan z odpornostjo proti več učinkovinam	MKG	mineralna kostna gostota
ALP	alkalna fosfataza	MRP	protein, povezan z odpornostjo proti več učinkovinam (angl. multidrug resistance-associated protein)
ANOVA	analiza variance	OATP	organski anionski prenašalni proteini
ATP	adenozin trifosfat	OC	osteokalcin
AUC	površina pod krivuljo	OPG	osteoprotegerin
BALP	kostna alkalna fosfataza	PCR	verižna reakcija s polimerazo
BOKP	biokemični označevalci kostne premene	P-gp	P-glikoprotein
BUA	širokopasovno slabenje ultrazvočnega signala (angl. broadband ultrasound attenuation)	QUI	kvantitativni ultrazvočni indeks (angl. quantitative ultrasound index)
CRP	C-reaktivni protein	QUS	kvantitativni ultrazvok
CTX	C-terminalni telopeptid kolagena tipa I	RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B (angl. receptor activator of nuclear factor-kappaB)
dIM	debelina intime medije	RANKL	receptorski ligand za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B (ang. receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand)
DNA	deoksiribonukleinska kislina	SERM	selektivni modulator estrogenskih receptorjev
DXA	dvožarkovna rentgenska absorpciometrija	<i>SLCO</i>	gen za organski anionski prenašalni protein
END	endotelijsko neodvisna vazodilatacija	SOS	hitrost širjenja ultrazvočnega signala (angl. speed of sound)
EOD	endotelijsko odvisna vazodilatacija	TRHP	seštevek molarnih koncentracij vseh raloksifenovih zvrsti (angl. total raloxifene in hydrolyzed plasma)
ER	estrogenski receptor	UGT	uridindifosfoglukuronozil-transferaza
HNZ	hormonsko nadomestno zdravljenje	UZ-parameter	ultrazvočni parameter
ICAM-1	medcelična adhezijska molekula 1 (angl. intercellular adhesion molecule 1)	VCAM-1	žilna celična adhezijska molekula 1 (angl. vascular cell adhesion molecule 1)
M1	raloksifen-6-glukuronid	vWf	von Willebrandov faktor
M2	raloksifen-4'-glukuronid		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Substrati in inhibitorji prenašalnih proteinov P-gp, MRP2, OATP1B1 in OATP1B3	12
Preglednica 2: Reagenti Taqman® za polimorfizme 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i> , 3435C>T v genu <i>ABCB1</i> , 3972C>T v genu <i>ABCC2</i> , C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i>	26
Preglednica 3: Sestava reakcijske zmesi enega vzorca za reakcijo PCR	27
Preglednica 4: Pogoji za izvedbo reakcije PCR s Taqman® sondami	28
Preglednica 5: Število in frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizme 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i> , 3435C>T v genu <i>ABCB1</i> , 3972C>T v genu <i>ABCC2</i> in C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i>	30
Preglednica 6: Napovedani haplotipi in njihove frekvence.....	31
Preglednica 7: Frekvence napovedanih diplotipov	32
Preglednica 8: Koncentracije raloksifena (povprečje (SD)) in njegovih presnovkov po 12 mesecih zdravljenja v odvisnosti od genotipov polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu <i>SLCO1B1</i>	33
Preglednica 9: Koncentracije raloksifena (povprečje (SD)) in njegovih presnovkov po 12 mesecih zdravljenja v odvisnosti od haplotipov *1b, *15 in *1a.....	35
Preglednica 10: Koncentracije raloksifena (povprečje (SD)) in njegovih presnovkov po 12 mesecih zdravljenja v odvisnosti od genotipov polimorfizmov 3435C>T v genu <i>ABCB1</i> , 3972C>T v genu <i>ABCC2</i> in C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i>	37
Preglednica 11: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.	39
Preglednica 12: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C.....	41
Preglednica 13: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *1b.....	42
Preglednica 14: Vrednosti BOKP in MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *15.....	44
Preglednica 15: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *1a.	46
Preglednica 16: Koncentracije krvnih maščob (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež krvnih maščob (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.....	49
Preglednica 17: Vrednosti celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja	

(povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po 6 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.	49
Preglednica 18: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C.....	51
Preglednica 19: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *1b.....	53
Preglednica 20: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *15.....	54
Preglednica 21: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *1a.....	55
Preglednica 22: Vrednosti BOKP in MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP in MKG (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.....	57
Preglednica 23: Vrednosti UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom ter delež vrednosti UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremenijo v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.....	58
Preglednica 24: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.....	60
Preglednica 25: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3972C>T.....	62
Preglednica 26: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3972C>T.....	63
Preglednica 27: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i>	66
Preglednica 28: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i>	67

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula raloksifena	9
Slika 2: Zgradba P-gp.....	13
Slika 3: Zgradba prenašalnega protein.....	14
Slika 4: Porazdeljevanje serumskih koncentracij raloksifena glede na genotip polimorfizma 388A>G v genu <i>SLCO1B1</i>	33
Slika 5: Porazdeljevanje serumskih koncentracij M3 in TRHP glede na genotip polimorfizma 388A>G v genu <i>SLCO1B1</i>	34
Slika 6: Porazdeljevanje serumskih koncentracij raloksifena glede na število kopij haplotipa *1b.	36
Slika 7: Porazdeljevanje serumskih koncentracij M3 in TRHP glede na število kopij haplotipa *1b.	36
Slika 8: Porazdeljevanje serumskih koncentracij raloksifena glede na število kopij haplotipa *1a.	36
Slika 9: Porazdeljevanje serumskih koncentracij M3 in TRHP glede na število kopij haplotipa *1a.	37
Slika 10: Delež MKG vratu stegenice, ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.	40
Slika 11: MKG ledvene hrbtenice pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C.....	42
Slika 12: Delež parametra QUI, ki se, po zdravljenju z raloksifenom, spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C.....	42
Slika 13: Delež koncentracij CTX, ki se med zdravljenjem z raloksifenom spremenijo v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1b.	44
Slika 14: MKG ledvene hrbtenice pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od števila kopij haplotipa *15.....	45
Slika 15: Delež parametrov SOS in QUI, ki se med zdravljenjem z raloksifenom spremenijo v odvisnosti od števila kopij haplotipa *15.....	46
Slika 16: MKG ledvene hrbtenice pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1a.	48
Slika 17: Delež MKG vratu stegenice, ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1a.....	48
Slika 18: Delež koncentracije trigliceridov, ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.....	50
Slika 19: Koncentracije ICAM-1 pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.....	51
Slika 20: dIM pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.	51
Slika 21: dIM pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1b.	54
Slika 22: Koncentracije ICAM-1 pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1a.	57
Slika 23: Delež MKG celotnega kolka, ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.....	58
Slika 24: Delež parametra QUI, ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni, v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.....	59
Slika 25: Koncentracije LDL-holesterola pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.....	61
Slika 26: Delež END, ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.....	61
Slika 27: Delež koncentracij celotnega in LDL-holesterola, ki se po zdravljenju z raloksifenom spremenijo v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3972C>T.....	65
Slika 28: Delež EOD, ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3972C>T.....	65
Slika 29: Delež osteokalcina (OC), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma C>G v intronu 7.....	67

1. UVOD

1.1 Kostni

Kosti so sestavljene iz kortikalnega ali kompaktnega dela, ki se nahaja v diafizah dolgih kosti in subperiostalno, in trabekularnega ali spongioznega dela, ki je sestavni del ploščatih kosti, vretenc in epifiz dolgih kosti. Trabekularne kostnine je manj, vendar je površina tega dela kosti večja od površine kortikalnega, kar je pomembno, saj se presnovni procesi odvijajo samo na površini kosti. Biokemično je kost sestavljena iz organskih in anorganskih sestavin. Anorganski del kosti, ki predstavlja večji del kostne mase (65 % kostne mase), sestavljajo pretežno kalcij in fosfati. Kalcij je v kosteh vezan kot kalcijev fosfat, ki pa se pojavlja v dveh oblikah: kot amorfni kalcijev fosfat in v kristalih hidroksiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Organske sestavine predstavljajo 35 % kostne mase. Prisotne so v obliki beljakovin, mukopolisaharidov in kostnih celic. Kolagen tipa I predstavlja 90 % vseh beljakovin, kolageni tipa V, VI, VIII in XII pa so prisotni le v manjših količinah (1, 2). Osteokalcin in osteonektin predstavljata 40 % do 50 % nekolagenskih proteinov kosti in sta pomembna za mineralizacijo osteoida (1, 3). Med kostne celice uvrščamo osteoblaste, osteoklaste, osteocite in mirujoče osteoblaste. Osteoblasti, osteociti in mirujoči osteoblasti nastanejo iz mezenhimskih matičnih celic, medtem ko osteoklasti izvirajo iz hematopoetičnih matičnih celic. Razlikujejo se tudi glede na lokacijo. Osteoblasti, osteoklasti in mirujoči osteoblasti se nahajajo na površini kosti, osteociti pa v njeni notranjosti (2).

Kostna premena

Kost se vse življenje gradi in razgrajuje. Ta proces nastajanja in razgradnje kosti, ki poteka v več stopnjah, imenujemo kostna premena. V stopnji aktivacije se neaktivni ploščati osteoblasti razmaknejo in razgali se kostna površina, ki v naslednji stopnji privabi osteoklaste. Osteoklasti v stopnji resorpcije izdolbejo Howshipovo lakuno, nakar se v naslednji stopnji preobrta odmaknejo, dno votline pa očistijo enojedrni fagociti in ga obložijo s cementno plastjo. Sledi stopnja pridobivanja osteoblastov in tvorbe osteoida, ki izpolni Howshipovo lakuno in se postopoma mineralizira. V stopnji mirovanja površino novonastale kosti prekrijejo neaktivni osteoblasti (1). V enem letu se obnovi približno 10

% celotnega skeleta. Trabekularna kostnina je pogosteje podvržena kostni premeni, zato jo tudi presnovne bolezni kosti, kot je osteoporoza, pogosteje prizadenejo (4).

Uravnavanje kostne premene

Na kostno premeno lahko vplivajo številni lokalni in sistemski dejavniki. Med najpomembnejše mehanizme za lokalno uravnavanje kostne premene sodi sistem RANK (receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B)/RANKL (receptorski ligand za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B)/OPG (osteoprotegerin). Celice osteoblastne vrste izražajo tako membransko vezano kot tudi topno obliko RANKL ter osteoprotegerin. RANKL in OPG imata ravno nasprotna učinka na kostno tkivo. RANKL prispeva h kostni resorpciji in zmanjšanju kostne mase, medtem ko OPG, nasprotno, nevtralizira učinke RANKL ter tako zmanjša kostno resorpcijo (5). RANKL deluje tako, da se veže na receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANK) na površini predhodnikov osteoklastov. Ob prisotnosti makrofagno kolonijo stimulirajočega dejavnika (M-CSF), ki se veže na receptor c-Fms predhodnikov osteoklastov, RANKL omogoča diferenciacijo osteoklastov, njihovo zlitje do večjedrnih celic, aktivacijo in preživetje zrelih osteoklastov (6). Sistem RANK/RANKL je torej odgovoren za osteoklastogenezo (7). OPG z vezavo na katerokoli obliko RANKL nevtralizira vse njegove biološke učinke, saj prepreči njegovo vezavo na receptor RANK. OPG tako inhibira proliferacijo, diferenciacijo, preživetje in zlitje predhodnikov osteoklastov. Zavira aktivacijo zrelih osteoklastov in pospešuje njihovo apoptozo (8).

Na kostno premeno lahko poleg omenjenega sistema RANK/RANKL/OPG vplivajo še številni drugi lokalni in sistemski dejavniki. Med lokalne dejavnike sodijo interleukini-1, 6, 10 in 11 (IL-1, 6, 10, 11), prostaglandini in dejavnik tumorske nekroze α (TNF α), ki spodbujajo kostno resorpcijo, ter transformirajoči rastni dejavnik β , trombocitni rastni dejavnik (PDGF) in fibroblastni rastni dejavniki (FGFs), ki pospešujejo tvorbo kosti. Tudi sistemske dejavnike lahko razdelimo na tiste, ki prispevajo k tvorbi kosti, in tiste, ki spodbujajo kostno resorpcijo. Kalcitonin, kalcitriol, estrogeni, androgeni hormoni, rastni hormon in inzulin na različne načine spodbujajo nastajanje nove kosti, medtem ko imajo glukokortikoidi in vitamin D₃ tako spodbujevalni kot zaviralni učinek na kostne celice (1, 2, 9, 10, 11, 12).

1.2 Osteoporoza

Izraz osteoporoza se je v medicinskem izrazoslovju prvič pojavil v 19. stoletju v Franciji in Nemčiji in histološko opisuje postarano človeško kost, s poudarkom na poroznem kostnem tkivu (13). Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, za katero sta značilni zmanjšana količina kostne mase in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva, kar vodi do povečane lomljivosti kosti. O osteoporozi govorimo, kadar se mineralna kostna gostota (MKG) zmanjša za 2,5 ali več standardnih deviacij od povprečne kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso. Ločimo dve veliki skupini osteoporoze: primarno in sekundarno. Primarna je bolj pogosta in se pojavi največkrat po menopavzi oz. v starosti (1). Sekundarna osteoporoza pa se lahko razvije kot posledica različnih bolezni oziroma delovanja toksičnih dejavnikov (14).

Osteoporoza predstavlja enega od pomembnih zdravstvenih problemov, saj se starost prebivalstva zvišuje (14). Raziskovalci ocenjujejo, da je trenutno v svetu več kot 200 milijonov ljudi z osteoporozo. 30 % vseh pomenopavznih žensk v ZDA in Evropi ima osteoporozo. 40 % teh žensk naj bi utrpelo vsaj en zlom zaradi osteoporoze (15). Prevalenca osteoporoze v Sloveniji je pri ženskah nad 50. letom 27,5 %, pri moških nad 60. letom pa 14,6 %. S starostjo se ta delež še povečuje in je pri ženskah nad 65. letom 40,6 %, pri moških nad 65. letom pa 16,7 % (14).

1.2.1 Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze

Na razvoj osteoporoze lahko vplivajo različni genetski dejavniki in dejavniki okolja ter njihove interakcije. Med najpomembnejše spadajo spol, starost, način življenja, prehrana, določena zdravila in genetski dejavniki. Osteoporoza prizadene zlasti ženske po menopavzi. Način življenja, predvsem kajenje, telesna neaktivnost ali čezmerna telesna aktivnost ter prehrana, revna s kalcijem, čezmerno uživanje alkohola, pretirano pitje kave in določena zdravila, kot so kortikosteroidi, lahko prispevajo k razvoju osteoporoze (14).

Genetski dejavniki

Študije dvojčkov in družin so pokazale, da imajo genetski dejavniki pomembno vlogo pri uravnavanju mineralne kostne gostote in drugih dejavnikov tveganja za osteoporotični zlom, kot so ultrazvočne lastnosti kosti, kostna geometrija in kostna premena (16, 17, 18). Osteoporoza je poligenška bolezen, saj je za njen razvoj odgovornih več različnih genov. Pristopi za odkrivanje vpletenih genov vključujejo asociacijske študije kandidatnih genov, GWAs ali vsegenomske študije (ang. Genome Wide Association studies) ter študije vezanega dedovanja na ljudeh in živalih. Do sedaj so proučevali že številne vpletene gene. Med bolj pogostimi so gen za: OPG, RANK, RANKL, receptor za vitamin D (VDR), estrogenski receptor (ER), kolagen tipa I alfa 1 (COL1A1), transformirajoči rastni faktor beta, interleukin-1 in 6 (IL-1 in 6), kostni morfogeni protein, sklerostin, LRP-5 (ang. lipoprotein receptor-related protein) itd. (14, 18, 19, 20). OPG prepreči vezavo proteina RANKL na receptor RANK ter tako zavira kostno resorpcijo. Iz tega lahko sklepamo, da je tudi gen za OPG lahko pomemben kandidatni gen za osteoporozo. Ugotovili so, da polimorfizma 245T>G in 1181G>C ter haplotip CT v genu za OPG značilno vplivajo na MKG ledvene hrbtenice (19). Odkrili so tudi značilno povezavo med polimorfizmom v genu za RANK in MKG ledvene hrbtenice, kolka in vratu stegenice pri pomenopavznih ženskah. Interakcije med geni RANK/RANKL in RANK/OPG so prav tako vplivale na MKG pomenopavznih preiskovank (20). V trenutno največji vsegenomski študiji so raziskovalci iskali genetske označevalce, povezane z MKG. Identificirali so 56 genetskih lokusov, od tega 32 novih, ki so povezani z MKG in razvojem osteoporoze (21).

1.2.2 Diagnostika in spremljanje zdravljenja osteoporoze

1.2.2.1 Merjenje mineralne kostne gostote

Za oceno mineralne kostne gostote je na voljo več različnih tehnik. Najbolj so razširjene tehnike rentgenske absorpciometrije, saj je absorpcija rentgenskih žarkov zelo občutljiva na vsebnost kalcija v tkivih (22). Diagnozo osteoporoze je možno postaviti na osnovi merjenja mineralne kostne gostote (MKG) z dvožarkovno rentgensko absorpciometrijo (DXA) ali na osnovi že dokazanih osteoporotičnih zlomov (23). Meritve DXA se izvajajo

na ledvenem delu hrbtenice in na kolku. Namen teh meritev je postavitve diagnoze osteoporoze, ocena tveganja bolnika za osteoporotični zlom in spremljanje njegovega odziva na zdravljenje (24). Druge tehnike za oceno MKG so kvantitativni ultrazvok (QUS), kvantitativna računalniška tomografija (QCT), ki se uporablja tako za meritve hrbtenice kot tudi kolka in apendikularnega skeleta, periferna DXA in številne radiografske preiskave (22).

1.2.2.2 Biokemični označevalci kostne premene (BOKP)

Z določevanjem biokemičnih označevalcev lahko ocenimo intenzivnost kostne premene ter tako lažje odkrijemo posameznike, ki hitro izgubljajo kostno maso in imajo zvečano tveganje za zlom kosti. BOKP so še posebej pomembni pri zgodnjem potrjevanju uspešnosti terapije. Z meritvami MKG lahko namreč ugotovimo, kakšna je uspešnost predpisane terapije šele po enem letu, medtem ko biokemični označevalci pokažejo uspešnost terapije že po treh mesecih. Osnovni slabosti BOKP sta velika variabilnost med osebki ter relativna nespecifičnost. Največkrat jih delimo na označevalce tvorbe in označevalce razgradnje kostne mase (25).

V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na koncentracije alkalne fosfataze (ALP), kostne alkalne fosfataze (BALP) in osteokalcina (OC), kot označevalcev tvorbe kosti, ter C-terminalnega telopeptida kolagena tipa I (CTX), kot predstavnika označevalcev resorpcije kosti. Pri odraslih z normalno jetrno funkcijo približno 50 % ALP izhaja iz jeter, preostalih 50 % pa iz kosti. OC je specifičen kazalec funkcije osteoblastov, saj njegove serumske koncentracije korelirajo s tvorbo kosti (26). Večji del sintetiziranega proteina se takoj po sprostitvi iz osteoblastov vgradi v zunajcelični kostni matriks, kjer predstavlja približno 15 % nekolagenskih proteinov. Manjši delež se sprosti v krvni obtok, kjer ga lahko določamo z imunskimi testi (27). CTX, ki se sprosti med kostno resorpcijo in razgradnjo kolagena s katepsinom K, obstaja v naravni α - in izomerni β -obliki in obe sta lahko podvrženi racemizaciji (28).

Mednarodno združenje za osteoporozo (IOF) in Mednarodna zveza klinične kemije in laboratorijske medicine (IFCC) priporočata uvedbo in uporabo referenčnega označevalca kostne premene. V ta namen priporočata uporabo enega označevalca tvorbe kosti (N-terminalni propeptid prokolagena I ali PINP) in enega označevalca kostne resorpcije (CTX) (29).

1.2.3 Zdravljenje osteoporoze

Cilj zdravljenja osteoporoze je preprečevanje zlomov. V ta namen lahko uporabljamo bodisi antiresorptivno, anabolno ali kombinirano terapijo, ter zdravljenje s kalcijem, vitaminom D in analogi vitamina D. V skupino antiresorptivnih zdravil sodijo: hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ; na voljo so različni pripravki, ki lahko vsebujejo samo estrogene ali samo progestagene ali pa kombinacijo obojih), bisfosfonati (alendronat, risedronat, ibandronat), selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM; raloksifen, bazedoksifen, lasofoksifen, arzoksifen), kalcitonin in denosumab. Med anabolna zdravila sodijo parathormon in monoklonska protitelesa proti sklerostinu, katerih anabolno delovanje še proučujejo (7, 30, 31). Anabolna zdravila omogočajo večje zvečanje kostne mase kot antiresorptivna ter izboljšajo kakovost in trdnost kosti (32). Stroncijev ranelat je novejšo inovativno zdravilo za zdravljenje osteoporoze. Predstavlja kombinirano terapijo, saj stimulira tvorbo nove kosti, hkrati pa zavira kostno resorpcijo. Obravnava osteoporotične bolnice vključuje tudi popravljanje prehranskih pomanjkljivosti. Dodatek vitamina D in kalcija predstavlja obvezno komponento pri zdravljenju osteoporoze (7).

Bisfosfonati so zdravila, ki se najpogosteje uporabljajo za zdravljenje pomenopavzne osteoporoze. Imajo visoko afiniteto za hidroksiapatit, zmanjšajo število in aktivnost osteoklastov ter tako močno zavirajo resorpcijo kosti. Biološka uporabnost bisfosfonatov je nizka, od 1 % do 3 %. Dodatno jo lahko še poslabšajo hrana, kalcij, železo, kava, čaj in pomarančni sok. Razpolovni čas bisfosfonatov v kosteh je več let (33). Za zdravljenje osteoporoze najpogosteje uporabljamo alendronat, risedronat in ibandronat. Alendronat in risedronat približno za polovico zmanjšata tveganje za nov zlom vretenca in nevretenčni zlom, vključno z zlomom kolka. Pri bolnicah s pomenopavzno osteoporozo in zlomom vretenca ibandronat zmanjša tveganje za nov zlom za 50 do 60 % (7).

Hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ) zmanjša incidenco zlomov tudi pri ženskah z normalno MKG in ne samo pri tistih, ki imajo povečano tveganje za zlome. (7). Glavna indikacija za HNZ je preprečevanje osteoporoze pri ženskah v zgodnjem pomenopavznem obdobju. Dodatek kalcija med zdravljenjem lahko poveča učinek estrogena na MKG (33). Po drugi strani HNZ povezujejo s povečanim tveganjem za razvoj raka dojke ter bolezni srca in ožilja (34), zato pri upoštevanju koristi in tveganja pri dolgotrajnem zdravljenju, velja, da HNZ ni zdravilo prvega izbora (7).

Kalcitonin zavira resorpcijo kosti z neposrednim zaviranjem aktivnosti osteoklastov (33). Pri bolnicah s pomenopavzno osteoporozo za tretjino zmanjša tveganje za zlome vretenc, medtem ko na druge zlome nima učinka (7).

Denosumab je monoklonsko protitelo, ki se z visoko afiniteto in specifičnostjo veže na RANKL ter s posnemanjem delovanja osteoprotegerina ovira interakcijo RANKL-RANK na površini predhodnikov osteoklastov. Na ta način zmanjša resorpcijo kosti in poveča MKG pri pomenopavznih ženskah z nizko kostno maso (35). Tri leta trajajoča študija, v kateri so pomenopavzne bolnice z osteoporozo prejemale 60 mg denosumaba subkutano vsakih 6 mesecev, je pokazala, da zdravilo značilno zniža tveganje za vretenčne in nevretenčne zlome, vključno z zlomom kolka (36).

Parathormon v obliki podkožnih injekcij spodbuja tvorbo nove kosti (7). Dnevno injiciranje predstavlja pomembno omejitev za dolgoročno uporabo parathormona, zato se raziskujejo možnosti uporabe manj invazivnih farmacevtskih oblik, predvsem nazalnega pršila (32). Parathormon omogoča odlaganje novega kostnega tkiva na kortikalno in trabekularno kostnino ter odebelitev skorje in trabekularnega dela kosti. Na ta način poveča trdnost kosti in zmanjša tveganje za zlom (37).

Monoklonska protitelesa proti sklerostinu predstavljajo nov obetaven terapevtski pristop k anabolnem zdravljenju osteoporoze. Sklerostin je glikoprotein, ki ga v glavnem proizvajajo osteociti, čeprav je gen *SOST* za sklerostin izražen tudi v osteoblastih, hrustancu, ledvicah, jetrih, kostnem mozgu, srcu, trebušni slinavki, v manjši meri pa tudi v placenti. Deluje kot naravni inhibitor močne anabolne poti Wnt (38). Monoklonska protitelesa inhibirajo delovanje sklerostina in na ta način povečajo tvorbo in maso kosti ter njihovo trdnost in izboljšajo zdravljenje zlomov. Rezultati prve klinične študije kažejo značilno povečanje označevalcev tvorbe kosti in znižanje označevalcev kostne resorpcije ter značilno zvečanje MKG tako pri zdravih moških kot pri pomenopavznih ženskah (39).

Stroncijev ranelat je novejšo zdravilo za zdravljenje osteoporoze, ki aktivira kalcijeve ali druge kationske receptorje, poveča izražanje OPG in hkrati zniža izražanje RANKL v osteoblastih (40). Tako istočasno spodbuja tvorbo nove kosti in zavira kostno razgradnjo (7). Pri pomenopavznih ženskah z osteoporozo, ki so prejemale 2 g stroncijevega ranelata dnevno, se je tveganje za zlome vretenc znižalo (41).

Selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM) so antiresorptivna zdravila, kamor uvrščamo raloksifen, bazedoksifen, lasofoksifen, arzoksifen (7). Raloksifen je podrobneje opisan v poglavju 1.3.

1.2.3.1 Farmakogenetika osteoporoze

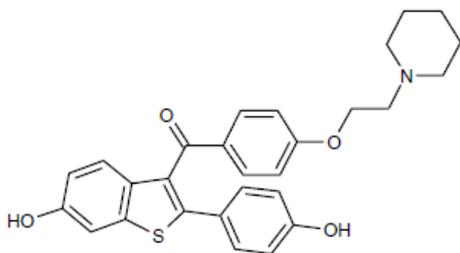
Farmakogenetika je disciplina, ki združuje načela farmakologije in genetike. Njen glavni cilj je preučiti vpliv genetskih polimorfizmov na posameznikov odgovor na zdravilo in s tem prispevati k optimalnemu terapevtskemu izidu. S stališča farmakogenetike so najpomembnejši polimorfizmi v genih za presnovne encime, prenašalne proteine in receptorje zdravilnih učinkovin. Za določene zdravilne učinkovine se farmakogenetsko testiranje že priporoča in ponekod tudi izvaja v klinični praksi. Na področju zdravljenja osteoporoze in drugih presnovnih bolezni kosti pa je študij zaenkrat malo, tako da farmakogenetski testi, ki bi zdravnikom omogočili prilagajanje odmerka zdravila glede na genotip posameznika ali izbiro alternativnega zdravljenja, še niso na voljo (42).

Raziskave so pokazale, da določeni genetski polimorfizmi sodelujejo pri odgovoru bolnika na zdravljenje (14). V skupini brazilskih pomenopavznih preiskovank so tako ugotovili, da prisotnost genotipa PP polimorfizma PvuII v genu za ER α zviša MKG ledvene hrbtenice po zdravljenju z raloksifenom (42). Po drugi strani pa Zavrtnik s sodelavci vpliva polimorfizma PvuII v genu za ER α na naši skupini preiskovank ni potrdil (43). V treh različnih študijah so pokazali povezavo med polimorfizmom BsmI v genu za VDR in odzivom na različne antiresorptivne terapije (42, 44, 45, 46). Ugotovili so tudi povezavo med genotipom SS polimorfizma Sp1 v genu za COL1A1 in zvišanjem MKG stegenice med zdravljenjem z bisfosfonati (42, 47). Kim s sodelavci je pred kratkim prvi ovrednotil vpliv polimorfizmov v genih za proteine anabolne poti Wnt na MKG med hormonskim nadomestnim zdravljenjem (42, 48). V naši raziskavi pa smo želeli raziskati vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na farmakokinetiko in farmakodinamiko raloksifena.

1.3 Raloksifen

V naši raziskavi smo se osredotočili na raloksifen (slika 1), ki spada med selektivne modulatorje estrogenskih receptorjev. Te zdravilne učinkovine z vezavo na estrogenski receptor (ER) v nekaterih tkivih delujejo kot agonisti, v drugih pa zavirajo estrogensko delovanje (49). Estrogenski receptorji obstajajo v dveh izoformnih oblikah, ER- α in ER- β ,

in obe sta prisotni v kosteh, maternici, dojkah, prostati in možganih. Tako ER- α kot ER- β imata vezavno mesto za ligand (estrogen ali SERM) in DNA vezavno mesto (50).



Slika 1: Strukturna formula raloksifena

Podobno kot estrogen, tudi raloksifen deluje preko vezave z veliko afiniteto na estrogenske receptorje ter preko uravnavanja izražanja genov. Vezava na estrogenske receptorje povzroči različno izražanje več estrogensko uravnanih genov v različnih tkivih (51). Selektivno delovanje SERM-ov je odvisno od izoformne oblike in konformacijskih sprememb ER, ki jih z vezavo nanj sproži SERM, kot tudi od ko-regulatornih proteinov (52).

1.3.1 Učinki raloksifena

Raloksifen, ki je predstavnik druge generacije SERM-ov, deluje kot estrogenski agonist na kosti in na presnovo lipidov in kot antagonist na maternico in dojke (53).

V kosteh zmanjša število in aktivnost osteoklastov ter posledično zveča MKG hrbtenice in vratu stegenice ter zmanjša tveganje za zlome vretenc, ne vpliva pa na incidenco nevretenčnih zlomov (54, 55, 56). Jolly s sodelavci je v pet let trajajoči raziskavi na pomenopavznih bolnicah z osteoporozo pokazal, da raloksifen značilno zviša MKG ledvenih vretenc in kolka ter tako značilno zniža verjetnost razvoja osteoporoze, v primerjavi s placebom in izhodiščnimi vrednostmi (57).

Raloksifen zniža tudi koncentracije biokemičnih označevalcev kostne premene pri pomenopavznih bolnicah z osteoporozo (58). Študija MORE je pokazala, da raloksifen po enem letu zdravljenja značilno zniža serumske koncentracije PINP, OC in BALP ter CTX/Cr v urinu. Potrdili so tudi, da je PINP kazalec kostne premene, ki lahko pri terapiji z raloksifenom napove zmanjšanje tveganja za zlome vretenc (59). Tudi Jolly s sodelavci je potrdil, da raloksifen zniža serumske koncentracije OC in BALP ter CTX/Cr v urinu (57).

Raloksifen zmanjša obolevnost za invazivno obliko primarnega raka na dojki (60) in ne stimulira endometrija. Izboljša endotelno funkcijo žil, zniža serumske koncentracije celotnega in LDL-holesterola, pri tem pa ne zviša koncentracij trigliceridov. Zniža tudi serumske koncentracije homocisteina, fibrinogena, C-reaktivnega proteina ter celičnih adhezijskih molekul (medcelične adhezijske molekule 1 (ICAM-1), žilne celične adhezijske molekule 1 (VCAM-1) in E-selektina) (57, 61, 62).

Neželeni učinki raloksifena

V študijah zdravljenja in preprečevanja osteoporoze so beležili tudi neželene učinke, povezane z uporabo raloksifena. Zelo pogost neželeni učinek zdravljenja z raloksifenom so vročinski oblivi. V primerjavi z bolnicami, ki so prejemale placebo, je bila pogostnost vročinskih oblivov zmerno povečana pri bolnicah, zdravljenih z raloksifenom. Ta neželeni učinek je bil najpogostejši v prvih 6 mesecih zdravljenja, kasneje se je le redko pojavil prvič. Občasno se lahko pojavijo tudi venski tromboembolični dogodki, vključno z globoko vensko trombozo, pljučno embolijo in trombozo retinalnih ven ter tromboflebitis povrhnjih ven. Bolezni mišično-skeletnega sistema in vezivnega tkiva so prav tako lahko posledica delovanja raloksifena. Pogost neželeni učinek so krči v nogah. Pri uporabi raloksifena so pogosto opazili tudi splošne težave, kot sta sindrom gripe in periferni edem (51).

1.3.2 Farmakokinetika raloksifena

Absorpcija

Raloksifen se hitro absorbira iz gastrointestinalnega trakta (63). Kljub temu, da se pri peroralni aplikaciji absorbira približno 60 % raloksifena, je njegova absolutna biološka uporabnost zelo nizka, samo 2 % (51). Maksimalna plazemska koncentracija raloksifena nastopi 6 ur po peroralni aplikaciji (63).

Distribucija

Raloksifen se v veliki meri porazdeli po telesu. Navidezni volumen distribucije je 2348 L/kg telesne teže in je neodvisen od odmerka. Raloksifen in njegovi presnovki se močno vežejo na plazemske proteine (več kot 95 %), zlasti na albumine in kisli glikoprotein alfa-1, ne pa tudi na globuline, ki vežejo spolne hormone (63).

Presnova

Nizka biološka uporabnost je posledica obsežne presnove II. faze, predvsem konjugiranja z glukuronsko kislino, ki ga katalizirajo uridindifosfoglukuronozil-transferaze UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9 in UGT1A10 (64, 65, 66, 67). Pri tem se tvorijo raloksifen-6-glukuronid (M1), raloksifen-4'-glukuronid (M2) in raloksifen-6,4'-diglukuronid (M3). Drugih presnovkov ni, kar je dokaz, da se raloksifen ne presnavlja s citokromi skupine P450 (63). Presnova raloksifena naj bi potekala tako v steni tankega črevesa kot tudi v jetrih (63, 68). Mnenja raziskovalcev glede prispevka različnih izoform UGT in organov k celokupnemu očistku raloksifena so različna. Razpolovni čas raloksifena v plazmi po enkratnem odmerjanju je približno 27,7 ur, kar je pripisati enterohepatični cirkulaciji. Raloksifenovih presnovkov namreč ne moremo obravnavati kot neaktivno učinkovino, temveč kot obliko, iz katere ponovno nastaja raloksifen. Iz črevesne svetline se ta lahko ponovno absorbira v krvni obtok in zaključi enterohepatično kroženje (63, 67).

Izločanje

Iz telesa se raloksifen izloča v glavnem s fecesom. V urinu se izloči manj kot 0,2 % odmerka raloksifena v nespremenjeni obliki in do 6 % apliciranega odmerka v obliki glukuronidov (63).

1.4 Prenašalni proteini

Poleg presnovnih encimov lahko na farmakokinetiko raloksifena vplivajo tudi prenašalni proteini (64). Znano je, da so prenašalni proteini lahko odločilnega pomena za farmakokinetiko, saj so v številnih tkivih odgovorni za privzem in izločanje učinkovin ali njihovih presnovkov. V splošnem se prenašalni proteini delijo na primarne, sekundarne in terciarne aktivne prenašalne proteine. Primarni potrebujejo za svoje delovanje ATP; takšna sta P-glikoprotein (P-gp) ter protein, povezan z odpornostjo proti več učinkovinam (angl. multi drug resistance-associated protein, MRP). Sekundarni in terciarni aktivni prenašalni proteini pa črpajo molekule substrata skupaj z izmenjavo ali kotransportom intra- in/ali ekstracelularnih ionov v smeri njihovega gradienta. V to skupino sodijo polipeptidni prenašalni proteini za organske anione, OATP (69).

Prenašalne proteine lahko razdelimo v dve veliki naddružini proteinov: naddružina proteinov ABC («ATP-Binding Cassette proteins») ali ATP vežočni proteini in naddružina proteinov SLC («Solute Carrier Proteins») (70).

Glede na smer prenosa substratov lahko govorimo o absorptivnih in sekretornih prenašalnih proteinih (70). Prenašalni proteini v membrani enterocitov vplivajo na absorpcijo učinkovin. Tisti v jetrih in ledvicah pa vplivajo na izločanje učinkovin tako, da nadzorujejo njihov transport v hepatocite (celice, odgovorne za razgradnjo učinkovin) in iz njih ter v ledvične tubulne celice (celice, odgovorne za izločanje snovi) in iz njih. Prenašalni proteini tudi omejujejo prodiranje snovi v cerebrospinalno tekočino in krvne celice (71). Interindividualna variabilnost aktivnosti in izražanja prenašalnih proteinov je lahko posledica številnih dejavnikov, kot so genetska heterogenost, določene bolezni in zdravila ter zelišča in sestavine prehrane, ki lahko zavirajo ali sprožijo izražanje ali aktivnost prenašalnega proteina (72). V naši raziskavi smo se omejili na dva sekretorna prenašalna proteina naddružine ABC: P-gp in MRP2 ter na dva absorptivna prenašalna proteina naddružine SLC: OATP1B1 in OATP1B3, katerih substrat je tudi raloksifen (64, 73). Nekateri izmed številnih substratov in inhibitorjev prenašalnih proteinov P-gp, MRP2, OATP1B1 in OATP1B3 so zbrani v preglednici 1.

Preglednica 1: Substrati in inhibitorji prenašalnih proteinov P-gp, MRP2, OATP1B1 in OATP1B3

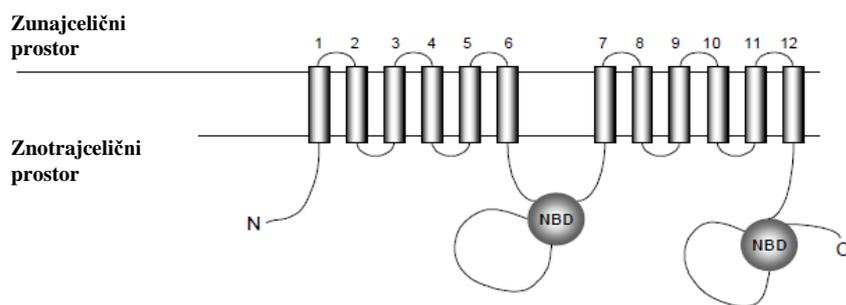
Prenašalni protein	Substrati/učinkovine	Inhibitorji	Vir
P-gp	<i>Zdravila proti raku</i> (vinblastin, vinkristin, paklitaksel, docetaksel, doksorubicin, epirubicin, irinotekan). <i>Zaviralci HIV proteaze</i> (sakvinavir, ritonavir, nelfinavir, indinavir, lopinavir, amprenavir). <i>Druga zdravila</i> (feksofenadin, loperamid, ketokonazol, atorvastatin, lovastatin, ciklosporin A, takrolimus, digoksin).	itrakonazol, ciklosporin, kinidin, verapamil, elakridar (gf120918)	74, 75, 76, 77, 78
MRP2	<i>Zdravila proti raku</i> (doksorubicin, metotreksat, cisplatin, vinkristin, vinblastin, irinotekan). <i>Zaviralci HIV proteaze</i> (indinavir, ritonavir, sakvinavir, nelfinavir, lopinavir). <i>Antibiotiki</i> (ampicilin, azitromicin, grepafloksacin, eritromicin). <i>Statini</i> (atorvastatin, pravastatin).	azitromicin, ciklosporin A, glibenklamid, furosemid, progesteron, MK 571	79, 80, 81, 82
OATP1B1	<i>Statini</i> (atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, pitavastatin, pravastatin in rosuvastatin). <i>Druga zdravila</i> (feksofenadin, metotreksat, olmesartan, rifampicin in valsartan).	sakvinavir, ciklosporin A in rifampicin	83, 84, 85

OATP1B3	<i>Statini</i> (fluvastatin, pitavastatin in rosuvastatin). <i>Druga zdravila</i> (digoksin, docetaksel, enalapril, feksofenadin, metotreksat, paklitaksel, rifampicin, olmesartan, telmisartan in valsartan)	ciklosporin A, rifampicin	83, 84
---------	---	---------------------------	--------

1.4.1 P-glikoprotein (P-gp)

P-gp je verjetno najbolj prepoznaven predstavnik naddružine prenašalnih proteinov ABC. Je produkt gena *ABCB1* ali *MDR1*, ki leži na kromosomu 7q21.1 in je sestavljen iz 28 eksonov. Nahaja se na apikalni membrani celic in izloča ksenobiotike iz celice ter tako prispeva k nižji znotrajcelični koncentraciji toksinov (71, 86). Izražen je v številnih tkivih, v ledvicah in nadledvični žlezi, v jetrih, tankem črevesu, kolonu in pljučih, v majhni meri pa tudi v prostati, koži, vranici, srcu, skeletnih mišicah, želodcu in jajčnikih, ter možganih in placenti (87). Njegovo izražanje v prebavnem traktu narašča od želodca do debelega črevesa (71). Izražanje P-gp je v rakasto spremenjenih celicah povišano in je odgovorno za t. i. pojav odpornosti proti več učinkovinam (»multi-drug resistance«), ki predstavlja velik izziv pri zdravljenju raka. Z zaviranjem delovanja P-gp bi tako lahko povečali občutljivost rakasto spremenjenih celic in izboljšali učinkovitost kemoterapije (74).

Funkcionalno enoto P-gp, ki je vključena v prenos substratov, sestavlja 12 transmembranskih domen (TMD), ki so razdeljene na polovico, vsaka polovica pa ima po eno nukleotid vezavno domeno (NBD) na citoplazemski strani membrane (87, 88).



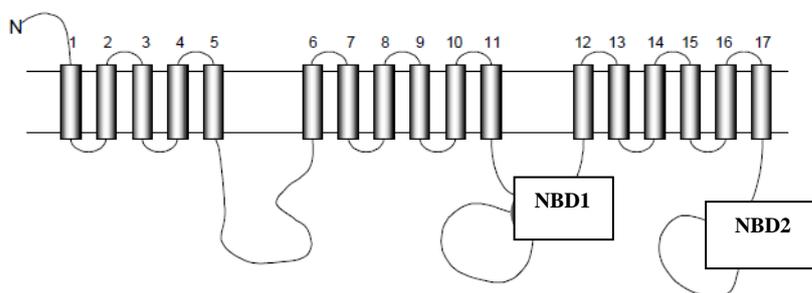
Slika 2: Zgradba P-gp (prirejeno po 87)

Za aktivacijo P-gp se mora na vsako NBD vezati po en ATP, vendar še ni popolnoma jasno, ali je za delovanje proteina potrebna tudi hidroliza obeh molekul ATP. Večje strukturne spremembe proteina se zgodijo ravno ob vezavi ATP in ne ob njegovi hidrolizi (89).

Prenos P-glikoproteinskih substratov lahko opišemo s pomočjo treh modelov: model pore, flipazni model in model vakuumskega sesalnika. Model vakuumskega sesalnika predpostavlja, da se substrati s pomočjo difuzije porazdelijo znotraj lipidnega dvosloja in od tu vstopajo v poro P-glikoproteina ter preidejo v zunajcelični prostor. Flipazni model predpostavlja, da P-glikoproteinski substrati vstopijo vse do znotrajceličnega dela lipidnega dvosloja, kjer se vežejo na P-gp, ki jih prenese v zunanji del lipidnega dvosloja. Od tu potem lahko difundirajo v zunajcelični prostor. Za razliko od klasičnega modela pore, kjer se P-glikoproteinski substrati prenesejo iz citoplazme v zunajcelični prostor, model vakuumskega sesalnika in flipazni model predvidevata kopičenje substrata v membrani (90).

1.4.2 Prenašalni protein MRP2 («multidrug resistance-associated protein»)

MRP2 je član skupine proteinov MRP, ki tako kot P-gp sodi v naddružino prenašalnih proteinov ABC. Izražen je predvsem na apikalni membrani hepatocitov, enterocitov in celic ledvičnih tubulov, kjer sodeluje pri izločanju konjugiranih in nekonjugiranih anionskih spojin v žolč. Gen za protein MRP2 (*ABCC2*) se nahaja na kromosomu 10q24 in je sestavljen iz 32 eksonov (87, 91). MRP2 je strukturno podoben prenašalnemu proteinu P-gp, le da ima še dodatnih pet transmembranskih domen na N-terminalnem koncu (slika 3). MRP2 kaže do določene stopnje tudi prekrivajočo substratno specifičnost s P-gp. Njuno usklajeno izražanje na apikalni membrani enterocitov tako predstavlja zelo veliko oviro za absorpcijo učinkovin v krvni obtok (87).



Slika 3: Zgradba prenašalnega protein MRP2 (prirejeno po 82 in 87)

Za aktiven prenos substratov sta potrebni vezava in hidroliza ATP, vendar pa nukleotid vezavni domeni (NBD) pri MRP2 ne kažeta enakih afinitet do ATP. NBD1 ima višjo afiniteto do ATP kot NBD2, ki pa je odgovorna predvsem za hidrolizo ATP. Prenos

substratov je omogočen šele po vezavi in hidrolizi ATP na NBD2. MRP2 poleg svojih substratov transportira tudi konjugate z glutationom, glukuronsko kislino in sulfatom (82). Spremembe v izražanju in/ali delovanju MRP2 imajo lahko različne klinične učinke. Znižano delovanje MRP2 lahko oslabi normalno delovanje jeter, vključno s sposobnostjo izločanja endogenih spojin, kot so konjugati bilirubina, steroidi in levkotrieni. Pri bolnikih z Dubin-Johnsonovim sindromom je MRP2 odsoten, zato so za njih značilni konjugirana hiperbilirubinemija, pigmentno odlaganje v jetrih ter prisotnost številnih polimorfizmov v genu za MRP2. Poleg tega spremembe v delovanju MRP2 lahko vplivajo tudi na absorpcijo, tkivno oziroma organsko razporeditev in očistek številnih zdravil, kot so kemoterapevtiki, antibiotiki in statini. Izražanje MRP2 je v rakasto spremenjenih celicah povišano, kar ima za posledico t. i. pojav odpornosti proti več učinkovinam. Povišano izražanje na krvno-možganski pregradi pa onemogoča normalno delovanje antiepileptičnih zdravil (82).

1.4.3 Prenašalna proteina OATP1B1 in OATP1B3 (>organic anion transporting polypeptide<)

Družina absorptivnih prenašalnih proteinov OATP je sestavljena iz 11 članov. OATP1B1 in OATP1B3 sta produkta genov *SLCO1B1* in *SLCO1B3*, ki se nahajata na kromosomu 12 in sta sestavljena iz 14 eksonov. Izražena sta zlasti na bazolateralni membrani hepatocitov, kjer prenašata substrate iz krvi v celice. *SLCO1B1* mRNA so odkrili tudi v drugih tkivih, vključno z enterociti tankega črevesja. OATP1B1 in OATP1B3 prenašata poleg učinkovin, prikazanih v preglednici 1, tudi številne fiziološke substrate, kot so konjugirani in nekonjugirani bilirubin, žolčne kisline, konjugirani spolni hormoni, ščitnični hormoni in anionski oligopeptidi, medtem ko se peptidni hormon holecistokinin prenaša samo z OATP1B3 (71, 84). V splošnem imajo substrati za OATP visoko molekularno maso (>450 kD) in so močno vezani na plazemske albumine. Znano je, da je prenos substratov za OATP neodvisen od hidrolize ATP, gradienta natrijevih, kalijevih in kloridnih ionov ter membranskega potenciala, vendar so ostali vidiki prenosa manj jasni (85, 92). Nekatere študije predvidevajo, da substrati za OATP vstopajo v celico preko centralne, pozitivno nabite pore prenašalnega proteina. Prenos poteka kot kotransport z nevtralizirajočimi anioni, kot so bikarbonati, glutation ali konjugati glutationa. Inhibitorji OATP1B1 in OATP1B3, kot je npr. rifampicin, zavirajo delovanje prenašalnih proteinov ter tako

onemogočajo vnos substratov za OATP1B1 in/ali OATP1B3 (npr. atorvastatina) v hepatocite, kar se kaže z zvišanjem površine pod krivuljo (AUC) atorvastatina. Po drugi strani pa rifampicin med dolgotrajnim zdravljenjem inducira izražanje presnovnih encimov ter tako zniža AUC atorvastatina za približno 80 % (85). Spremembe v funkciji prenašalnih proteinov OATP so lahko posledica bodisi polimorfizmov v genih za OATP bodisi interakcij sočasno apliciranih učinkovin, ki so obenem tudi substrati prenašalnega proteina (93).

1.5 Polimorfizmi v genih za prenašalne proteine

Na raven izražanja prenašalnih proteinov in na njihovo učinkovitost ter posledično na farmakokinetiko in farmakodinamiko nekaterih zdravil, med drugim raloksifena, lahko vplivajo številni polimorfizmi.

1.5.1 Polimorfizmi v genu za P-gp (*ABCB1*)

V genu za prenašalni protein P-gp (*ABCB1*) so v zadnjih letih odkrili več kot 20 polimorfizmov posameznih nukleotidov (ang. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (86). Mnogo polimorfizmov je tihih, torej takšnih, ki ne spremenijo aminokislinskega zaporedja prenašalnega proteina, lahko pa vplivajo na stabilnost prepisov mRNA ter na strukturo in delovanje proteinov (94, 95). Med polimorfizme, ki spremenijo aminokislinsko zaporedje P-gp, sodijo: polimorfizem A61G blizu N-terminalnega konca P-gp proteina, ki povzroči zamenjavo Asn z Asp, G1199A (Ser400Asn) v bližini prve nukleotid vezavne domene, G2677T na drugi transmembranski domeni vodi v zamenjavo Ala v Ser ali Thr in G2995A, ki je prav tako na drugi transmembranski domeni, toda bližje drugi nukleotid vezavni domeni. Redki polimorfizmi v eksonih 7 (A548G), 13 (C1474T) in 26 (A332C in T3421A) prav tako povzročajo spremembe aminokislinskega zaporedja P-gp. Najbolj raziskan je tihi polimorfizem C3435T, ki je pogosto povezan s polimorfizmom G2677T (Ala893Ser) in tihim polimorfizmom C1236T (86).

Polimorfizem C3435T v genu za P-gp (ABCB1)

Alelne frekvence polimorfizma C3435T (Ile1145Ile) so v različnih skupinah prebivalstva različne, v splošnem pa velja, da so aleli C bolj pogosti kot T, zato jih štejemo za divji tip (95).

O značilni povezavi polimorfizma C3435T v eksonu 26 z izražanjem in učinkovitostjo prenašalnega proteina P-gp je prvi poročal Hoffmeyer s sodelavci. Pri posameznikih z genotipom TT so odkrili približno dvakrat nižjo raven izraženega P-gp kot pri posameznikih z genotipom CC ter hkrati najvišje plazemske koncentracije P-glikoproteinskega substrata digoksina. Raven P-gp je bila pri heterozigotih višja kot pri genotipu TT in nižja v primerjavi z genotipom CC (78). Wang s sodelavci je identificiral C3435T kot funkcionalni polimorfizem, ki vpliva na stabilnost mRNA gena za P-gp. Zdi se, da je *ABCB1* mRNA, ki izhaja iz 3435T alela, manj stabilna in zato hitreje razpade po sintezi, kar ima za posledico nižjo raven mRNA v stanju dinamičnega ravnovesja (96). Mehanizem delovanja polimorfizma C3435T ni popolnoma znan. Funkcionalnih sprememb prenašalnega proteina, ki jih povzroči tihi polimorfizem, ni mogoče pojasniti z aminokislinskim zaporedjem proteina, saj se ta pri tihih mutacijah ne spremeni (95). Kimchi s sodelavci predvideva, da polimorfizem C3435T uvede redek kodon, ki vpliva na čas, potreben za kotranslacijsko zvijanje prenašalnega proteina P-gp in njegovo umestitev v membrano ter tako spremeni strukturo vezavnih mest za substrat in inhibitor. Zamenjava citozina s timinom na položaju 3435 namreč lahko povzroči spremembo kodona za izolevcin iz ATC v ATT (97). Zdi se, da C3435T upočasni ribosome ali celo povzroči njihov zastoj med translacijo ter na ta način vpliva na zvijanje proteinov in posledično na njihovo strukturo in funkcijo (95).

C3435T se lahko veže tudi z drugimi polimorfizmi v genu *ABCB1* ter tvori haplotipe. Najpogostejše haplotipe sestavljajo polimorfizmi C3435T in G2677T/A in/ali C1236T. Pogostost haplotipov CGC in TTT je pri belcih približno enaka, medtem ko pri azijski rasi prevladuje haplotip TTT (95).

Polimorfizem C3435T sam ali kot del haplotipskega bloka lahko vpliva na farmakokinetiko paklitaksela (98), ciklosporina (99), fenobarbitalov (100), nelfinavirja (101), digoksina (78, 102) in nekaterih drugih zdravil. C3435T zniža izražanje in poveča transportno aktivnost placentalnega P-gp. Tako je prenos P-glikoproteinskega substrata

paklitaksela pri preiskovankah z genotipom TT značilno višji kot pri tistih z genotipom CC. Pri ženskah z znižano placentarno aktivnostjo P-gp je tako večje tveganje za izpostavljenost ploda ksenobiotikom (98). C3435T vpliva tudi na absorpcijo imunosupresijskega zdravila ciklosporina v zgodnjem potransplantacijskem obdobju. Alel T zniža raven ciklosporina tako, da je pri bolnikih z genotipom TT izpostavljenost zdravilu močno znižana (99). Zdi se, da je P-gp v krvno-možganski pregradi povezan s farmakorezistenco pri zdravljenju epilepsije. Ugotovili so, da sta koncentracija fenobarbitalov v cerebrospinalni tekočini ter razmerje koncentracij fenobarbitalov v cerebrospinalni tekočini in serumu značilno nižja pri bolnikih z genotipom CC kot pri bolnikih z genotipi CT ali TT, kar kaže na zmanjšan prenos zdravila v možgane s P-gp. Pogostost epileptičnih napadov je prav tako višja pri homozigotih CC (100). P-gp pomembno vpliva tudi na farmakokinetiko protivirusnih zdravil. Saitoh s sodelavci je pokazal, da je virusni odziv na terapijo z nelfinavirjem pri otrocih, okuženih z virusom HIV in genotipom CT, hitrejši, saj so plazemske koncentracije nelfinavirja višje kot pri otrocih z genotipom CC (101).

1.5.2 Polimorfizmi v genu za MRP2 (ABCC2)

Polimorfizmi C24T, G1249A in C3972T v genu za MRP2 lahko povzročijo interindividualne razlike v biološki uporabnosti tako endogenih kot eksogenih substratov za MRP2. Raziskave *in vitro* in *in vivo* so pokazale, da polimorfizem C24T, ki je močno povezan s tihim polimorfizmom C3972T, zniža aktivnosti prenašalnega proteina MRP2. Polimorfizem G1249A je povezan z znižanjem biološke uporabnosti talinolola, medtem ko je tihi polimorfizem C3972T povezan z zvišano biološko uporabnostjo irinotekana.

Redke polimorfizme, kot so C1446G, T3563A in G4544A, povezujemo s povišanim izražanjem mRNA in MRP2 v jetrih (103).

Polimorfizem C3972T v genu za MRP2 (ABCC2)

Tihi polimorfizem C3972T (Ile1324Ile) v eksonu 28 ne vpliva na aminokislinsko zaporedje MRP2, temveč deluje prek vezavnega nesorazmerja s polimorfizmom C24T (104) ali drugimi polimorfizmi v genu *ABCC2*, s katerimi tvori različne haplotipe *ABCC2* (103). Podobno kot pri polimorfizmu C3435T v genu za P-gp lahko tudi v tem primeru

sprememba kodona vpliva na stopnjo translacije. Zamenjava citozina s timinom na položaju 3972 lahko povzroči spremembo kodona za izolevcin iz AUC v AUU (103). Sprememba sekundarne strukture mRNA in njene stabilnosti vpliva na izražanje in aktivnost MRP2 (91).

Polimorfizem C3972T, sam ali kot del haplotipskega bloka, zniža izražanje gena za MRP2 (*ABCC2*) ter tako vpliva na eliminacijo irinotekana (105). Innocenti s sodelavci je poročal, da je AUC irinotekana ter njegovih presnovkov APC in SN-38G višja pri homozigotih za TT kot pri nemutiranih homozigotih in heterozigotih. Rezultati te raziskave kažejo, da je polimorfizem C3972T povezan z znižano eliminacijo irinotekana in njegovih presnovkov (106). Polimorfizem C3972T lahko prek vezavnega nesorazmerja s C24T vpliva tudi na farmakokinetiko mikofenolne kisline (104) in tenofovirja (107, 108). Polimorfizma C24T in C3972T v genu za MRP2 ščitita bolnike z ledvičnim presadkom, ki so obenem nosilci omenjenih polimorfizmov pred znižano izpostavljenostjo mikofenolni kislini, ki je povezana z blago disfunkcijo jeter, ter posledično pred potencialno prešibko imunosupresijo (104).

1.5.3 Polimorfizmi v genu za OATP1B1 (*SLCO1B1*)

V genu za OATP1B1 (*SLCO1B1*) so odkrili številne polimorfizme, med njimi G11187A, A10499C, T521C in A388G (109). Polimorfizma A388G v eksonu 4 in T521C v eksonu 5 sta zelo pogosta, njune alelne frekvence pa se lahko med različnimi etničnimi skupinami razlikujejo (110).

Polimorfizma T521C in A388G v genu za OATP1B1 (*SLCO1B1*)

Polimorfizma A388G (Asn130Asp) in T521C (Val174Ala) lahko skupaj oblikujeta štiri haplotipe: *1a – 130Asn in 174Val (AT), *1b – 130Asp in 174Val (GT), *5 – 130Asn in 174Ala (AC) in *15 – 130Asp in 174Ala (GC) (111). Sama, ali še pogosteje v obliki omenjenih haplotipov, vplivata na farmakokinetiko irinotekana (112), feksofenadina (113), repaglinida (114) in različnih statinov (109).

Polimorfizmu A388G v genu *SLCO1B1* pripisujejo tako znižano (112, 115) kot tudi nespremenjeno (112, 116) ali celo zvišano (115, 117) transportno aktivnost prenašalnega proteina OATP1B1. Nozawa s sodelavci je pokazal, da je OATP1B1 vključen v transport aktivnega presnovka irinotekana (SN-38), ne pa tudi samega irinotekana in njegovih

ostalnih presnovkov. V raziskavi *in vitro* so ugotavljali učinke haplotipov *1a, *1b, *5 in *15 na aktivnost OATP1B1. Raziskava je pokazala, da haplotip *SLCO1B1**15 zniža transportno aktivnost OATP1B1 oziroma privzem aktivnega presnovka irinotekana SN-38 (112). V primeru repaglinida, ki je prav tako substrat proteina OATP1B1, je Niemi s sodelavci prvi pokazal, da lahko polimorfizmi v genu *SLCO1B1* značilno vplivajo tudi na farmakokinetiko učinkovine, ki se popolnoma presnovi z encimi CYP. Izrazito povišane plazemske koncentracije repaglinida pri posameznikih z genotipom 521CC kažejo, da je z OATP1B1 posredovan prenos učinkovine v jetra pomemben za njeno presnovo in izločanje, katalizirano z encimi CYP. AUC in Cmax repaglinida sta bila v raziskavi močno povišana, medtem ko je $t_{1/2}$ ostal nespremenjen, kar kaže, da OATP1B1 vpliva na farmakokinetiko repaglinida zlasti v stopnji absorpcije (114).

Polimorfizem T521C vpliva na farmakokinetiko feksofenadina, saj je AUC feksofenadina pri posameznikih z genotipom 521CC za 76,0 % višja kot pri heterozigotih ter 127 % višja kot pri nemutiranih homozigotih. Vpliv polimorfizma T521C na AUC feksofenadina kaže, da je z OATP1B1 posredovan privzem učinkovine v jetra prvi pogoj za njeno izločanje z žolčem (113).

Polimorfizma T521C in A388G v genu *SLCO1B1* lahko vplivata na farmakokinetiko različnih statinov, vključno s pravastatinom (118), pitavastatinom (119), rosuvastatinom, atorvastatinom (120) in simvastatinom (109).

Za pravastatin je Mwinyi s sodelavci ugotovil, da imata haplotipa *1b in *5 ravno nasprotni učinek na transportno funkcijo prenašalnega proteina OATP1B1. Haplotip *5 upočasni prenos pravastatina v jetra, medtem ko ga *1b pospeši. Mehanizem tega delovanja še ni popolnoma jasn (118). Chung s sodelavci je v raziskavi na relativno majhni skupini zdravih posameznikov azijske rase pokazal, da haplotip OATP1B1*15 in polimorfizem T521C značilno vplivata na farmakokinetiko pitavastatina. Koncentracije pitavastatina so bile pri posameznikih z OATP1B1*15 ali alelom 521C dvakrat višje kot pri tistih, ki teh alelov niso imeli. Ti rezultati kažejo, da je alel *15 povezan z zmanjšanim privzemom pitavastatina iz krvi s pomočjo prenašalnega proteina OATP1B1 (119).

Polimorfizem T521C ima večji učinek na AUC atorvastatina kot na AUC bolj hidrofilnega rosuvastatina, prav tako pa značilno vpliva na plazemske koncentracije presnovka atorvastatina, 2-hidroksiatorvastatina. $AUC_{0-48\text{ h}}$ atorvastatina je pri posameznikih z genotipom 521CC za 144 % višja kot pri posameznikih z genotipom 521TT ter za 61 % višja kot pri heterozigotih. $AUC_{0-48\text{ h}}$ rosuvastatina je pri posameznikih z genotipom

521CC samo za 65 % višja, v primerjavi s tistimi z genotipom 521TT. $AUC_{0-48\text{ h}}$ 2-hidroksiatorvastatina je za 100 % višja pri posameznikih z genotipom 521CC kot pri nemutiranih homozigotih (120). Tudi simvastatinska kislina (aktivna oblika simvastatina) je substrat za OATP1B1, ki z aktivnim prenosom preide v hepatocite. Polimorfizem T521C značilno vpliva na farmakokinetiko simvastatinske kisline, ne pa tudi laktona oziroma neaktivne oblike simvastatina. Povišane plazemske koncentracije simvastatinske kisline pri posameznikih z alelom 521C lahko povečajo tveganje za nastanek neželenih stranskih učinkov med zdravljenjem s simvastatinom (109). Polimorfizmi v genu *SLCO1B1* lahko vplivajo tudi na koncentracije fizioloških substratov, ki se prenašajo z OATP1B1. Tako so v veliki meri odgovorni za interindividualno variabilnost serumskih koncentracij bilirubina. Nosilci haplotipa *15 so imeli višje serumske koncentracije celokupnega bilirubina v primerjavi z nosilci haplotipov *1a in *1b (121).

1.5.4 Polimorfizmi v genu za OATP1B3 (*SLCO1B3*)

Gena *SLCO1B3* in *SLCO1B1* sta izrazito polimorfna. Boivin s sodelavci je dokazal prisotnost 41 polimorfizmov v genu za OATP1B3. Večina se jih nahaja v promotorski regiji, na 5'- in 3'-koncu ter v intronih. Primerjava z drugimi raziskavami kaže, da se razporeditev polimorfizmov in haplotipov v genu *SLCO1B3* močno razlikuje, odvisno od preiskovane populacije (122).

Nukleotidna zamenjava C>G v intronu 7 gena za OATP1B3 (*SLCO1B3*)

V vsegenomski študiji so dokazali povezanost nukleotidne zamenjave C>G v intronu 7 gena za OATP1B3 (*SLCO1B3*) s koncentracijo bilirubina pri prebivalcih Sardinije. Za razliko od gena *SLCO1B1*, kjer je večina polimorfizmov povezanih s koncentracijo konjugiranega bilirubina, je polimorfizem v intronu 7 gena *SLCO1B3* bolj povezan s serumskimi koncentracijami nekonjugiranega bilirubina (123). Polimorfizem v intronu 7 gena *SLCO1B3* smo v našo raziskavo vključili prav zaradi njegove povezave z nekonjugiranim bilirubinom, katerega koncentracije korelirajo s koncentracijami raloksifena. Frekvence tega polimorfizma se med različnimi etničnimi skupinami močno razlikujejo. V skupini korejskih preiskovancev je njegova alelna frekvenca samo 0,00373, medtem ko je pri prebivalcih Sardinije 0,293 (124).

2. NAMEN DELA

Naše predhodne študije *in vitro* in nekatere druge raziskave so pokazale, da so raloksifen in njegovi presnovki lahko substrati prenašalnih proteinov P-gp, MRP in OATP (64, 73), zato smo se odločili raziskati, ali obstaja povezava med genotipi prenašalnih proteinov P-gp, MRP2, OATP1B1 in OATP1B3 in farmakokinetiko ter farmakodinamiko raloksifena.

Namen naloge je:

- ugotoviti, ali obstaja povezava med polimorfizmi 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*, 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* in serumskimi koncentracijami raloksifena ter njegovih presnovkov raloksifen-6-glukuronida (M1), raloksifen-4'-glukuronida (M2), raloksifen-6,4'-diglukuronida (M3) in seštevkom molarne koncentracije vseh raloksifenovih zvrsti, izmerjenimi po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom v odmerkih 60 mg/dan,
- raziskati vpliv omenjenih petih polimorfizmov na parametre za kvantiteto (mineralna kostna gostota ali MKG) in kvaliteto (hitrost širjenja ultrazvočnega signala ali SOS, širokopasovno slabenje ultrazvočnega signala ali BUA, kvantitativni ultrazvočni indeks ali QUI) kostnega tkiva, biokemijske označevalce kostne premene (ALP, BALP, OC, CTX) ter dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja (celotni holesterol, LDL-holesterol, HDL-holesterol in trigliceridi, medcelična adhezijska molekula 1 (ICAM-1), žilna celična adhezijska molekula 1 (VCAM-1), E-selektin, C-reaktivni protein (CRP), von Willebrandov faktor (vWf), endotelijsko odvisna (EOD) in endotelijsko neodvisna vazodilatacija (END) ter debelina intime medije (dIM)), po uvedbi zdravljenja z raloksifenom.

V ta namen bomo analizirali DNA, osamljeno iz vzorcev periferne krvi, odvzetih 63 pacientkam s pomenopavzno osteoporozo, zdravljenih z raloksifenom, ter z verižno reakcijo s polimerazo s pomočjo hidrolizirajočih sond določili genotipe preiskovank. Na osnovi izmerjenih serumskih koncentracij raloksifena in njegovih presnovkov ter farmakodinamskih parametrov bomo s statističnimi testi ovrednotili vpliv polimorfizmov na farmakokinetiko in farmakodinamiko raloksifena.

3. PREISKOVANKE, MATERIALI IN METODE

3.1 Preiskovanke

Analizirali smo DNA, osamljeno iz vzorcev periferne krvi, odvzetih 63 pacientkam s pomenopavzno osteoporozo, na terapiji z raloksifenom. Preiskovanke so pridobili med bolnicami, ki so bile zaradi zdravljenja osteoporoze napotene v endokrinološko ambulanto Univerzitetnega kliničnega centra v Mariboru. Pred vključitvijo v raziskavo so vse podpisale izjavo o prostovoljni privolitvi za sodelovanje v raziskavi. Preiskovanke so jemale raloksifen (Evista) v odmerkih 60 mg/dan. Sočasno so med raziskavo jemale holekalciferol (Plivit D3), 2 kapljici dnevno (400IE/dan) in kalcijev karbonat 1 g/dan. Odvzem krvi in fizikalne preiskave so opravili po 6 in/ali 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom (43).

Uporabo odvzetih vzorcev je odobrila Komisija za medicinsko etiko RS (št. 27/02/07).

3.2 Določanje serumskih koncentracij raloksifena in njegovih presnovkov

Serumske koncentracije raloksifena ter njegovih presnovkov raloksifen-6-glukuronida (M1), raloksifen-4'-glukuronida (M2), raloksifen-6,4'-diglukuronida (M3) in seštevka molarne koncentracije vseh raloksifenovih zvrsti (angl. total raloxifene in hydrolyzed plasma, TRHP) je tej skupini preiskovank določila raziskovalna skupina na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, zato metode na tem mestu ne bomo podrobno razlagali. Omenjena raziskovalna skupina je v ta namen razvila in validirala metodo, ki je vključevala ekstrakcijo seruma na trdni fazi z naknadnim koncentriranjem ter analitiko na tekočinski kromatografiji s tandemsko masno spektrometrijo (LC/MS/MS) (125).

3.3 Določanje farmakodinamskih parametrov

Farmakodinamske parametre so določili v Univerzitetnih Kliničnih centrih v Mariboru in Ljubljani.

Meritve MKG so izvajali na ledveni hrbtenici (od L1 do L4), vratu stegenice in celotnem kolku s pomočjo DXA na aparatu QDR-2000 plus (Hologic Inc. Waltham U.S.A.). Kostno alkalno fosfatazo so določili z imunoradiometrično metodo Tandem-R Ostase, proizvajalca Beckman Coulter, osteokalcin in koncentracije C-terminalnih telopeptidov kolagena tipa I pa z elektrokemiluminiscenčno metodo (sistem Elecsys) (43).

Parametre za oceno kakovosti kostnega tkiva so določili s kvantitativnim ultrazvokom (QUS), ki se lahko uporablja samo za meritve na perifernem okostju. Vse meritve so opravili na levi petnici z aparatom Sahara (Hologic Inc. Waltham, U.S.A.). QUS uporabljamo kot presejalno metodo za osteoporozo. Temelji na slabitvi ultrazvočnega valovanja in hitrosti ultrazvoka ob prehajanju skozi kostno tkivo v odvisnosti od mikroarhitekture kosti, MKG in prožnosti kostnega tkiva. S to preiskavo torej lahko neposredno merimo dva parametra, slabitev ultrazvočnega valovanja (BUA) in spremembo hitrosti ultrazvoka (SOS) ob prehodu skozi kostno tkivo (43). Na BUA vplivajo debelina trabekul in razmaknjenost med njimi ter povezanost trabekul, na SOS, ki je merilo za prožnost kostnega tkiva, pa vpliva samo razmaknjenost trabekul (126, 127). Na podlagi teh dveh parametrov lahko aparature prikažejo matematične izračune ostalih parametrov, med drugim oceno MKG ter QUI (kvantitativni ultrazvočni indeks), ki se uporablja kot merilo za trdnost kosti. S to metodo torej ne merimo MKG neposredno (43, 128).

Določili so tudi koncentracije dejavnikov tveganja za bolezni srca in ožilja. Meritve koncentracij celotnega holesterola, HDL-holesterola ter trigliceridov so opravili kolorimetrično (Olympus AU640 analyzer) iz svežega seruma, ki so ga pripravili iz polne krvi brez dodatkov z 10-minutnim centrifugiranjem pri sobni temperaturi (43).

Koncentracije celičnih adhezijskih molekul ICAM-1, VCAM-1 in E-selektina so določili z encimsko-immunskim testom (ELISA) z dvojnimi protitelesi, proizvajalca R&D Systems, koncentracijo CRP z imunonefelometričnim testom Dade Behring GmbH, Nemčija, koncentracijo vWf-ja pa z metodo aglutinacije trombocitov z von Willebrandovim reagentom BC, proizvajalca Dade Behring GmbH, Nemčija. CRP je zelo pomemben vnetni označevalec, saj so ugotovili, da je celo boljši napovedni dejavnik akutnih srčno-žilnih dogodkov kot celotni holesterol in LDL-holesterol. Za proces ateroskleroze so pomembne tudi celične adhezijske molekule, zlasti ICAM-1, VCAM-1 in E-selektin, ki jih izražajo endotelijske celice žil. Vwf je glikoprotein, ki ga v večji meri sintetizirajo endotelijske celice, manjši del pa trombociti in služi kot nosilna beljakovina koagulacijskega faktorja VIII, ki je pomemben za nastajanje tromбина. Zvišane koncentracije vWf so pomemben,

neodvisen dejavnik tveganja za srčno-žilne dogodke (43). Vpliv na žile so ocenili z ultrazvočno meritvijo endotelijsko odvisne in endotelijsko neodvisne dilatacije brahialne arterije po zažemu ter ultrazvočno meritvijo debeline intime medije karotidne arterije (43).

3.4 Določanje koncentracij osnovnih in priprava razredčenih raztopin vzorčnih DNA

Za določanje koncentracij osnovnih raztopin vzorčnih DNA smo uporabili spektrofotometer NanoDrop[®] ND-1000, ki pokriva območje med 220 – 750 nm. Osnovne prednosti tega spektrofotometra so visoka natančnost in ponovljivost meritev ter majhna količina vzorca, potrebnega za analizo (zadošča že 1 μL vzorca). Inštrument izkorišča površinsko napetost za pravilen položaj vzorca ter tako odpravlja potrebo po kivetah, ki bi lahko kontaminirale vzorec. Omogoča meritve tudi zelo koncentriranih vzorcev (129).

Na spodnjo optično enoto smo odpipetirali 1,5 μL vzorčne DNA. Zgornjo optično enoto smo nato položili na spodnjo, tako da sta bili obe v stiku z vzorcem, in posneli meritev. Pulzna ksenonska žarnica predstavlja izvor svetlobe. Za analizo svetlobe, ki je prešla skozi vzorec, pa se uporablja t. i. detektor CCD (ang. Charge-coupled device), ki je povezan z računalnikom z ustrežno programsko opremo (129).

Za izvedbo genotipizacije je pomembno, da so vzorci DNA enakih koncentracij. Zato smo jih na podlagi izmerjenih koncentracij ustrezno redčili do končne koncentracije 2,2 ng/ μL . Raztopine vzorčnih DNA smo pripravili v 0,5-mL mikro epruvetah ter jih pred uporabo premešali na vrtinčastem mešalu.

3.5 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Genotipizacijo vzorčnih DNA smo izvedli z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). S PCR lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij določenega odseka DNA. Pomembna prednost te metode *in vitro* je, da za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca. Reakcijska zmes za PCR je sestavljena iz matrice, to je vzorčne DNA, dveh oligonukleotidnih začetnikov, dolgih 16 do 24 nukleotidov, s katerimi omejimo tisti odsek, ki ga želimo pomnožiti, deoksinukleotid-trifosfata, ki predstavljajo gradnike za nove verige DNA, Mg^{2+} ionov, reakcijskega pufra in termostabilne DNA-polimeraze. Vsak cikel reakcije PCR je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja oligonukleotidnih

začetnikov in nastajanja komplementarne verige. V stopnji denaturacije (94–95 °C) se verigi DNA razkleneta ter dobimo enoverižni DNA. Stopnja prileganja poteka pri nižji temperaturi (40–60 °C). V tej stopnji pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov na komplementarni del enoverižne DNA. V zadnji stopnji sledi dvig temperature na 72 °C. S tem ustvarimo optimalne razmere za delovanje termostabilne DNA-polimeraze, ki z vezavo na oligonukleotidni začetnik, v smeri 5' proti 3', izgradi komplementarno verigo. V eni reakciji PCR se cikel običajno ponovi od 20- do 40-krat, pri čemer se z vsako ponovitvijo število kopij določenega odseka podvoji. Torej, n ciklov PCR vodi v 2ⁿ kopij tarčnih odsekov DNA. Za detekcijo produktov PCR se pogosto uporabljajo hidrolizirajoče sonde, ki imajo na koncih vezana različna fluorofora. Sonda se v stopnji prileganja specifično veže na tarčno zaporedje na DNA. DNA-polimeraza Taq s svojo 5'-eksonukleazno aktivnostjo v stopnji podaljševanja povzroči hidrolizo sonde, vezane na tarčno zaporedje. S tem se razdalja med reporterskim barvilom na 5'-koncu in t. i. dušilcem na 3'-koncu sonde poveča ter onemogoči dušilcu prestrezanje fluorescence, kar ima za posledico porast fluorescenčnega signala. Porast pa je sorazmeren količini produkta PCR (130).

3.5.1 Genotipizacija polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*, 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*

Genotipizacijo smo izvedli v trakovih s po osmimi epruvetkami za vsak polimorfizem posebej. V delovni komori smo pripravili skupne reakcijske zmesi brez vzorčne DNA, ki so se med seboj razlikovale le po uporabljenih sondah in oligonukleotidnih začetnikih. Za vsak polimorfizem smo uporabili drug par sond (preglednica 2). Ena izmed sond ima na 5'-koncu vezano reportersko barvilo VIC, druga pa barvilo FAM. Na 3'-koncu imata obe vezan dušilec. Ena sonda se popolnoma prilega mutiranemu, druga pa nemutiranemu zaporedju (131).

Preglednica 2: Reagenti Taqman® za polimorfizme 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*, 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2*, C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*.

Protein	Gen	Polimorfizem	Testni komplet
MRP2	<i>ABCC2</i>	C3972T (rs3740066)	C__11214910_20 C – VIC (nemutirano zaporedje) T – FAM (mutirano zaporedje)
PGP	<i>ABCB1</i>	C3435T/G3435A (rs1045642)	C__7586657_20 A – VIC (mutirano zaporedje)

			<i>G – FAM (nemutirano zaporedje)</i>
OATP1B1	<i>SLCO1B1</i>	A388G (rs2306283)	C__1901697_20 <i>A – VIC (nemutirano zaporedje)</i> <i>G – FAM (mutirano zaporedje)</i>
		T521C (rs4149056)	C__30633906_10 <i>C – VIC (mutirano zaporedje)</i> <i>T – FAM (nemutirano zaporedje)</i>
OATP1B3	<i>SLCO1B3</i>	C>G v intronu 7 (rs17680137)	C__25766725_10 <i>C – VIC (nemutirano zaporedje)</i> <i>G – FAM (mutirano zaporedje)</i>

Sestava reakcijske zmesi enega vzorca je podana v preglednici 3.

Preglednica 3: Sestava reakcijske zmesi enega vzorca za reakcijo PCR

Sestavine	Volumen (µL)
Taqman [®] Genotyping Master Mix 2x	5
Ustrezne sonde in oligonukleotidni začetniki Taqman [®] 20X	0,5
Vzorčna DNA (2,2 ng/µL)	4,5
Skupni volumen zmesi enega vzorca	10

Reakcijsko zmes brez vzorčne DNA smo za več vzorcev pripravili tako, da smo posamezne sestavine pomnožili s številom vzorcev in prišteli 10 % pribitek, zaradi izgub pri pipetiranju reakcijske zmesi. Tako pripravljeno reakcijsko zmes za posamezen polimorfizem smo premešali na vrtnčastem mešalu in centrifugirali 1 minuto pri 2100 obratih/min, nato pa odpipetirali po 5,5 µL v trakove s po osmimi epruvetkami. Zatem smo v reakcijsko zmes dodali po 4,5 µL predhodno pripravljenih vzorčnih raztopin DNA koncentracije 2,2 ng/µL. Sestava reakcijske zmesi za polimorfizem C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* se je, zaradi bolj koncentrirane sonde (40X), nekoliko razlikovala. V slepi vzorec smo namesto vzorčne DNA dodali enako količino visoko prečiščene vode. Trakove s po osmimi epruvetkami, z reakcijsko zmesjo in vzorčno DNA oziroma slepim vzorcem, smo tesno zaprli in centrifugirali 1 minuto pri 2100 obratih/min. Nato smo jih vstavili v aparaturo ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection system, ki verižno reakcijo s polimerazo izvede po predhodno nastavljenem računalniškem protokolu, ki je določen s strani proizvajalca (preglednica 4).

Preglednica 4: Pogoji za izvedbo reakcije PCR s Taqman® sondami

Stopnje PCR reakcije	Temperatura (°C)	Čas
Začetna denaturacija	95	10 min
Denaturacija	92	15 sek
Prileganje in podaljševanje	60	90 sek

50 ciklov

Pogoji reakcije PCR za polimorfizem C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* so se razlikovali od pogojev, opisanih v preglednici 4. Začetna denaturacija je potekala pri temperaturi 95 °C 15 min, denaturacija pri 95 °C 15 sek, stopnja prileganja in podaljševanja pa pri 60 °C 60 sek. Stopnji denaturacije ter prileganja in podaljševanja smo ponovili 45-krat.

3.6 Statistična analiza

Vpliv polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*, 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* na farmakokinetiko in farmakodinamiko raloksifena smo ovrednotili s statistično analizo s pomočjo programa SPSS, verzija 17.0, proizvajalca SPSS Inc., Chicago, ZDA.

Za presojo normalnosti porazdelitve naših rezultatov smo uporabili testa Kolmogorov–Smirnov in Shapiro–Wilk. Podatke, ki se niso normalno porazdeljevali, smo s transformiranjem (logaritmiranjem in korenjenjem) poskusili prevesti v normalno obliko. Homogenost varianc smo testirali z Levenovim testom. Za več neodvisnih, normalno porazdeljenih spremenljivk smo nato uporabili analizo variance ANOVA, T-test pa v primeru dveh neodvisnih normalno porazdeljenih spremenljivk. Z Bonferroni *post-hoc* testom smo ugotavljali statistične razlike med posameznimi podskupinami spremenljivk. S testom χ^2 smo preverjali, ali so eksperimentalni podatki v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Pri preizkušanju hipotez smo kot statistično značilno upoštevali vrednost $p < 0,05$.

3.7 Materiali

Materiali

- visoko prečiščena voda
- osnovne raztopine vzorčnih DNA
- delovne raztopine vzorčnih DNA
- Taqman[®] Genotyping Master Mix 2x in 5x (Applied BioSystems)
- Taqman[®] Drug Metabolism Genotyping Assay 20x in 40x (Applied BioSystems)

Oprema

- spektrofotometer NanoDrop[®] ND-1000
- aparatura za pridobivanje visoko prečiščene vode (Elga)
- ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection system (Applied Biosystems)
- vrtinčasto mešalo in centrifuga Combi-Spin (Biosan)
- trakovi s po osmimi epruvetkami MicroAmp, Optical 8-tube strip (Applied Biosystems)
- delovna komora z UV-lučko: DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
- mikrocentrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki)

4. REZULTATI

4.1 Določitev genotipov in njihovih pogostnosti

Po končani reakciji PCR smo vzorcem na osnovi fluorescenčnega signala določili genotipe. Neuspele vzorce smo ponovno genotipizirali. Prav tako smo za vsak polimorfizem, z namenom potrditve rezultatov, naključno izbrali 10 % vzorcev ter ponovili genotipizacijo. Rezultati vseh ponovitev so se ujemali, tako smo potrdili, da smo genotipizacijo uspešno izvedli. Končni rezultati genotipizacije so podani v poglavju 8. Priloge.

Na osnovi teh rezultatov smo določili frekvence polimorfizmov. Rezultati so podani v preglednici 5.

Preglednica 5: Število in frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizme 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*, 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*.

	AA	AG	GG
Število genotipov za polimorfizem 388A>G	18	31	14
Frekvence genotipov za polimorfizem 388A>G (%)	28,6	49,2	22,2

	TT	TC	CC
Število genotipov za polimorfizem 521T>C	41	22	0
Frekvence genotipov za polimorfizem 521T>C (%)	65,1	34,9	0

	CC	CT	TT
Število genotipov za polimorfizem 3435C>T	19	26	18
Frekvence genotipov za polimorfizem 3435C>T (%)	30,2	41,3	28,6

	CC	CT	TT
Število genotipov za polimorfizem 3972C>T	29	23	11
Frekvence genotipov za polimorfizem 3972C>T (%)	46,0	36,5	17,5

	CC	CG	GG
Število genotipov za polimorfizem C>G v intronu 7	43	19	1
Frekvence genotipov za polimorfizem C>G v intronu 7 (%)	68,3	30,2	1,6

Zatem smo za vsak polimorfizem s testom χ^2 preverili, ali so genotipske frekvence v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Za Hardy-Weinbergovo ravnotežje velja naslednja enačba: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, kjer je p^2 frekvenca nemutiranih homozigotov, $2pq$ frekvenca heterozigotov in q^2 frekvenca mutiranih homozigotov. Hardy-Weinbergovo načelo, da se tako alelne frekvence kot frekvence genotipov ohranjajo iz generacije v generacijo, velja v primeru neskončno velike populacije, povsem naključne paritve in ob pogojih, da ni mutacije, selekcije in migracije (132).

Vse frekvence genotipov so bile v Hardy-Weinbergovem ravnotežju; 388A>G ($p = 0,924814$), 521T>C ($p = 0,093145$), 3972C>T ($p = 0,103812$), 3435C>T ($p = 0,166292$) in C>G v intronu 7 ($p = 0,496292$).

4.2 Analiza haplotipov za polimorfizma 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*

Haplotipe (kombinacije alelov na istem kromosomu, ki so v genskem zapisu zelo blizu skupaj in se skupaj tudi dedujejo) in diplotipe (kombinacije dveh haplotipov v paru homolognih kromosomov) smo napovedali s pomočjo programa PHASE (133, 134). Program je izračunal možne haplotipe za polimorfizma 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1* in njihove frekvence (preglednica 6) ter diplotipe za vsak posamezen vzorec. Pogostnost posameznega diplotipa je podana v preglednici 7. V statistično analizo smo vključili vse vzorce.

Preglednica 6: Napovedani haplotipi in njihove frekvence

Oznaka haplotipa	Haplotip	Frekvenca haplotipa (%)
1	*1b (388A>G)	31,7
2	*15 (388A>G in 521T>C)	15,1
3	*1a (refrenčni haplotip)	50,8
4	*5 (521T>C)	2,4

Preglednica 7: Frekvence napovedanih diplotipov

DiploTip	Frekvenca (%)
1,1	9,5 %
1,2	12,7 %
1,3	31,7 %
2,3	17,5 %
3,3	23,8 %
3,4	4,8 %

Za vsak vzorec in njegov napovedan diplotip smo podatke uredili tako, da je bilo razvidno, koliko kopij posameznega haplotipa ima preiskovanka (nobeno, eno ali dve). Tako urejene podatke smo kasneje uporabili pri statistični analizi iskanja povezanosti haplotipov s serumskimi koncentracijami raloksifena in njegovih presnovkov ter farmakodinamskimi parametri.

4.3 Povezanost polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1* in njihovih haplotipov ter polimorfizmov 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* s serumskimi koncentracijami raloksifena in njegovih presnovkov

V statistično obdelavo smo vključili 57 preiskovank s pomenopavzno osteoporozo na terapiji z raloksifenom. Koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov so določili po 12 mesecih zdravljenja.

4.3.1 Povezanost polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1* in njihovih haplotipov s serumskimi koncentracijami raloksifena in njegovih presnovkov

Ugotovili smo statistično značilne razlike med povprečnimi vrednostmi raloksifena ($p = 0,004$) M3 ($p = 0,001$), TRHP ($p = 0,009$) v posameznih genotipskih podskupinah polimorfizma 388A>G (preglednica 8). Statistično značilne rezultate smo prikazali tudi grafično (sliki 4 in 5). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi raloksifena v genotipskih podskupinah AA in GG ($p = 0,003$), M3 v genotipskih podskupinah AA in GG ($p = 0,001$) ter AG in GG ($p = 0,004$) in TRHP v genotipskih podskupinah AA in GG ($p = 0,014$) ter AG in GG ($p = 0,020$).

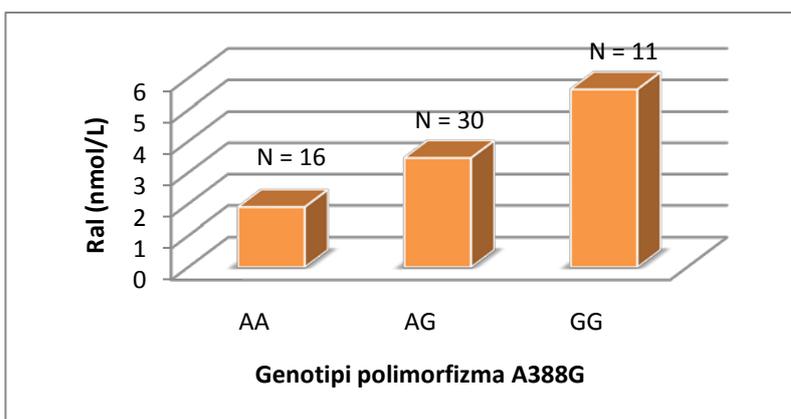
Povprečne vrednosti raloksifena, M3 in TRHP so statistično značilno višje pri preiskovankah z genotipom GG v primerjavi z nosilkami genotipov AG in AA.

Med preiskovankami ni bilo nosilk genotipa CC polimorfizma 521T>C v genu *SLCO1B1*, zato smo statistično analizirali samo dve genotipski podskupini (TT in TC). Polimorfizem 521T>C v genu *SLCO1B1* ni statistično značilno vplival na povprečne koncentracije raloksifena ter njegovih presnovkov M1, M2, M3, TRHP (preglednica 8).

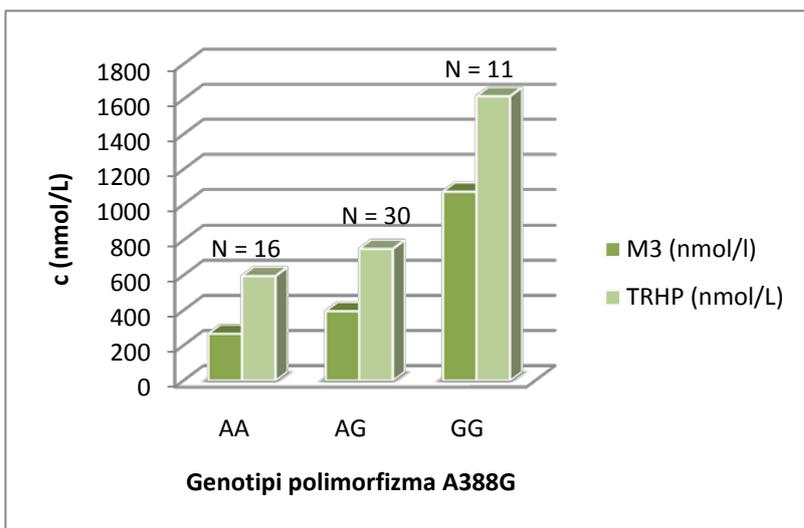
Preglednica 8: Koncentracije raloksifena (povprečje (SD)) in njegovih presnovkov po 12 mesecih zdravljenja v odvisnosti od genotipov polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*.

	Genotipi	Ral (nmol/l)	M1 (nmol/l/L)	M2 (nmol/l)	M3 (nmol/l)	TRHP (nmol/l)
Polimorfizem 388A>G	AA	1,90 (1,62)	59,80 (55,44)	267,67 (268,60)	266,37 (262,77)	595,73 (546,09)
	AG	3,47 (2,39)	63,20 (59,69)	288,43 (266,80)	395,18 (363,44)	750,29 (647,94)
	GG	5,64 (2,70)	99,42 (56,86)	439,16 (305,06)	1072,66 (915,63)	1616,88 (1142,07)
	<i>p</i>	0,004	0,143	0,225	0,001	0,009
Polimorfizem 521T>C	TT	3,49 (2,92)	65,13 (60,00)	253,86 (226,27)	544,57 (687,73)	867,05 (921,95)
	TC	3,79 (1,88)	79,30 (57,73)	430,94 (329,27)	445,53 (301,97)	959,56 (648,16)
	<i>p</i>	0,308	0,399	0,076	0,917	0,519

Uporabljena statistična metoda za polimorfizem 388A>G: ANOVA. Uporabljena statistična metoda za polimorfizem 521T>C: T-test. Ral-raloksifen, M1-raloksifen-6-glukuronida, M2-raloksifen-4'-glukuronid, M3-raloksifen-6,4'-diglukuronida, TRHP-seštevek molarne koncentracij vseh raloksifenovih zvrsti.



Slika 4: Porazdeljevanje serumskih koncentracij raloksifena glede na genotip polimorfizma 388A>G v genu *SLCO1B1*. N – število preiskovank s posameznim genotipom. Opomba: koncentracije so podane kot povprečne vrednosti.



Slika 5: Porazdeljevanje serumskih koncentracij M3 in TRHP glede na genotip polimorfizma 388A>G v genu *SLCO1B1*. N – število preiskovank s posameznim genotipom. Opomba: koncentracije so podane kot povprečne vrednosti.

Statistično smo analizirali vpliv haplotipov *1a (referenčni haplotip), *1b (388A>G) in *15 (388A>G in 521T>C) na serumske koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov. Vpliva haplotipa *5 (521T>C) nismo ugotavljali, saj ni bilo dovolj preiskovank s tem haplotipom.

Ugotovili smo, da se koncentracije raloksifena ($p = 0,016$), M3 ($p = 0,000$) in TRHP ($p = 0,020$) statistično značilno razlikujejo med preiskovankami z eno, dvema ali nobeno kopijo haplotipa *1b (preglednica 9, sliki 6 in 7). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili statistično značilno razliko v koncentracijah raloksifena ($p = 0,014$) med posameznicami z nobeno in tistimi z dvema kopijama haplotipa *1b. Prav tako smo z Bonferroni *post-hoc* testom potrdili statistično značilno razliko v koncentracijah M3 med preiskovankami, ki imajo dve, in tistimi, ki nimajo nobene ($p = 0,000$) kopije, ter preiskovankami, ki imajo eno, in tistimi, ki imajo dve kopiji ($p = 0,004$) haplotipa *1b. Statistično značilne razlike v koncentracijah TRHP smo potrdili med preiskovankami, ki imajo dve, in tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *1b ($p = 0,017$).

Nobena izmed preiskovank ni imela po dve kopiji haplotipa *15, zato smo statistično analizirali samo dve skupini. Koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov se med posameznicami, ki imajo eno, in tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *15, niso statistično značilno razlikovale (preglednica 9).

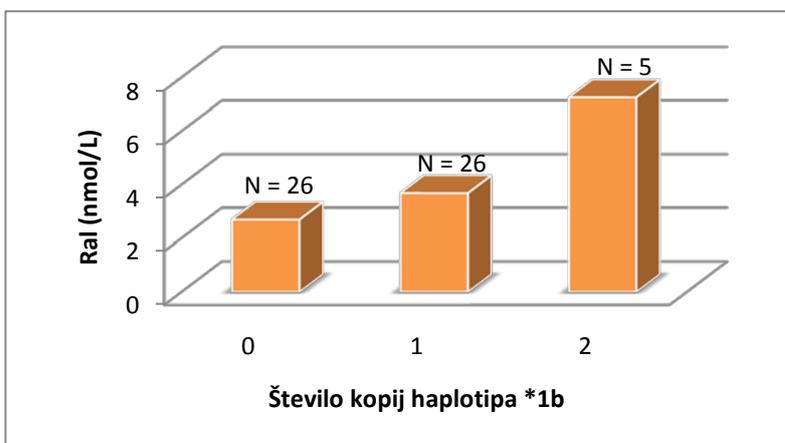
Koncentracije raloksifena ($p = 0,002$), M3 ($p = 0,001$) in TRHP ($p = 0,007$) so se med preiskovankami, ki imajo eno, dve ali nimajo nobene kopije haplotipa *1a, statistično

značilno razlikovale (preglednica 9, sliki 8 in 9). Razlike smo potrdili tudi z Bonferroni *post-hoc* testom. Koncentracije raloksifena so se statistično značilno razlikovale med osebami, ki imajo dve, in tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *1a ($p = 0,002$). Koncentracije M3 ($p = 0,003$ za 0 vs. 1 kopija; $p = 0,002$ za 0 vs. 2 kopiji) in TRHP ($p = 0,021$ za 0 vs. 1 kopija; $p = 0,011$ za 0 vs. 2 kopiji) so se statistično značilno razlikovale med preiskovankami, ki imajo eno, in tistimi, ki nimajo nobene kopije, ter med preiskovankami, ki imajo dve, in tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *1a.

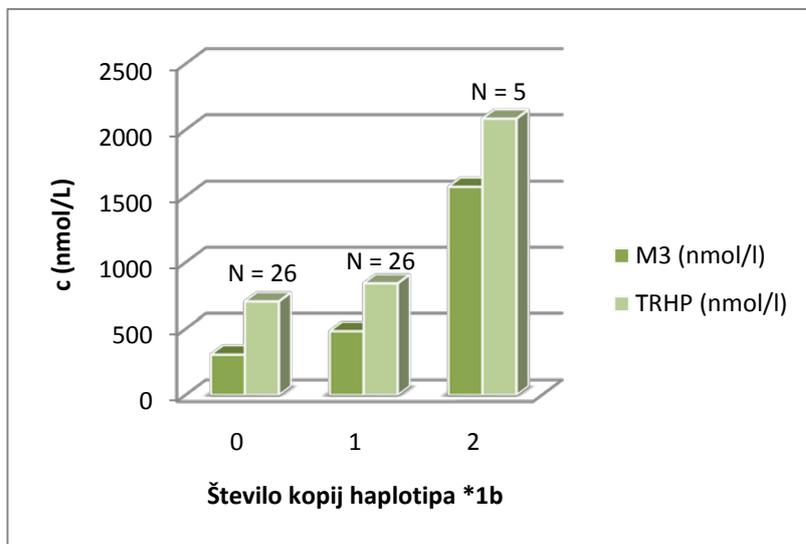
Preglednica 9: Koncentracije raloksifena (povprečje (SD)) in njegovih presnovkov po 12 mesecih zdravljenja v odvisnosti od haplotipov *1b, *15 in *1a.

	Št. kopij	Ral (nmol/l)	M1 (nmol/l)	M2 (nmol/l)	M3 (nmol/l)	TRHP (nmol/l)
Haplotip *1b	0	2,69 (2,14)	61,79 (50,77)	334,15 (305,67)	305,80 (255,56)	704,43 (583,84)
	1	3,68(2,18)	72,87 (68,91)	281,35 (261,60)	482,73 (399,07)	840,62 (705,94)
	2	7,25 (3,58)	92,65 (34,67)	412,28 (245,72)	1572,29 (1233,84)	2084,46 (1503,21)
	p	0,016	0,437	0,625	0,000	0,020
Haplotip *15	0	3,50 (2,86)	66,03 (59,12)	264,25 (229,12)	533,07 (678,17)	866,84 (905,33)
	1	3,79 (1,95)	78,44 (59,81)	422,07 (339,84)	462,27 (306,05)	966,58 (672,04)
	p	0,343	0,497	0,138	0,954	0,549
Haplotip *1a	0	5,64 (2,69)	99,42 (56,86)	439,16 (305,06)	1072,66 (915,63)	1616,88 (1142,07)
	1	3,48 (2,34)	64,29 (58,74)	298,68 (266,58)	388,10 (357,92)	754,55 (635,22)
	2	1,67 (1,56)	55,86 (57,90)	231,75 (263,02)	273,28 (280,04)	562,55 (574,01)
	p	0,002	0,125	0,180	0,001	0,007

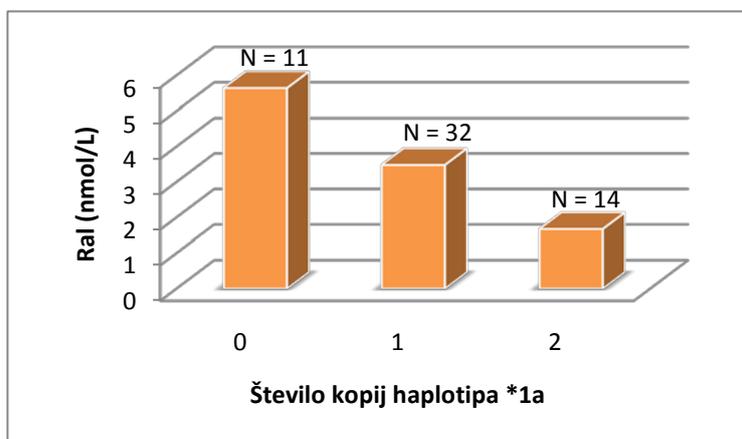
Uporabljena statistična metoda za haplotipa *1b in *1a: ANOVA. Uporabljena statistična metoda za haplotip *15: T-test. Ral-raloksifen, M1-raloksifen-6-glukuronida, M2-raloksifen-4'-glukuronid, M3-raloksifen-6,4'-diglukuronida, TRHP-seštevek molarne koncentracij vseh raloksifenovih zvrsti.



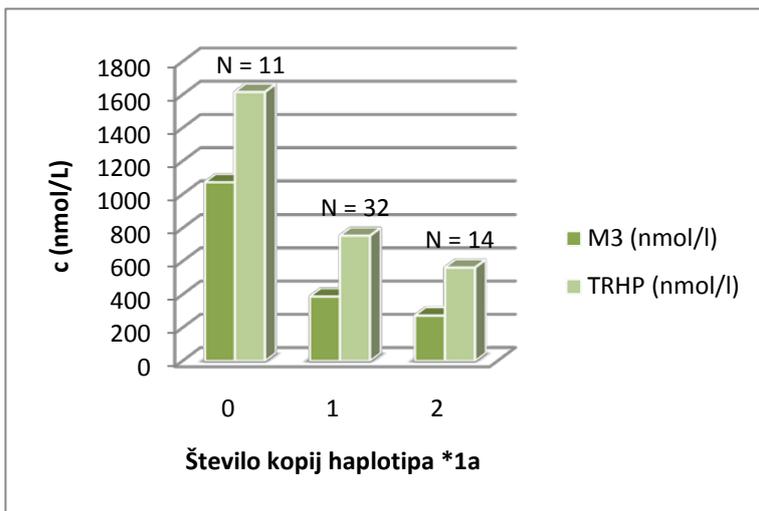
Slika 6: Porazdeljevanje serumskih koncentracij raloksifena glede na število kopij haplotipa *1b. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1b. Opomba: koncentracije so podane kot povprečne vrednosti.



Slika 7: Porazdeljevanje serumskih koncentracij M3 in TRHP glede na število kopij haplotipa *1b. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1b. Opomba: koncentracije so podane kot povprečne vrednosti.



Slika 8: Porazdeljevanje serumskih koncentracij raloksifena glede na število kopij haplotipa *1a. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1a. Opomba: koncentracije so podane kot povprečne vrednosti.



Slika 9: Porazdeljevanje serumskih koncentracij M3 in TRHP glede na število kopij haplotipa *1a. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1a. Opomba: koncentracije so podane kot povprečne vrednosti.

4.3.2 Povezanost polimorfizmov 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* s serumskimi koncentracijami raloksifena in njegovih presnovkov

Ugotovili smo, da se povprečne koncentracije raloksifena, M1, M2, M3 in TRHP ne razlikujejo statistično značilno med genotipskimi podskupinami polimorfizmov 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* (preglednica 10).

Samo ena od preiskovank je bila nosilka genotipa GG polimorfizma C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*, zato smo jo za potrebe statistične analize pridružili heterozigotom.

Preglednica 10: Koncentracije raloksifena (povprečje (SD)) in njegovih presnovkov po 12 mesecih zdravljenja v odvisnosti od genotipov polimorfizmov 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*.

	Genotipi	Ral (nmol/l)	M1 (nmol/l)	M2 (nmol/l)	M3 (nmol/l)	TRHP (nmol/l)
Polimorfizem 3435C>T	CC	2,84 (1,66)	49,38 (39,82)	198,63 (162,59)	301,21 (226,48)	552,05 (382,44)
	CT	4,27 (2,68)	82,68 (55,36)	401,97 (308,58)	581,81 (426,61)	1070,74 (683,20)
	TT	3,63 (3,27)	79,13 (78,45)	346,76 (312,14)	675,31 (935,66)	1104,83 (1246,08)
	p	0,377	0,170	0,090	0,173	0,111
Polimorfizem 3972C>T	CC	3,59 (2,20)	58,31 (40,94)	270,28 (231,04)	333,25 (229,65)	665,43 (458,35)
	CT	3,40 (2,42)	94,01 (78,97)	424,29 (345,77)	710,49 (807,53)	1232,20 (1116,65)
	TT	4,00 (3,84)	50,11 (31,91)	206,01 (135,29)	528,91 (557,04)	789,03 (709,14)
	p	0,976	0,282	0,344	0,192	0,232

Polimorfizem C>G v intronu 7	CC	3,17 (2,22)	67,54 (52,58)	313,18 (275,05)	411,06 (286,55)	794,96 (573,61)
	CG+GG	4,47 (3,11)	75,32 (72,24)	320,70 (289,24)	715,00 (918,66)	1115,49 (1200,38)
	<i>p</i>	0,166	0,830	0,959	0,339	0,428

Uporabljena statistična metoda za polimorfizma 3435C>T v genu ABCB1 in 3972C>T v genu ABCC2: ANOVA. Uporabljena statistična metoda za polimorfizem C>G v intronu 7 gena SLCO1B3: T-test. Ral-raloksifen, M1-raloksifen-6-glukuronida, M2-raloksifen-4'-glukuronid, M3-raloksifen-6,4'-diglukuronida, TRHP-seštevek molarne koncentracij vseh raloksifenovih zvrsti.

4.4 Povezanost polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu SLCO1B1 in njihovih haplotipov ter polimorfizmov 3435C>T v genu ABCB1, 3972C>T v genu ABCC2 in C>G v intronu 7 gena SLCO1B3 s farmakodinamskimi parametri

V statistično obdelavo smo vključili 57 preiskovank s pomenopavzno osteoporozo na terapiji z raloksifenom. Farmakodinamske parametre (PD) so določili v različnih časovnih intervalih. Biokemične označevalce kostne premene so določili pred začetkom zdravljenja ter ob kontroli po 6 in 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Pred začetkom zdravljenja in ob kontroli po 12 mesecih so preiskovankam s preiskavo DXA ledvene hrbtenice in kolka določili MKG in opravili QUS petnice. Koncentracije krvnih maščob so določili pred vključitvijo v raziskavo in po 6 in 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom, CRP, vWf, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin in ultrazvočno preiskavo endotelijsko odvisne in endotelijsko neodvisne dilatacije brahialne arterije po zažemu ter debelino IM pa pred vključitvijo v raziskavo in po 6 mesecih zdravljenja (43).

V nalogi smo analizirali vrednosti farmakodinamskih parametrov pred zdravljenjem ter spremembo povprečnih vrednosti BOKP, MKG in parametrov kvantitativnega ultrazvoka ter krvnih maščob po 12 mesecih zdravljenja in CRP, vWf, CAM, EOD, END in dIM po 6 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Spremembo analiziranih parametrov med zdravljenjem z raloksifenom smo izračunali po spodnji enačbi:

$$\Delta PD \text{parametra} = \left(\frac{PD \text{parameter}_{t-6 \text{ mesecev ali } 12 \text{ mesecev}} - PD \text{parameter}_{t-0}}{PD \text{parameter}_{t-0}} \right) \times 100 \%$$

4.4.1 Vpliv polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1* in njihovih haplotipov na BOKP, MKG in vrednosti UZ-parametrov

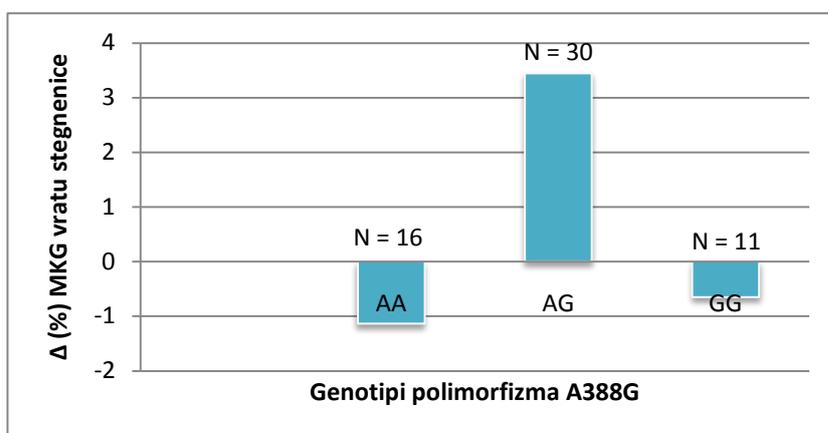
Statistično značilnih razlik v izhodiščnih vrednostih BOKP, MKG izmerjene z DXA in UZ-parametrov med genotipi polimorfizma 388A>G nismo ugotovili (preglednica 11). Ugotovili pa smo statistično značilno razliko med MKG vratu stegenice pred zdravljenjem in po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom v posameznih genotipskih podskupinah polimorfizma 388A>G ($p = 0,001$) (preglednica 11 in slika 10). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili statistično značilno razliko med deležem MKG, ki se je med zdravljenjem z raloksifenom spremenil v genotipskih podskupinah AA in AG ($p = 0,004$) ter AG in GG ($p = 0,021$).

Preglednica 11: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
BOKP					
ALP	AA	1,16 (0,26) ($\mu\text{g/L}$)	-17,09 (16,21)	0,991	0,755
	AG	1,15 (0,27) ($\mu\text{g/L}$)	-18,24 (22,9)		
	GG	1,16 (0,39) ($\mu\text{g/L}$)	-22,82 (16,04)		
BALP	AA	11,61 (3,07) ($\mu\text{g/L}$)	24,70 (11,26)	0,763	0,936
	AG	12,68 (5,38) ($\mu\text{g/L}$)	21,48 (33,84)		
	GG	11,55 (7,17) ($\mu\text{g/L}$)	21,01 (28,59)		
OC	AA	33,29 (12,71) (ng/mL)	-19,45 (26,33)	0,306	0,411
	AG	35,35 (11,37) (ng/mL)	-28,10 (14,95)		
	GG	29,10 (8,89) (ng/mL)	-24,68 (19,75)		
CTX	AA	0,5000 (0,23) (ng/mL)	-16,48 (38,85)	0,745	0,093
	AG	0,5082 (0,19) (ng/mL)	-24,13 (22,02)		
	GG	0,5545 (0,14) (ng/mL)	-41,95 (28,93)		
MKG izmerjena z DXA					
L1_L4	AA	0,731 (0,09) (g/cm^2)	1,67 (5,18)	0,173	0,888
	AG	0,763 (0,07) (g/cm^2)	2,36 (4,42)		
	GG	0,784 (0,06) (g/cm^2)	1,79 (4,81)		
Vrat stegenice	AA	0,619 (0,09) (g/cm^2)	-1,14 (5,61)	0,385	0,001
	AG	0,619 (0,07) (g/cm^2)	3,44 (3,26)		

	GG	0,66 (0,08) (g/cm ²)	-0,65 (3,71)		
Kolk	AA	0,71 (0,11) (g/cm ²)	0,95 (8,30)	0,833	0,848
	AG	0,73 (0,09) (g/cm ²)	0,68 (10,11)		
	GG	0,738 (0,09) (g/cm ²)	2,58 (8,66)		
UZ-parametri					
BUA	AA	52,13 (8,32) (dB/MHz)	1,75 (10,99)	0,590	0,777
	AG	56,05 (13,56) (dB/MHz)	1,21 (7,04)		
	GG	55,05 (9,42) (dB/MHz)	3,33 (8,03)		
SOS	AA	1513,24 (20,34) (m/s)	0,04 (0,50)	0,998	0,983
	AG	1513,68 (24,52) (m/s)	0,03 (0,76)		
	GG	1513,43 (12,09) (m/s)	0,08 (0,65)		
QUI	AA	70,79 (11,23)	1,07 (5,75)	0,913	0,965
	AG	72,59 (15,00)	0,94 (7,43)		
	GG	72,04 (7,70)	1,57 (5,95)		
MKG	AA	0,37 (0,07) (g/cm ²)	0,96 (7,24)	0,917	0,769
	AG	0,383 (0,09) (g/cm ²)	4,32 (18,51)		
	GG	0,379 (0,05) (g/cm ²)	2,10 (6,92)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.



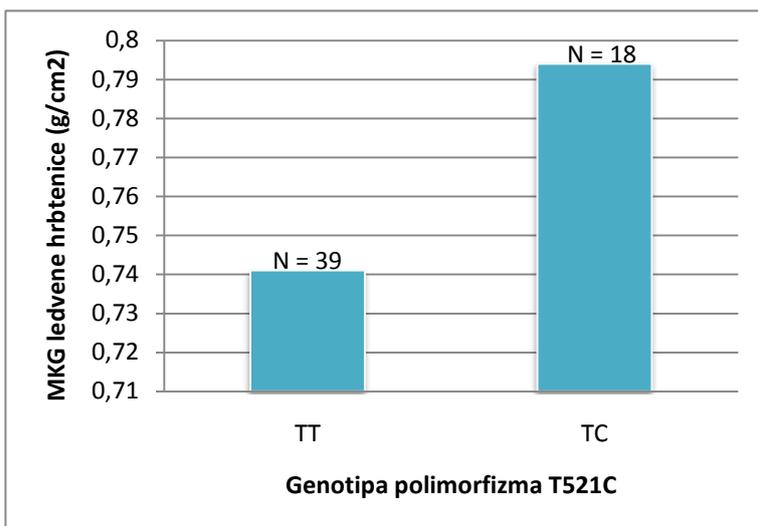
Slika 10: Delež MKG vratu stegenice (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G. N – število preiskovank s posameznim genotipom.

Ugotovili smo, da je MKG ledvene hrbtenice pred zdravljenjem z raloksifenom statistično značilno višja pri nosilkah genotipa TC polimorfizma 521T>C ($p = 0,009$) (preglednica 12 in slika 11). Sprememba parametra QUI je bila, v primerjavi z izhodiščnimi vrednostmi, po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom statistično značilno višja pri nosilkah genotipa TT ($p = 0,033$) polimorfizma 521T>C (preglednica 12 in slika 12). Povezave polimorfizma 521T>C z ostalimi označevalci kostne premene nismo ugotovili.

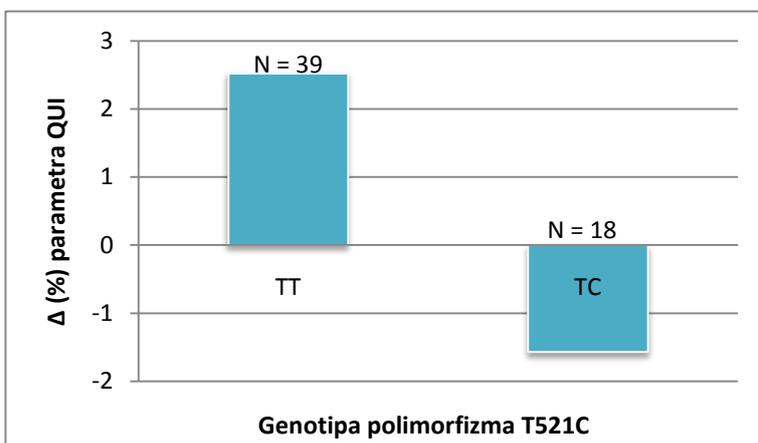
Preglednica 12: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
BOKP					
ALP	TT	1,140 (0,30) ($\mu\text{g/L}$)	-18,61 (23,06)	0,598	0,890
	TC	1,186 (0,29) ($\mu\text{g/L}$)	-19,42 (11,45)		
BALP	TT	12,57 (5,10) ($\mu\text{g/L}$)	26,09 (19,39)	0,445	0,204
	TC	11,36 (5,73) ($\mu\text{g/L}$)	15,29 (38,91)		
OC	TT	33,15 (10,94) (ng/mL)	-27,00 (18,80)	0,748	0,325
	TC	34,22 (12,38) (ng/mL)	-21,35 (20,83)		
CTX	TT	0,5311 (0,20) (ng/mL)	-27,36 (30,49)	0,407	0,651
	TC	0,4847 (0,16) (ng/mL)	-23,35 (27,73)		
MKG izmerjena z DXA					
L1_L4	TT	0,741 (0,06) (g/cm^2)	2,25 (4,93)	0,009	0,683
	TC	0,794 (0,07) (g/cm^2)	1,69 (4,06)		
Vrat stegenice	TT	0,62 (0,08) (g/cm^2)	0,97 (4,71)	0,424	0,363
	TC	0,638 (0,08) (g/cm^2)	2,19 (4,30)		
Kolk	TT	0,721 (0,10) (g/cm^2)	2,24 (9,44)	0,539	0,236
	TC	0,74 (0,08) (g/cm^2)	-0,97 (8,70)		
UZ-parametri					
BUA	TT	56,30 (13,06) (dB/MHz)	2,49 (7,86)	0,118	0,409
	TC	51,89 (7,14) (dB/MHz)	0,48 (9,01)		
SOS	TT	1514,12 (23,88) (m/s)	0,17 (0,64)	0,736	0,055
	TC	1512,32 (14,63) (m/s)	-0,20 (0,67)		
QUI	TT	72,87 (14,50)	2,52 (6,61)	0,414	0,033
	TC	70,31 (8,08)	-1,57 (5,99)		
MKG	TT	0,385 (0,09) (g/cm^2)	3,17 (8,62)	0,413	0,913
	TC	0,368 (0,05) (g/cm^2)	2,71 (21,72)		

Uporabljena statistična metoda: T-test. Nobena izmed preiskovank ni bila nosilka genotipa CC, zato smo statistično analizirali samo dve skupini.



Slika 11: MKG ledvene hrbtenice (povprečje) pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C. N – število preiskovank s posameznim genotipom.



Slika 12: Delež parametra QUI (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C. N – število preiskovank s posameznim genotipom.

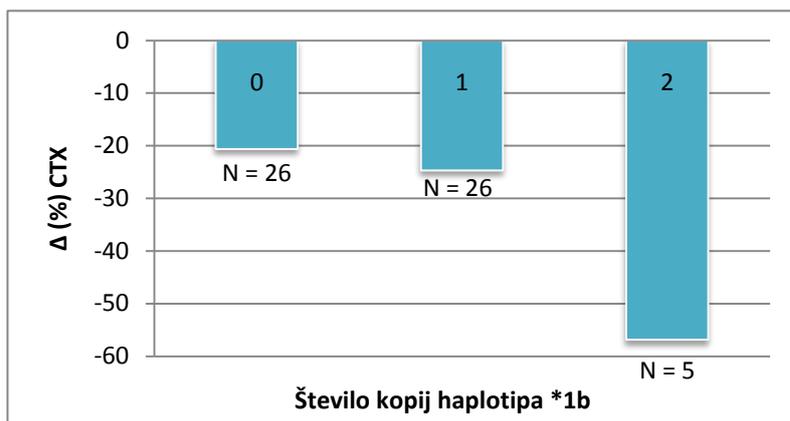
Ugotovili smo, da haplotip *1b statistično značilno vpliva na spremembo koncentracij CTX po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom ($p = 0,039$) (preglednica 13 in slika 13). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili statistično značilne razlike v deležu CTX, ki se je med zdravljenjem spremenil med preiskovankami, ki imajo dve, in tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *1b ($p = 0,035$).

Preglednica 13: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *1b.

Parameter	Št. kopij	Vrednosti pred	Δ (%)	p	p
-----------	-----------	----------------	-------	---	---

	haplotipa	zdravljenjem		(pred zdravljenjem)	(Δ)
BOKP					
ALP	0	1,152 (0,23) (μg/L)	-18,86 (13,80)	0,981	0,366
	1	1,155 (0,33) (μg/L)	-16,51 (24,98)		
	2	1,180 (0,41) (μg/L)	-30,42 (14,03)		
BALP	0	11,12 (3,25) (μg/L)	18,43 (32,06)	0,250	0,542
	1	13,50 (6,57) (μg/L)	27,15 (22,28)		
	2	10,71 (5,49) (μg/L)	15,77 (37,18)		
OC	0	34,16 (12,87) (ng/mL)	-22,47 (23,32)	0,505	0,400
	1	34,05 (10,50) (ng/mL)	-25,46 (15,15)		
	2	27,80 (6,43) (ng/mL)	-35,52 (16,94)		
CTX	0	0,4987 (0,20) (ng/mL)	-20,65 (31,88)	0,424	0,039
	1	0,5108 (0,17) (ng/mL)	-24,70 (24,45)		
	2	0,6200 (0,17) (ng/mL)	-56,86 (23,33)		
MKG izmerjena z DXA					
L1_L4	0	0,755 (0,09) (g/cm ²)	2,06 (4,88)	0,868	0,300
	1	0,760 (0,06) (g/cm ²)	1,44 (4,13)		
	2	0,773 (0,04) (g/cm ²)	5,00 (5,44)		
Vrat stegenice	0	0,63 (0,09) (g/cm ²)	0,70 (5,40)	0,417	0,172
	1	0,617 (0,07) (g/cm ²)	2,57 (3,69)		
	2	0,666 (0,08) (g/cm ²)	-1,03 (2,76)		
Kolk	0	0,73 (0,10) (g/cm ²)	-0,62 (9,67)	0,683	0,403
	1	0,718 (0,09) (g/cm ²)	2,21 (7,86)		
	2	0,759 (0,11) (g/cm ²)	4,51 (13,31)		
UZ-parametri					
BUA	0	52,16 (8,01) (dB/MHz)	0,51 (9,62)	0,292	0,560
	1	56,59 (14,18) (dB/MHz)	3,11 (7,08)		
	2	58,97 (10,84) (dB/MHz)	1,36 (7,05)		
SOS	0	1512,31 (18,29) (m/s)	-0,09 (0,62)	0,917	0,241
	1	1514,85 (25,28) (m/s)	0,09 (0,71)		
	2	1512,79 (12,32) (m/s)	0,44 (0,57)		
QUI	0	70,42 (10,14)	-0,52 (6,22)	0,719	0,233
	1	73,29 (15,57)	2,00 (7,16)		
	2	73,38 (8,56)	4,25 (4,67)		
MKG	0	0,369 (0,06) (g/cm ²)	2,57 (19,48)	0,724	0,954
	1	0,387 (0,10) (g/cm ²)	3,07 (9,29)		
	2	0,388 (0,05) (g/cm ²)	4,77 (5,60)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.



Slika 13: Delež koncentracij CTX (povprečje), ki se med zdravljenjem z raloksifenom spremenijo v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1b. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1b.

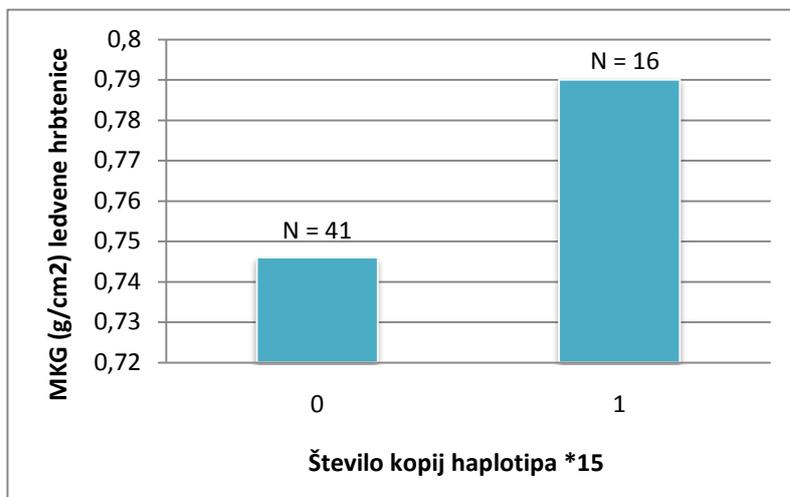
MKG ledvene hrbtenice je bila pred zdravljenjem z raloksifenom statistično značilno višja pri posameznikah, ki imajo eno kopijo haplotipa *15, v primerjavi s tistimi, ki nimajo nobene kopije ($p = 0,039$) (preglednica 14 in slika 14). Sprememba parametra SOS, glede na izhodiščne vrednosti, je bila po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom pri preiskovankah, ki imajo eno kopijo, v primerjavi s tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *15, statistično značilno večja ($p = 0,031$). Sprememba parametra QUI je, ravno obratno, po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom pri osebah, ki imajo eno kopijo, v primerjavi s tistimi, ki nimajo nobene kopije, statistično značilno manjša ($p = 0,030$) (preglednica 14 in slika 15).

Preglednica 14: Vrednosti BOKP in MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *15.

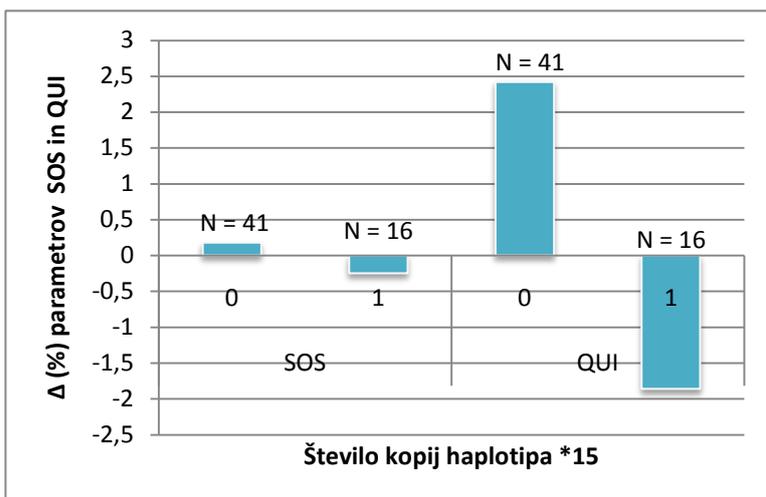
Parameter	Št. kopij haplotipa	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
BOKP					
ALP	0	1,160 (0,30) (μg/L)	-18,61 (22,42)	0,871	0,880
	1	1,146 (0,28) (μg/L)	-19,52 (12,13)		
BALP	0	12,64 (5,04) (μg/L)	25,75 (19,17)	0,352	0,226
	1	11,14 (5,84) (μg/L)	15,29 (40,19)		
OC	0	33,54 (10,92) (ng/mL)	-26,16 (19,96)	0,976	0,544
	1	33,44 (12,65) (ng/mL)	-22,56 (18,84)		
CTX	0	0,5239 (0,20) (ng/mL)	-25,42 (32,16)	0,652	0,807
	1	0,4981 (0,15) (ng/mL)	-27,36 (23,00)		

MKG izmerjena z DXA					
L1_L4	0	0,746 (0,07) (g/cm ²)	2,39 (4,83)	0,039	0,438
	1	0,790 (0,08) (g/cm ²)	1,30 (4,15)		
Vrat stegenice	0	0,620 (0,07) (g/cm ²)	1,15 (4,65)	0,309	0,573
	1	0,643(0,08) (g/cm ²)	1,93 (4,48)		
Kolk	0	0,722 (0,10) (g/cm ²)	2,25 (9,21)	0,571	0,190
	1	0,739 (0,08) (g/cm ²)	-1,39 (9,06)		
UZ-parametri					
BUA	0	56,00 (12,77) (dB/MHz)	2,07 (8,23)	0,167	0,721
	1	52,04 (7,53) (dB/MHz)	1,17 (8,52)		
SOS	0	1514,11 (23,49) (m/s)	0,18 (0,63)	0,710	0,031
	1	1512,13 (14,53) (m/s)	-0,25 (0,67)		
QUI	0	72,74 (14,21)	2,42 (6,44)	0,522	0,030
	1	70,29 (8,19)	-1,86 (6,29)		
MKG	0	0,384 (0,09) (g/cm ²)	3,08 (8,39)	0,433	0,959
	1	0,368 (0,05) (g/cm ²)	2,86 (23,11)		

Uporabljena statistična metoda: T-test. Nobena izmed preiskovank ni imela po dve kopiji haplotipa *15, zato smo statistično analizirali samo dve skupini.



Slika 14: MKG ledvene hrbtenice (povprečje) pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od števila kopij haplotipa *15. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *15.



Slika 15: Delež parametrov SOS in QUI (povprečje), ki se med zdravljenjem z raloksifenom spremenijo v odvisnosti od števila kopij haplotipa *15. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *15.

MKG ledvene hrbtenice se je pred zdravljenjem z raloksifenom ($p = 0,041$) statistično značilno razlikovala glede na število kopij haplotipa *1a (preglednica 15 in slika 16). Z Bonferroni *post-hoc* testom nismo potrdili statistično značilnih razlik med MKG ledvene hrbtenice pred zdravljenjem pri posameznikah z eno, dvema ali nobeno kopijo haplotipa *1a.

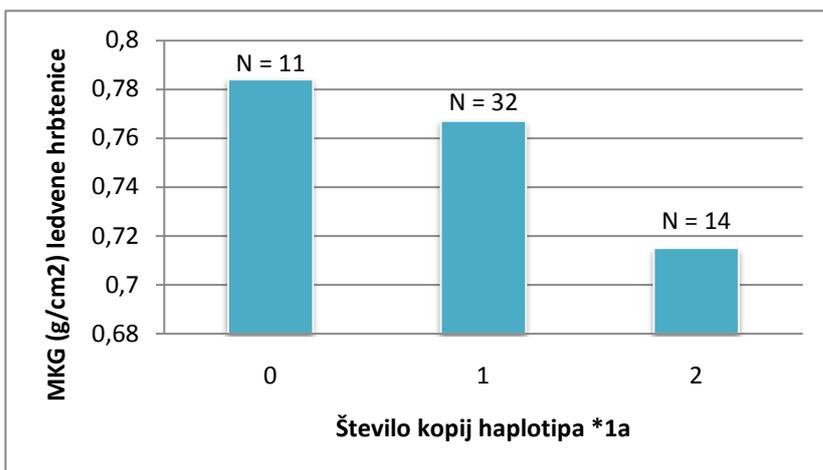
Haplotip *1a je značilno vplival na spremembo MKG vratu stegenice po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom ($p = 0,000$) (preglednica 15 in slika 17). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili statistično značilne razlike v deležu MKG, ki se je med zdravljenjem spremenil med preiskovankami, ki imajo eno, in tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *1a ($p = 0,013$), ter med preiskovankami, ki imajo eno, in tistimi, ki imajo dve kopiji tega haplotipa ($p = 0,000$).

Preglednica 15: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *1a.

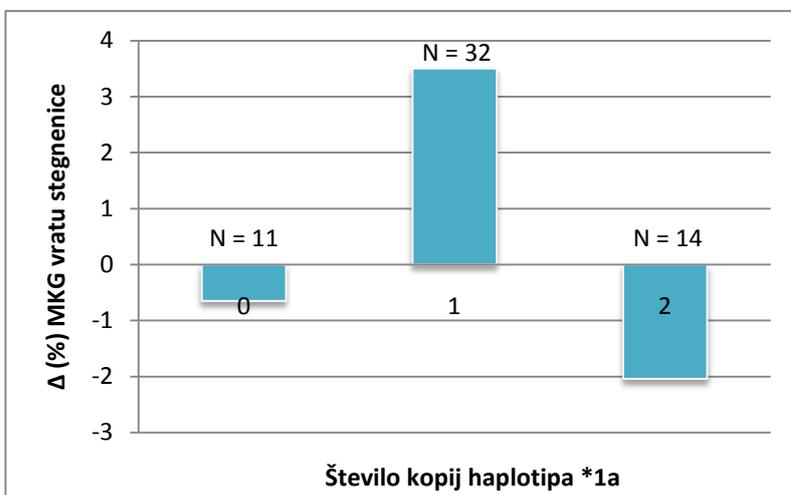
Parameter	Št. kopij haplotipa	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
BOKP					
ALP	0	1,165 (0,39) (μg/L)	-22,82 (16,04)	0,765	0,750
	1	1,174 (0,28) (μg/L)	-18,26 (22,07)		
	2	1,101 (0,23) (μg/L)	-16,83 (17,55)		
BALP	0	11,55 (7,17) (μg/L)	21,01 (28,59)	0,676	0,903

	1	12,76 (5,30) ($\mu\text{g/L}$)	21,24 (33,20)		
	2	11,34 (3,04) ($\mu\text{g/L}$)	25,49 (11,38)		
OC	0	29,10 (8,89) (ng/mL)	-24,68 (19,75)	0,231	0,655
	1	35,69 (11,23) (ng/mL)	-26,97 (17,07)		
	2	32,09 (13,00) (ng/mL)	-20,73 (25,27)		
CTX	0	0,5545 (0,14) (ng/mL)	-41,95 (28,93)	0,720	0,127
	1	0,5000 (0,19) (ng/mL)	-21,82 (24,84)		
	2	0,5192 (0,23) (ng/mL)	-21,25 (36,38)		
MKG izmerjena z DXA					
L1_L4	0	0,784 (0,06) (g/cm^2)	1,79 (4,81)	0,041	0,679
	1	0,767 (0,07) (g/cm^2)	2,52 (4,31)		
	2	0,715 (0,08) (g/cm^2)	1,15 (5,44)		
Vrat stegenice	0	0,66 (0,08) (g/cm^2)	-0,65 (3,71)	0,380	0,000
	1	0,618 (0,07) (g/cm^2)	3,50 (3,17)		
	2	0,622 (0,10) (g/cm^2)	-2,04 (5,54)		
Kolk	0	0,738 (0,09) (g/cm^2)	2,58 (8,66)	0,787	0,851
	1	0,73 (0,09) (g/cm^2)	0,80 (9,82)		
	2	0,71 (0,11) (g/cm^2)	0,70 (8,86)		
UZ-parametri					
BUA	0	55,05 (9,42) (dB/MHz)	3,33 (8,03)	0,705	0,600
	1	55,69 (13,17) (dB/MHz)	0,79 (7,51)		
	2	52,36 (8,96) (dB/MHz)	2,98 (10,57)		
SOS	0	1513,43 (12,09) (m/s)	0,08 (0,65)	0,997	0,972
	1	1513,69 (23,99) (m/s)	0,04 (0,74)		
	2	1513,13 (21,13) (m/s)	0,01 (0,50)		
QUI	0	72,04 (7,70)	1,57 (5,95)	0,935	0,964
	1	72,45 (14,61)	0,93 (7,18)		
	2	70,84 (11,81)	1,12 (6,27)		
MKG	0	0,379 (0,05) (g/cm^2)	2,10 (6,92)	0,939	0,794
	1	0,382 (0,09) (g/cm^2)	4,14 (17,88)		
	2	0,37 (0,07) (g/cm^2)	0,86 (7,90)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.



Slika 16: MKG ledvene hrbtenice (povprečje) pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1a. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1a.



Slika 17: Delež MKG vratu stegenice (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1a. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1a.

4.4.2 Vpliv polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1* in njihovih haplotipov na dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja

Ugotovili smo statistično značilno povezavo polimorfizma 388A>G in deleža koncentracij trigliceridov, ki se je, glede na izhodiščne koncentracije, po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremenil ($p = 0,041$) (preglednica 16 in slika 18). Z Bonferroni *post-hoc* testom statistično značilne povezave nismo potrdili.

Za analizo ostalih dejavnikov tveganja za bolezni srca in ožilja (celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf, EOD, END in dIM) smo zaradi boljših oziroma manj variabilnih rezultatov združili nemutirane homozigote in heterozigote ter s T-testom analizirali dve

skupini. Med genotipskima podskupinama AA+AG in GG smo pred uvedbo terapije z raloksifenom ugotovili statistično značilno razliko v koncentracijah medcelične adhezijske molekule ICAM-1 ($p = 0,020$) (preglednica 17 in slika 19). Vrednosti ICAM-1 so bile statistično značilno višje v skupini, ki jo sestavljata genotipa AA in AG. Pred zdravljenjem z raloksifenom smo ugotovili tudi statistično značilno razliko v debelini intime medije med genotipskima podskupinama AA+AG in GG ($p = 0,029$) (preglednica 17 in slika 20). Debelina intime medije je bila statistično značilno večja pri preiskovankah z genotipom GG, kar bi lahko pomenilo večje tveganje za srčno-žilna obolenja te genotipske podskupine.

Preglednica 16: Koncentracije krvnih maščob (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež krvnih maščob (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
Celotni HOL	AA	6,06 (1,03) (mmol/l)	0,08 (8,36)	0,787	0,368
	AG	6,26 (0,91) (mmol/l)	-3,82 (14,39)		
	GG	6,20 (0,62) (mmol/l)	-6,94 (6,56)		
HDL- holesterol	AA	1,77 (0,33) (mmol/l)	-1,27 (9,49)	0,314	0,379
	AG	1,63 (0,28) (mmol/l)	2,99 (16,56)		
	GG	1,63 (0,25) (mmol/l)	-3,88 (13,20)		
LDL- holesterol	AA	3,60 (0,85) (mmol/l)	2,75 (13,07)	0,415	0,132
	AG	3,91 (0,80) (mmol/l)	-6,10 (18,34)		
	GG	3,952 (0,58) (mmol/l)	-10,35 (11,14)		
Trigliceridi	AA	1,334 (0,56) (mmol/l)	12,92 (44,30)	0,372	0,041
	AG	1,63 (0,73) (mmol/l)	-6,70 (22,07)		
	GG	1,435 (0,62) (mmol/l)	21,31 (40,10)		

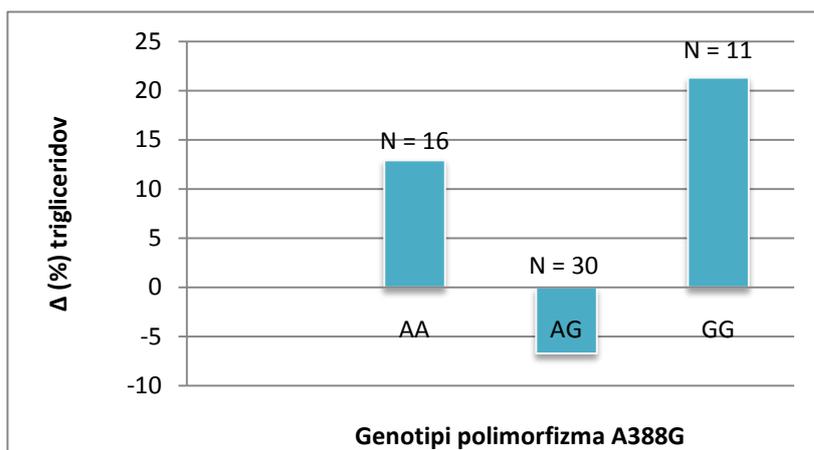
Uporabljena statistična metoda: ANOVA.

Preglednica 17: Vrednosti celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po 6 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G.

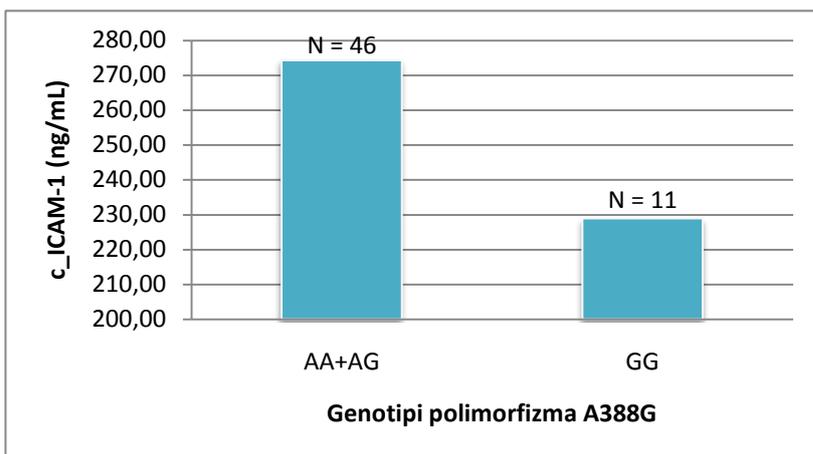
Parameter	Genotipi	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
E-selektin	AA+AG	40,80 (14,64) (ng/mL)	-11,06 (23,78)	0,926	0,615

	GG	41,44 (27,45) (ng/mL)	-15,50 (20,20)		
ICAM-1	AA+AG	274,27 (55,85) (ng/mL)	6,66 (19,88)	0,020	0,899
	GG	228,91 (54,31) (ng/mL)	5,80 (19,81)		
VCAM-1	AA+AG	522,79 (153,35) (ng/mL)	5,60 (26,89)	0,250	0,770
	GG	461,30 (129,46) (ng/mL)	8,18 (12,19)		
CRP	AA+AG	1,9695 (2,20) (mg/L)	120,95 (410,38)	0,998	0,474
	GG	1,967 (2,54) (mg/L)	26,01 (85,63)		
vWf	AA+AG	113,46 (44,63) (%)	63,19 (207,28)	0,825	0,464
	GG	109,90 (46,31) (%)	287,02 (867,54)		
EOD	AA+AG	7,969 (8,50) (%)	-68,02 (356,45)	0,879	0,059
	GG	7,5591 (5,07) (%)	188,40 (498,77)		
END	AA+AG	16,06 (10,07) (%)	19,04 (87,50)	0,079	0,573
	GG	27,05 (35,49) (%)	3,15 (58,55)		
dIM	AA+AG	0,85 (0,12) (mm)	-0,99 (5,09)	0,029	0,190
	GG	0,941 (0,15) (mm)	-3,63 (8,36)		

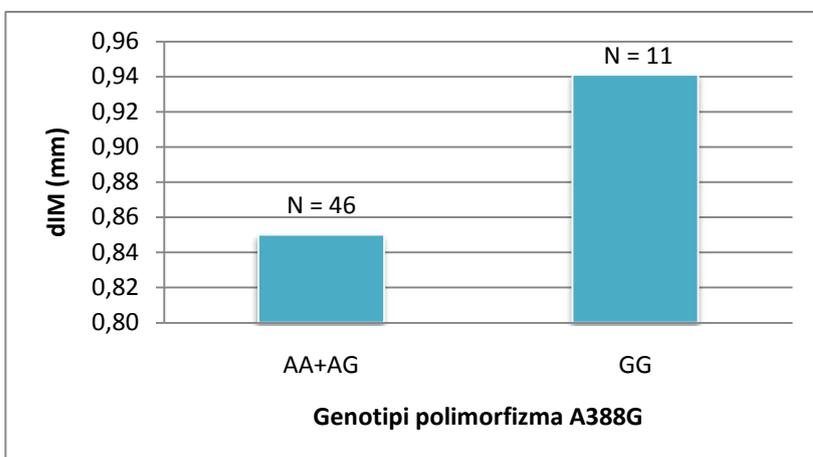
Uporabljena statistična metoda: T-test.



Slika 18: Delež koncentracije trigliceridov (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G. N – število preiskovank s posameznim genotipom.



Slika 19: Koncentracije ICAM-1 (povprečje) pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G. N – število preiskovank s posameznim genotipom.



Slika 20: dIM (povprečje) pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od genotipov polimorfizma 388A>G. N – število preiskovank s posameznim genotipom.

Polimorfizem 521T>C na izhodiščne vrednosti krvnih maščob ter celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf, EOD, END in dIM ni statistično značilno vplival (preglednica 18). Statistično značilne povezave med polimorfizmom 521T>C in spremembo posameznega dejavnika tveganja za bolezen srca in ožilja po zdravljenju z raloksifenom nismo ugotovili (preglednica 18).

Preglednica 18: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)

Celotni holesterol	TT	6,29 (0,87) (mmol/l)	-4,00 (10,63)	0,260	0,725
	TC	6,01 (0,89) (mmol/l)	-2,74 (14,23)		
HDL- holesterol	TT	1,69 (0,31) (mmol/l)	0,66 (14,25)	0,452	0,890
	TC	1,62 (0,25) (mmol/l)	0,06 (15,37)		
LDL- holesterol	TT	3,88 (0,79) (mmol/l)	-4,92 (14,74)	0,584	0,994
	TC	3,75 (0,76) (mmol/l)	-4,88 (19,32)		
Trigliceridi	TT	1,61 (0,73) (mmol/l)	-1,20 (35,63)	0,136	0,124
	TC	1,320 (0,47) (mmol/l)	14,58 (29,83)		
E-selektin	TT	42,04 (18,54) (ng/mL)	-11,59 (24,73)	0,577	0,842
	TC	38,50 (17,07) (ng/mL)	-13,20 (18,79)		
ICAM-1	TT	271,83 (60,85) (ng/mL)	5,71 (17,30)	0,206	0,692
	TC	249,94 (50,46) (ng/mL)	8,05 (24,36)		
VCAM-1	TT	509,24 (153,54) (ng/mL)	2,33 (13,90)	0,947	0,120
	TC	512,31 (146,07) (ng/mL)	13,96 (37,61)		
CRP	TT	2,112 (2,45) (mg/L)	56,35 (195,63)	0,536	0,371
	TC	1,7000 (1,84) (mg/L)	186,70 (568,02)		
vWf	TT	118,38 (41,31) (%)	27,18 (83,84)	0,205	0,231
	TC	100,60 (49,96) (%)	315,08 (784,71)		
EOD	TT	8,10 (6,82) (%)	-1,44 (425,84)	0,780	0,779
	TC	7,456 (9,80) (%)	-35,28 (354,70)		
END	TT	16,10 (8,04) (%)	5,27 (63,21)	0,368	0,198
	TC	22,69 (29,79) (%)	36,10 (109,35)		
dIM	TT	0,871 (0,11) (mm)	-1,83 (3,91)	0,746	0,626
	TC	0,86 (0,16) (mm)	-0,98 (8,72)		

Uporabljena statistična metoda: *T*-test. Nobena izmed preiskovank ni bila nosilka genotipa CC, zato smo statistično analizirali le dve genotipski podskupini.

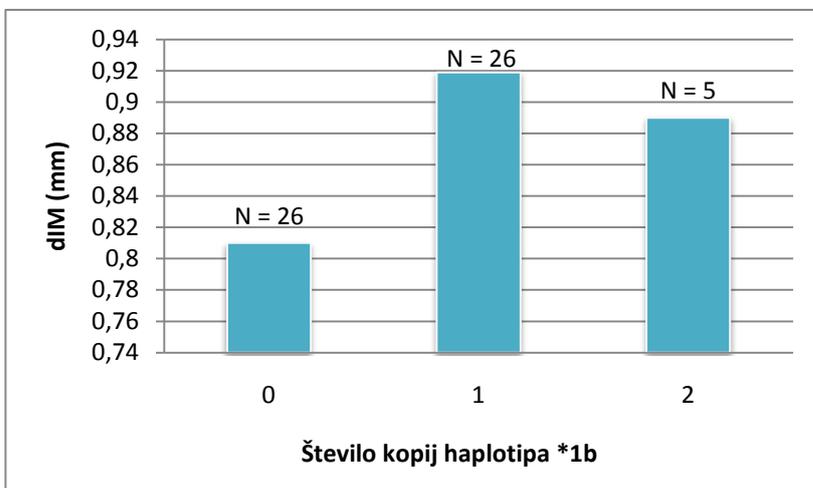
Statistično značilnega vpliva haplotipa *1b na spremembo dejavnikov tveganja za bolezni srca in ožilja po zdravljenju z raloksifenom nismo ugotovili (preglednica 19). Ugotovili pa smo, da se dIM pred zdravljenjem z raloksifenom ($p = 0,008$) statistično značilno razlikuje glede na število kopij haplotipa *1b (preglednica 19 in slika 21). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili statistično značilne razlike v dIM med osebami z eno ter tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *1b ($p = 0,007$). Debelina intime medije je bila najmanjša pri osebah, ki nimajo nobene kopije in največja pri tistih z eno kopijo haplotipa *1b.

Preglednica 19: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *1b.

Parameter	Št. kopij haplotipa	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
Celotni holesterol	0	5,95 (0,98) (mmol/l)	-0,83 (13,54)	0,188	0,228
	1	6,40 (0,77) (mmol/l)	-4,75 (10,50)		
	2	6,370 (0,69) (mmol/l)	-10,23 (6,59)		
HDL-olesterol	0	1,72 (0,30) (mmol/l)	-0,72 (13,59)	0,429	0,149
	1	1,61 (0,30) (mmol/l)	3,79 (15,14)		
	2	1,65 (0,20) (mmol/l)	-9,67 (11,83)		
LDL-olesterol	0	3,57 (0,80) (mmol/l)	-0,05 (18,82)	0,081	0,140
	1	4,05 (0,71) (mmol/l)	-7,81 (13,12)		
	2	4,048 (0,68) (mmol/l)	-12,95 (12,95)		
Trigliceridi	0	1,30 (0,53) (mmol/l)	8,73 (36,04)	0,098	0,626
	1	1,70 (0,72) (mmol/l)	-0,99 (30,69)		
	2	1,61 (0,81) (mmol/l)	7,83 (46,18)		
E-selektin	0	41,67 (13,81) (ng/mL)	-12,52 (13,75)	0,676	0,912
	1	38,84 (15,88) (ng/mL)	-9,02 (29,74)		
	2	46,80 (34,54) (ng/mL)	-22,42 (11,46)		
ICAM-1	0	273,04 (49,81) (ng/mL)	6,55 (19,48)	0,156	0,912
	1	266,38 (62,58) (ng/mL)	7,14 (20,96)		
	2	218,00 (60,99) (ng/mL)	2,92 (17,41)		
VCAM-1	0	541,65 (156,09) (ng/mL)	10,26 (33,29)	0,173	0,419
	1	500,67 (147,24) (ng/mL)	0,73 (11,89)		
	2	406,00 (80,50) (ng/mL)	9,78 (11,95)		
CRP	0	1,8896 (2,19) (mg/L)	149,73 (501,10)	0,877	0,671
	1	1,943 (2,06) (mg/L)	75,22 (233,88)		
	2	2,46 (3,66) (mg/L)	5,68 (28,46)		
vWf	0	103,00 (45,19) (%)	100,13 (273,91)	0,402	0,790
	1	118,00 (47,46) (%)	154,26 (597,93)		
	2	128,20 (17,92) (%)	1,83 (22,25)		
EOD	0	6,744 (8,63) (%)	-91,80 (370,50)	0,565	0,103
	1	9,162 (7,54) (%)	-11,57 (313,22)		
	2	7,2220 (5,65) (%)	329,71 (732,68)		
END	0	14,96 (11,00) (%)	26,88 (103,48)	0,344	0,675
	1	22,46 (24,77) (%)	6,97 (62,37)		
	2	14,76 (6,38) (%)	4,37 (47,90)		

dIM	0	0,81 (0,12) (mm)	-0,55 (5,65)	0,008	0,375
	1	0,919 (0,13) (mm)	-2,80 (6,59)		
	2	0,89 (0,08) (mm)	-0,25 (2,14)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.



Slika 21: dIM (povprečje) pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1b. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1b.

Ugotovili smo, da haplotip *15 ne vpliva statistično značilno na dejavnike tveganja za bolezen srca in ožilja pred zdravljenjem z raloksifenom. Prav tako nismo ugotovili statistično značilnega vpliva haplotipa *15 na spremembo dejavnikov tveganja po zdravljenju z raloksifenom (preglednica 20).

Preglednica 20: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *15.

Parameter	Št. kopij haplotipa	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
Celotni holesterol	0	6,33 (0,89) (mmol/l)	-3,95 (10,47)	0,106	0,747
	1	5,90 (0,80) (mmol/l)	-2,77 (14,69)		
HDL-holesterol	0	1,68 (0,30) (mmol/l)	0,52 (14,05)	0,634	0,963
	1	1,64 (0,26) (mmol/l)	0,31 (15,83)		
LDL-holesterol	0	3,91 (0,80) (mmol/l)	-4,78 (14,54)	0,295	0,935
	1	3,66 (0,69) (mmol/l)	-5,19 (19,91)		
Trigliceridi	0	1,62 (0,71) (mmol/l)	-0,70 (35,21)	0,073	0,145

	1	1,262 (0,46) (mmol/l)	14,52 (30,81)		
E-selektin	0	41,71 (18,27) (ng/mL)	-11,28 (24,32)	0,677	0,732
	1	39,00 (17,82) (ng/mL)	-14,12 (19,42)		
ICAM-1	0	270,67 (60,38) (ng/mL)	5,80 (17,06)	0,269	0,712
	1	251,19 (51,85) (ng/mL)	8,01 (25,16)		
VCAM-1	0	507,50 (151,54) (ng/mL)	2,58 (13,77)	0,849	0,279
	1	516,47 (150,21) (ng/mL)	14,15 (38,92)		
CRP	0	2,0458 (2,40) (mg/L)	121,84 (432,43)	0,716	0,568
	1	1,796 (1,94) (mg/L)	55,64 (151,40)		
vWf	0	118,64 (40,69) (%)	28,36 (82,58)	0,163	0,239
	1	98,714 (51,29) (%)	338,14 (818,73)		
EOD	0	7,718 (6,84) (%)	-36,72 (467,23)	0,818	0,512
	1	8,268 (10,11) (%)	44,90 (146,19)		
END	0	15,59 (8,14) (%)	15,43 (89,02)	0,266	0,967
	1	24,69 (31,09) (%)	16,45 (65,88)		
dIM	0	0,869 (0,11) (mm)	-1,83 (3,81)	0,814	0,694
	1	0,86 (0,17) (mm)	-0,87 (9,27)		

Uporabljena statistična metoda: T-test. Nobena izmed preiskovank ni imela po dve kopiji haplotipa *15, zato smo statistično analizirali le dve skupini.

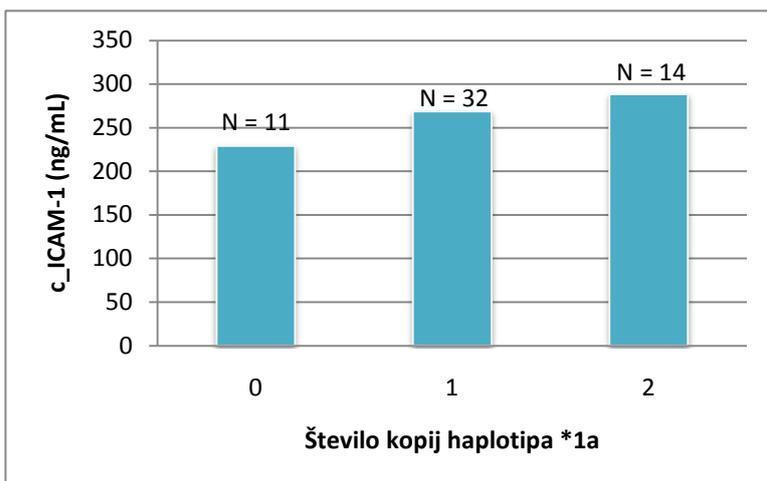
Haplotip *1a ni značilno vplival na spremembo posameznih dejavnikov tveganja za bolezni srca in ožilja po zdravljenju z raloksifenom (preglednica 21). Ugotovili pa smo, da je haplotip *1a statistično značilno vplival na koncentracije ICAM-1 pred zdravljenjem ($p = 0,040$) (preglednica 21 in slika 22). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili, da so izhodiščne koncentracije ICAM-1 statistično značilno višje pri preiskovankah, ki imajo dve kopiji v primerjavi s tistimi, ki nimajo nobene kopije tega haplotipa ($p = 0,041$).

Preglednica 21: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od haplotipa *1a.

Parameter	Št. kopij haplotipa	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
Celotni holesterol	0	6,20 (0,62) (mmol/l)	-6,94 (6,56)	0,468	0,363
	1	6,30 (0,93) (mmol/l)	-3,76 (14,13)		
	2	5,93 (0,96) (mmol/l)	0,29 (8,74)		
HDL-	0	1,63 (0,25) (mmol/l)	-3,88 (13,20)	0,151	0,416

holesterol	1	1,62 (0,27) (mmol/l)	2,74 (16,30)		
	2	1,81 (0,34) (mmol/l)	-1,02 (9,91)		
LDL- holesterol	0	3,952 (0,58) (mmol/l)	-10,35 (11,14)		
	1	3,94 (0,82) (mmol/l)	-5,88 (18,03)	0,155	0,140
	2	3,46 (0,74) (mmol/l)	3,00 (13,67)		
Trigliceridi	0	1,435 (0,62) (mmol/l)	21,31 (40,10)		
	1	1,64 (0,70) (mmol/l)	-5,91 (22,06)	0,227	0,051
	2	1,258 (0,56) (mmol/l)	12,67 (46,45)		
E-selektin	0	41,44 (27,45) (ng/mL)	-15,50 (20,20)		
	1	40,09 (16,12) (ng/mL)	-11,95 (26,43)	0,925	0,821
	2	43,14 (8,67) (ng/mL)	-8,13 (12,60)		
ICAM-1	0	228,91 (54,31) (ng/mL)	5,80 (19,81)		
	1	268,48 (59,33) (ng/mL)	7,24 (22,62)	0,040	0,952
	2	288,25 (45,61) (ng/mL)	5,26 (11,45)		
VCAM-1	0	461,30 (129,46) (ng/mL)	8,18 (12,19)		
	1	501,67 (147,36) (ng/mL)	6,40 (30,48)	0,216	0,916
	2	570,33 (162,32) (ng/mL)	3,79 (17,21)		
CRP	0	1,967 (2,54) (mg/L)	26,01 (85,63)		
	1	1,9520 (2,17) (mg/L)	150,53 (471,79)	0,997	0,544
	2	2,017 (2,38) (mg/L)	35,18 (87,18)		
vWf	0	109,90 (46,31) (%)	287,02 (867,54)		
	1	118,11 (44,07) (%)	67,99 (235,96)	0,575	0,419
	2	100,90 (46,00) (%)	49,39 (94,13)		
EOD	0	7,5591 (5,07) (%)	188,40 (498,77)		
	1	8,667 (9,66) (%)	-59,48 (369,20)	0,662	0,167
	2	6,223 (4,28) (%)	-90,54 (336,32)		
END	0	27,05 (35,49) (%)	3,15 (58,55)		
	1	16,67 (10,92) (%)	26,38 (92,15)	0,205	0,567
	2	14,53 (7,74) (%)	0,67 (75,08)		
dIM	0	0,941 (0,15) (mm)	-3,63 (8,36)		
	1	0,86 (0,11) (mm)	-0,25 (5,39)	0,067	0,185
	2	0,822 (0,14) (mm)	-2,85 (3,82)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.



Slika 22: Koncentracije ICAM-1 (povprečje) pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od števila kopij haplotipa *1a. N – število preiskovank z določenim številom kopij haplotipa *1a.

4.4.3 Povezanost polimorfizma 3435C>T v genu *ABCB1* s farmakodinamskimi parametri

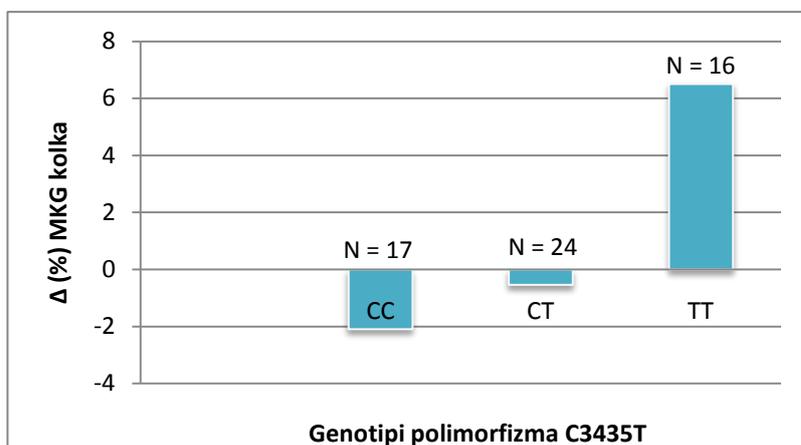
Ugotovili smo statistično značilno razliko v deležu MKG celotnega kolka, ki se je, glede na izhodiščne vrednosti, po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremenil med genotipskimi podskupinami polimorfizma 3435C>T v genu *ABCB1* ($p = 0,016$) (preglednica 22 in slika 23). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo to statistično značilnost potrdili za genotipa CC in TT ($p = 0,024$). Zvečanje MKG med zdravljenjem z raloksifenom je izmerjeno pri preiskovankah z genotipom TT.

Preglednica 22: Vrednosti BOKP in MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP in MKG (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
ALP	CC	1,143 (0,37) ($\mu\text{g/L}$)	-20,14 (15,87)	0,733	0,386
	CT	1,129 (0,22) ($\mu\text{g/L}$)	-14,66 (25,94)		
	TT	1,204 (0,31) ($\mu\text{g/L}$)	-23,51 (11,25)		
BALP	CC	12,11 (6,47) ($\mu\text{g/L}$)	23,73 (22,99)	0,976	0,434
	CT	12,04 (5,34) ($\mu\text{g/L}$)	16,87 (36,11)		
	TT	12,43 (4,13) ($\mu\text{g/L}$)	29,88 (13,37)		
OC	CC	29,96 (9,76) (ng/mL)	-25,39 (19,55)	0,098	0,770
	CT	32,40 (12,77) (ng/mL)	-26,85 (20,22)		
	TT	38,36 (9,46) (ng/mL)	-22,07 (19,41)		

CTX	CC	0,5071 (0,19) (ng/mL)	-22,91 (28,09)	0,966	0,601
	CT	0,5236 (0,19) (ng/mL)	-30,85 (25,48)		
	TT	0,5131 (0,20) (ng/mL)	-21,86 (36,21)		
MKG L1_L4	CC	0,77 (0,05) (g/cm ²)	0,90 (4,06)	0,506	0,523
	CT	0,764 (0,09) (g/cm ²)	2,44 (4,41)		
	TT	0,742 (0,06) (g/cm ²)	2,62 (5,43)		
MKG vratu stegenice	CC	0,66 (0,06) (g/cm ²)	0,51 (4,75)	0,098	0,587
	CT	0,605 (0,07) (g/cm ²)	2,09 (4,03)		
	TT	0,625 (0,08) (g/cm ²)	1,22 (5,21)		
MKG kolka	CC	0,772 (0,08) (g/cm ²)	-2,09 (9,52)	0,071	0,016
	CT	0,72 (0,09) (g/cm ²)	-0,54 (4,10)		
	TT	0,695 (0,10) (g/cm ²)	6,50 (11,93)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.



Slika 23: Delež MKG celotnega kolka (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T. N – število preiskovank s posameznim genotipom.

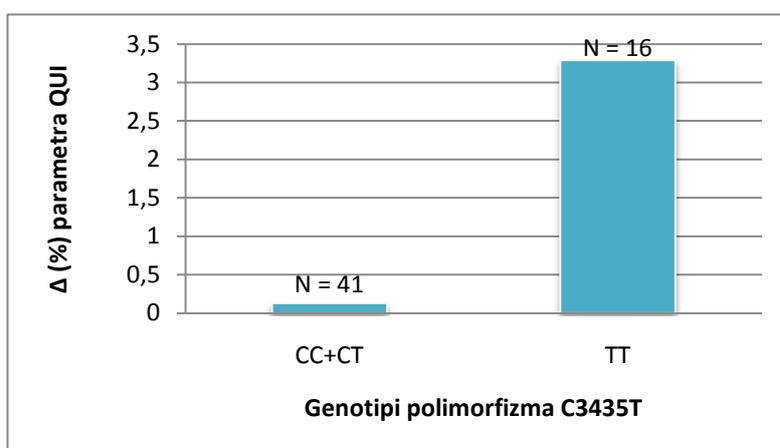
Za analizo UZ-parametrov smo, zaradi boljših oziroma manj variabilnih rezultatov, združili nemutirane homozigote in heterozigote ter s T-testom analizirali dve skupini. Polimorfizem 3435C>T je statistično značilno vplival na spremembo parametra QUI po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom ($p = 0,048$) (preglednica 23 in slika 24). Največji prirastek so imeli mutirani homozigoti.

Preglednica 23: Vrednosti UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom ter delež vrednosti UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremenijo v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred	Δ (%)	p	p
-----------	---------	----------------	-------	---	---

		zdravljenjem		(pred zdravljenjem)	Δ
BUA	CC+CT	54,38 (10,80) (dB/MHz)	1,08 (7,75)	0,685	0,357
	TT	55,79 (13,35) (dB/MHz)	3,39 (9,33)		
SOS	CC+CT	1514,20 (21,43) (m/s)	-0,06 (0,73)	0,721	0086
	TT	1511,92 (20,79) (m/s)	0,28 (0,45)		
QUI	CC+CT	72,11 (12,62)	0,13 (7,41)	0,925	0,048
	TT	71,75 (13,19)	3,29 (3,77)		
MKG	CC+CT	0,380 (0,08) (g/cm ²)	2,50 (17,04)	0,923	0,589
	TT	0,377 (0,08) (g/cm ²)	4,16 (4,30)		

Uporabljena statistična metoda: T-test.



Slika 24: Delež parametra QUI (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni, v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T. N – število preiskovank s posameznim genotipom.

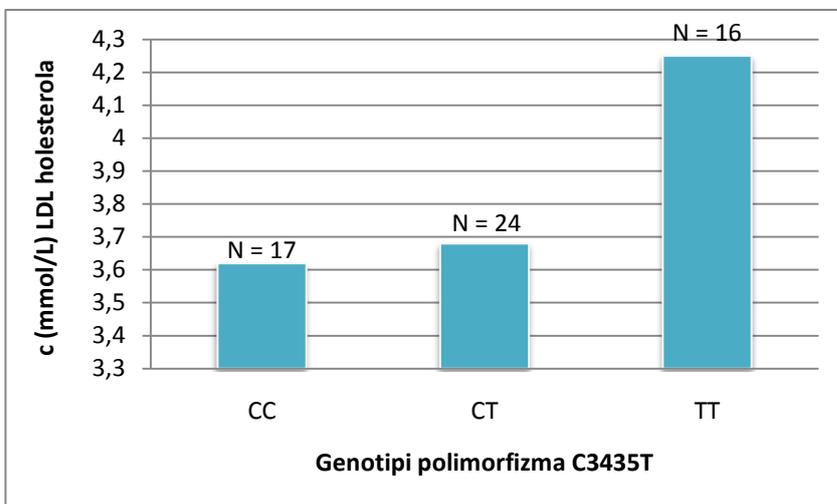
Genotipi polimorfizma 3435C>T so statistično značilno vplivali na koncentracije LDL-holesterola pred zdravljenjem z raloksifenom ($p = 0,034$) (preglednica 24 in slika 25). Vrednosti LDL-holesterola so bile pred zdravljenjem najvišje pri posameznikah z genotipom TT in najnižje pri nosilkah genotipa CC. Statistično značilnost razlik smo preverili tudi z Bonferroni *post-hoc* testom, ki pa ni dosegel meje statistične značilnosti. Polimorfizem 3435C>T je statistično značilno vplival tudi na delež END, ki se je, glede na izhodiščne vrednosti, po 6 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremenil ($p = 0,036$) (preglednica 24 in slika 26). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili, da je ta delež pri preiskovankah z genotipom CT statistično značilno višji kot pri tistih z genotipom TT ($p = 0,035$).

Preglednica 24: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T.

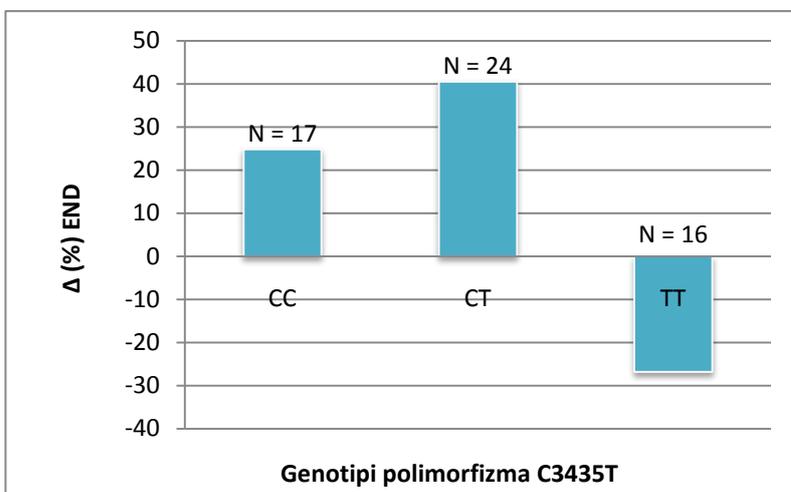
Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
Celotni holesterol	CC	5,94 (1,06) (mmol/l)	-1,48 (16,24)	0,129	0,676
	CT	6,11 (0,73) (mmol/l)	-3,67 (9,23)		
	TT	6,55 (0,82) (mmol/l)	-5,50 (10,88)		
HDL-olesterol	CC	1,69 (0,32) (mmol/l)	-0,60 (15,37)	0,102	0,939
	CT	1,74 (0,27) (mmol/l)	1,18 (15,15)		
	TT	1,54 (0,26) (mmol/l)	0,38 (13,48)		
LDL-olesterol	CC	3,62 (0,79) (mmol/l)	-1,80 (22,03)	0,034	0,543
	CT	3,68 (0,72) (mmol/l)	-4,53 (11,98)		
	TT	4,25 (0,70) (mmol/l)	-8,62 (15,88)		
Trigliceridi	CC	1,357 (0,55) (mmol/l)	16,64 (39,32)	0,116	0,282
	CT	1,41 (0,60) (mmol/l)	-0,82 (25,98)		
	TT	1,80 (0,79) (mmol/l)	-0,47 (39,59)		
E-selektin	CC	36,36 (12,69) (ng/mL)	-15,35 (12,42)	0,050	0,583
	CT	35,80 (15,21) (ng/mL)	-7,19 (33,10)		
	TT	50,77 (21,43) (ng/mL)	-14,96 (13,97)		
ICAM-1	CC	253,47 (59,73) (ng/mL)	0,71 (10,65)	0,404	0,367
	CT	277,36 (66,98) (ng/mL)	10,10 (24,28)		
	TT	257,27 (39,36) (ng/mL)	6,93 (18,86)		
VCAM-1	CC	514,29 (156,79) (ng/mL)	-0,79 (10,86)	0,893	0,361
	CT	518,95 (150,70) (ng/mL)	11,49 (34,38)		
	TT	494,87 (150,74) (ng/mL)	5,43 (16,07)		
CRP	CC	0,9950 (0,55) (mg/L)	189,8 (618,38)	0,077	0,376
	CT	1,9491 (1,88) (mg/L)	120,02 (260,95)		
	TT	2,85 (3,21) (mg/L)	2,48 (67,36)		
vWf	CC	121,14 (49,45) (%)	31,46 (78,62)	0,569	0,216
	CT	104,95 (47,87) (%)	272,24 (705,58)		
	TT	115,54 (33,50) (%)	6,23 (33,25)		
EOD	CC	7,969 (6,76) (%)	-74,50 (396,17)	0,081	0,725
	CT	5,425 (4,35) (%)	36,14 (531,40)		
	TT	11,19 (11,18) (%)	-29,69 (77,48)		
END	CC	15,40 (7,62) (%)	24,81 (112,10)	0,764	0,036
	CT	19,94 (26,23) (%)	40,48 (70,40)		
	TT	18,89 (12,52) (%)	-26,79 (42,25)		

dIM	CC	0,90 (0,15) (mm)	0,22 (4,83)	0,459	0,294
	CT	0,864 (0,11) (mm)	-2,89 (7,76)		
	TT	0,840 (0,13) (mm)	-1,34 (3,09)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.



Slika 25: Koncentracije LDL-holesterola (povprečje) pred zdravljenjem z raloksifenom v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T. N – število preiskovank s posameznim genotipom.



Slika 26: Delež END (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3435C>T. N – število preiskovank s posameznim genotipom.

4.4.4 Povezanost polimorfizma 3972C>T v genu *ABCC2* s farmakodinamskimi parametri

Polimorfizem 3972C>T ni statistično značilno vplival na vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in celotnega kolka ter na vrednosti UZ-parametrov pred uvedbo

terapije z raloksifenom. Prav tako ni statistično značilno vplival na spremembo BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in celotnega kolka in UZ-parametrov po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom (preglednica 25).

Preglednica 25: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3972C>T.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
BOKP					
ALP	CC	1,198 (0,31) ($\mu\text{g/L}$)	-15,77 (25,32)	0,584	0,540
	CT	1,106 (0,26) ($\mu\text{g/L}$)	-20,89 (13,08)		
	TT	1,142 (0,32) ($\mu\text{g/L}$)	-23,30 (13,03)		
BALP	CC	13,48 (5,45) ($\mu\text{g/L}$)	28,41 (22,09)	0,102	0,269
	CT	10,05 (5,06) ($\mu\text{g/L}$)	13,82 (35,55)		
	TT	12,80 (4,31) ($\mu\text{g/L}$)	22,52 (23,15)		
OC	CC	35,21 (10,56) (ng/mL)	-24,37 (17,88)	0,594	0,635
	CT	32,11 (13,29) (ng/mL)	-23,24 (22,89)		
	TT	31,74 (9,33) (ng/mL)	-30,67 (16,88)		
CTX	CC	0,5321 (0,18) (ng/mL)	-19,08 (28,58)	0,741	0,315
	CT	0,5153 (0,20) (ng/mL)	-31,99 (26,68)		
	TT	0,4744 (0,20) (ng/mL)	-31,19 (35,97)		
MKG izmerjena z DXA					
L1_L4	CC	0,753 (0,07) (g/cm^2)	1,98 (5,06)	0,076	0,608
	CT	0,785 (0,07) (g/cm^2)	1,53 (3,46)		
	TT	0,721 (0,05) (g/cm^2)	3,41 (5,68)		
Vrat stegenice	CC	0,617 (0,06) (g/cm^2)	2,47 (4,01)	0,642	0,269
	CT	0,64 (0,10) (g/cm^2)	0,41 (4,07)		
	TT	0,63 (0,08) (g/cm^2)	0,42 (6,58)		
Kolk	CC	0,72 (0,10) (g/cm^2)	0,40 (10,73)	0,915	0,809
	CT	0,734 (0,10) (g/cm^2)	2,25 (6,73)		
	TT	0,73 (0,10) (g/cm^2)	0,92 (10,11)		
UZ-parametri					
BUA	CC	56,78 (11,97) (dB/MHz)	1,90 (7,24)	0,405	0,431
	CT	52,03 (10,63) (dB/MHz)	0,22 (8,56)		
	TT	55,19 (12,15) (dB/MHz)	4,63 (10,29)		
SOS	CC	1515,74 (21,44) (m/s)	0,02 (0,73)	0,575	0,660
	CT	1509,38 (21,82) (m/s)	0,15 (0,65)		

	TT	1516,03 (19,25) (m/s)	-0,09 (0,54)		
QUI	CC	73,74 (13,00)	0,72 (6,38)	0,479	0,840
	CT	69,16 (12,66)	1,86 (7,81)		
	TT	73,18 (12,03)	0,64 (5,21)		
MKG	CC	0,390 (0,08) (g/cm ²)	4,04 (18,50)	0,487	0,844
	CT	0,361 (0,08) (g/cm ²)	2,69 (10,50)		
	TT	0,39 (0,08) (g/cm ²)	0,79 (6,32)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.

Ugotovili smo, da polimorfizem 3972C>T statistično značilno vpliva na delež celotnega (p = 0,019) in LDL-holesterola (p = 0,014), ki se je, glede na izhodiščne vrednosti, po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremenil (preglednica 26 in slika 27). Z Bonferroni *post-hoc* testom smo potrdili, da je sprememba v koncentracijah celotnega (p = 0,006) in LDL-holesterola (p = 0,003) po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom, pri preiskovankah z genotipom TT statistično značilno višja kot pri tistih z genotipom CT.

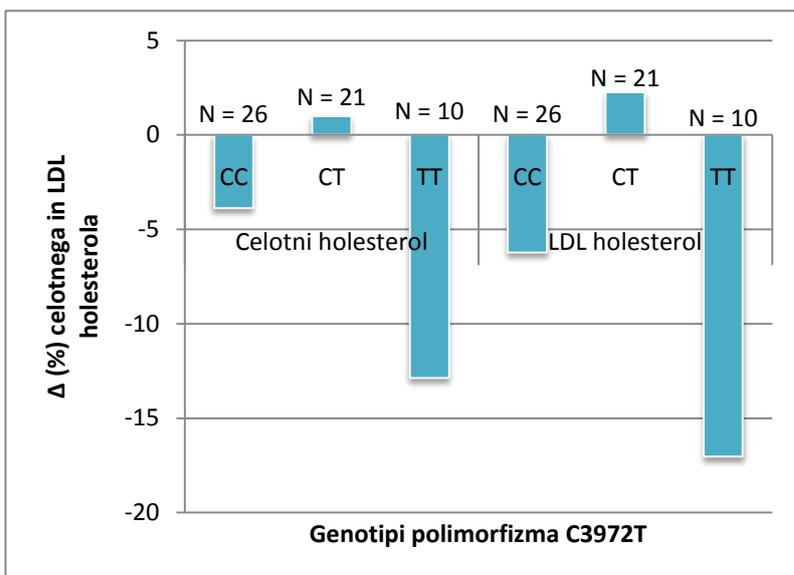
Polimorfizem 3972C>T je statistično značilno vplival tudi na delež EOD, ki se je, v primerjavi z izhodiščnimi vrednostmi, med zdravljenjem z raloksifenom spremenil (p = 0,048) (preglednica 26 in slika 28). Z Bonferroni *post-hoc* testom statistično značilne razlike med genotipskimi podskupinami nismo potrdili, saj test ni dosegel meje statistične značilnosti.

Preglednica 26: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3972C>T.

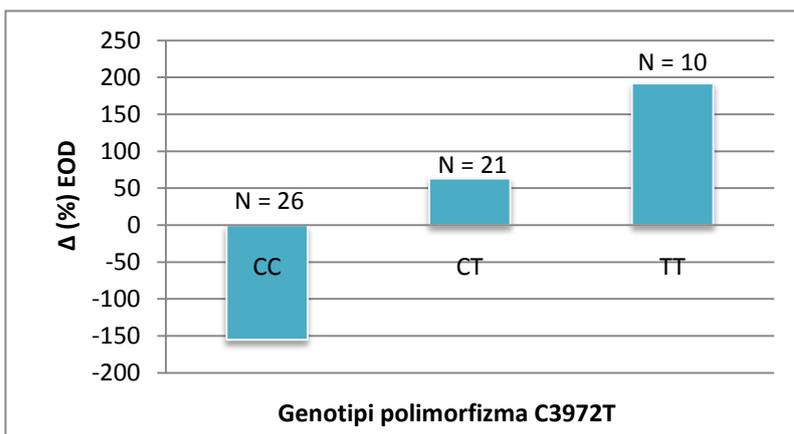
Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
Celotni holesterol	CC	6,22 (0,73) (mmol/l)	-3,89 (10,05)	0,091	0,019
	CT	5,93 (1,01) (mmol/l)	0,98 (13,21)		
	TT	6,699 (0,82) (mmol/l)	-12,87 (8,60)		
HDL-holesterol	CC	1,73 (0,31) (mmol/l)	-1,04 (15,66)	0,348	0,133
	CT	1,63 (0,28) (mmol/l)	5,40 (13,47)		
	TT	1,58 (0,22) (mmol/l)	-6,17 (10,04)		
LDL-holesterol	CC	3,81 (0,59) (mmol/l)	-6,24 (14,15)	0,072	0,014
	CT	3,63 (0,92) (mmol/l)	2,25 (17,74)		
	TT	4,337 (0,74) (mmol/l)	-17,04 (10,91)		
Trigliceridi	CC	1,50 (0,52) (mmol/l)	1,99 (28,15)	0,218	0,415

	CT	1,368 (0,57) (mmol/l)	11,87 (39,07)		
	TT	1,84 (1,07) (mmol/l)	-6,63 (40,31)		
E-selektin	CC	35,79 (12,66) (ng/mL)	-9,08 (26,29)	0,218	0,524
	CT	45,38 (17,92) (ng/mL)	-11,81 (22,21)		
	TT	46,71 (27,41) (ng/mL)	-20,75 (11,14)		
ICAM-1	CC	276,56 (66,33) (ng/mL)	6,22 (19,17)	0,366	0,528
	CT	255,17 (51,21) (ng/mL)	9,77 (22,51)		
	TT	250,67 (43,33) (ng/mL)	0,60 (14,99)		
VCAM-1	CC	509,35 (127,23) (ng/mL)	2,04 (15,00)	0,738	0,409
	CT	494,12 (145,85) (ng/mL)	12,51 (36,91)		
	TT	543,00 (213,29) (ng/mL)	4,51 (11,27)		
CRP	CC	2,1268 (2,51) (mg/L)	174,25 (534,81)	0,571	0,428
	CT	1,530 (1,57) (mg/L)	64,42 (129,30)		
	TT	2,41 (2,73) (mg/L)	-1,75 (34,63)		
vWf	CC	116,00 (49,26) (%)	88,65 (261,39)	0,412	0,583
	CT	101,50 (40,05) (%)	204,66 (690,95)		
	TT	125,63 (37,91) (%)	-1,08 (23,54)		
EOD	CC	5,9524 (5,68) (%)	-155,27 (433,80)	0,234	0,048
	CT	9,318 (10,22) (%)	63,03 (171,64)		
	TT	10,221 (6,91) (%)	191,68 (546,30)		
END	CC	14,51 (8,20) (%)	28,41 (100,54)	0,255	0,518
	CT	23,83 (28,65) (%)	-0,61 (65,40)		
	TT	17,36 (7,61) (%)	15,06 (52,10)		
dIM	CC	0,869 (0,13) (mm)	-1,99 (3,82)	0,985	0,290
	CT	0,866 (0,14) (mm)	-2,29 (8,67)		
	TT	0,860 (0,11) (mm)	1,29 (1,96)		

Uporabljena statistična metoda: ANOVA.



Slika 27: Delež koncentracij celotnega in LDL-holesterola (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremenijo v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3972C>T. N – število preiskovank s posameznim genotipom.



Slika 28: Delež EOD (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma 3972C>T. N – število preiskovank s posameznim genotipom.

4.4.5 Povezanost polimorfizma C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* s farmakodinamskimi parametri

Samo ena izmed preiskovank je bila polimorfni homozigot za polimorfizem C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*, zato smo jo združili s heterozigoti ter statistično analizirali dve skupini genotipov: CC in CG+GG.

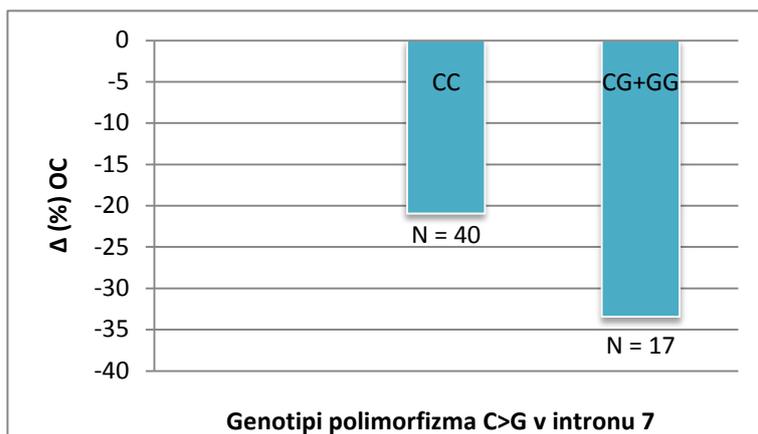
Statistično značilnih razlik v vrednostih BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in celotnega kolka ter UZ-parametrov, v odvisnosti od polimorfizma C>G v intronu 7 pred zdravljenjem z raloksifenom, nismo ugotovili (preglednica 27).

Ugotovili pa smo, da je delež OC, ki se je po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremenil, statistično značilno višji pri preiskovankah z genotipi ne-CC kot pri tistih z genotipom CC ($p = 0,015$) (preglednica 27 in slika 29).

Preglednica 27: Vrednosti BOKP, MKG ledvene hrbtenice, vratu stegenice in kolka ter UZ-parametrov (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež BOKP, MKG ter UZ-parametrov (povprečje (SD)), ki se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
BOKP					
ALP	CC	1,120 (0,25) ($\mu\text{g/L}$)	-16,58 (21,82)	0,199	0,219
	CG+GG	1,231 (0,37) ($\mu\text{g/L}$)	-23,78 (13,83)		
BALP	CC	11,74 (5,25) ($\mu\text{g/L}$)	20,03 (30,97)	0,396	0,417
	CG+GG	13,08 (5,41) ($\mu\text{g/L}$)	27,18 (19,95)		
OC	CC	32,76 (11,61) (ng/mL)	-20,96 (20,54)	0,492	0,015
	CG+GG	35,09 (10,92) (ng/mL)	-33,46 (14,32)		
CTX	CC	0,4889 (0,19) (ng/mL)	-22,08 (29,65)	0,119	0,158
	CG+GG	0,5769 (0,17) (ng/mL)	-34,66 (27,71)		
MKG izmerjena z DXA					
L1_L4	CC	0,751 (0,08) (g/cm^2)	1,95 (4,49)	0,231	0,807
	CG+GG	0,776 (0,05) (g/cm^2)	2,29 (5,02)		
Vrat stegenice	CC	0,633 (0,08) (g/cm^2)	1,00 (5,10)	0,367	0,385
	CG+GG	0,613 (0,07) (g/cm^2)	2,19 (3,15)		
Kolk	CC	0,74 (0,09) (g/cm^2)	-0,46 (8,18)	0,231	0,064
	CG+GG	0,704 (0,10) (g/cm^2)	4,56 (10,62)		
UZ-parametri					
BUA	CC	53,72 (11,88) (dB/MHz)	1,98 (9,26)	0,322	0,812
	CG+GG	57,11 (10,68) (dB/MHz)	1,40 (5,87)		
SOS	CC	1512,21 (20,46) (m/s)	0,06 (0,62)	0,518	0,806
	CG+GG	1516,27 (22,67) (m/s)	0,01 (0,77)		
QUI	CC	71,02 (12,67)	1,16 (6,99)	0,418	0,931
	CG+GG	74,07 (12,79)	0,99 (6,05)		
MKG	CC	0,373 (0,08) (g/cm^2)	1,58 (9,03)	0,417	0,306
	CG+GG	0,392 (0,08) (g/cm^2)	5,96 (21,63)		

Uporabljena statistična metoda: T-test.



Slika 29: Delež osteokalcina (OC) (povprečje), ki se po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma C>G v intronu 7. N – število preiskovank s posameznim genotipom.

Statistično značilnih razlik v izhodiščnih vrednostih krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM med genotipskimi podskupinami polimorfizma C>G v intronu 7 nismo ugotovili (preglednica 28). Prav tako polimorfizem C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* ni značilno vplival na spremembo posameznega dejavnika tveganja za bolezni srca in ožilja po zdravljenju z raloksifenom (preglednica 28).

Preglednica 28: Vrednosti krvnih maščob, celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf ter EOD, END in dIM (povprečje (SD)) pred zdravljenjem z raloksifenom in delež posameznega dejavnika tveganja (povprečje (SD)), ki se, glede na izhodiščne vrednosti, po zdravljenju z raloksifenom spremeni v odvisnosti od genotipov polimorfizma C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*.

Parameter	Genotip	Vrednosti pred zdravljenjem	Δ (%)	p (pred zdravljenjem)	p (Δ)
Celotni holesterol	CC	6,16 (0,96) (mmol/l)	-2,29 (12,16)	0,692	0,291
	CG+GG	6,27 (0,70) (mmol/l)	-6,06 (11,12)		
HDL- holesterol	CC	1,65 (0,30) (mmol/l)	1,73 (13,95)	0,611	0,393
	CG+GG	1,70 (0,27) (mmol/l)	-2,01 (15,60)		
LDL- holesterol	CC	3,84 (0,83) (mmol/l)	-4,44 (17,72)	0,914	0,781
	CG+GG	3,82 (0,65) (mmol/l)	-5,81 (13,38)		
Trigliceridi	CC	1,45 (0,69) (mmol/l)	6,80 (36,71)	0,341	0,455
	CG+GG	1,64 (0,61) (mmol/l)	-0,94 (29,46)		
E-selektin	CC	40,70 (15,31) (ng/mL)	-9,86 (25,89)	0,900	0,370
	CG+GG	41,50 (23,63) (ng/mL)	-17,07 (13,27)		
ICAM-1	CC	270,94 (57,45) (ng/mL)	5,85 (19,56)	0,268	0,746
	CG+GG	251,76 (59,00) (ng/mL)	7,76 (20,44)		

VCAM-1	CC	488,03 (140,80) (ng/mL)	8,35 (28,52)	0,137	0,367
	CG+GG	556,06 (161,30) (ng/mL)	1,53 (12,48)		
CRP	CC	2,027 (2,00) (mg/L)	71,05 (209,55)	0,792	0,411
	CG+GG	1,8494 (2,75) (mg/L)	164,54 (579,55)		
vWf	CC	109,23 (48,00) (%)	157,62 (526,00)	0,462	0,343
	CG+GG	119,44 (37,30) (%)	10,74 (26,90)		
EOD	CC	7,312 (8,00) (%)	-45,71 (311,57)	0,447	0,411
	CG+GG	9,095 (7,68) (%)	53,27 (541,74)		
END	CC	19,40 (21,66) (%)	8,96 (62,36)	0,548	0,484
	CG+GG	16,09 (8,84) (%)	30,09 (114,33)		
dIM	CC	0,872 (0,14) (mm)	-1,71 (6,69)	0,626	0,765
	CG+GG	0,855 (0,10) (mm)	-1,18 (3,97)		

Uporabljena statistična metoda: *T*-test.

5. RAZPRAVA

5.1 Vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na serumske koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov

Raloksifen se uporablja za zdravljenje in preprečevanje osteoporoze pri ženskah v pomenopavzi. Kljub dejstvu, da se pri peroralni aplikaciji absorbira približno 60 % raloksifena, je njegova absolutna biološka uporabnost zelo nizka, samo 2 % (51). Ostalih 58 % predstavljajo raloksifenovi konjugati z glukuronsko kislino, ki nastanejo med presnovo II. faze (63). Presnova raloksifena naj bi potekala tako v steni tankega črevesa kot tudi v jetrih (63, 68). Njegova plazemska koncentracija je močno odvisna od jetrne presnove z encimi UGT, zlasti UGT1A1, ki velja za enega najpomembnejših encimov za odstranjevanje raloksifena iz telesa. Homozigoti za polimorfni alel (TA)₇ v genu za UGT1A1 imajo statistično značilno zvišane serumske koncentracije M2 in celokupnega raloksifena (67). Ker je za raloksifen značilna velika interindividualna variabilnost v plazemskih koncentracijah raloksifena in njegovih presnovkov (63), smo se odločili raziskati, ali lahko k variabilnosti, poleg polimorfizma (TA)₇ v genu za presnovni encim UGT1A1 (67), prispevajo tudi polimorfizmi v genih za prenašalne proteine. Na farmakokinetiko raloksifena lahko namreč poleg presnovnih encimov vplivajo tudi prenašalni proteini (64). Literaturni podatki o vplivu polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na farmakokinetiko raloksifena so zelo skopi. Zato smo se v tej nalogi osredotočili ravno na vpliv genotipa absorptivnih (OATP1B1 in OATP1B3) in ekskretornih prenašalnih proteinov (P-gp in MRP2) na farmakokinetiko in v nadaljevanju tudi farmakodinamiko raloksifena.

Statistična analiza naših rezultatov je pokazala močan vpliv polimorfizma 388A>G v genu za OATP1B1 na koncentracije raloksifena, M3 in TRHP. Koncentracije raloksifena in omenjenih presnovkov so bile statistično značilno višje pri nosilkah genotipa GG v primerjavi s tistimi z genotipoma AG in AA. Takšen trend smo zasledili tudi pri koncentracijah M1 in M2, vendar te niso dosegle meje statistične značilnosti. To je verjetno posledica dejstva, da polimorfni alel G povzroči aminokislinsko spremembo Asn130Asp znotraj druge zunajcelične zanke in tako vpliva na substratno specifičnost prenašalnega proteina OATP1B1 oziroma posledično zniža substratno specifično transportno aktivnost OATP1B1 (112, 115). Posledica tega je zmanjšan privzem vseh

raloksifenovih zvrsti v hepatocite oziroma kopičenje le-teh v krvi. Statistično značilnega vpliva ostalih proučevanih polimorfizmov na farmakokinetiko raloksifena in njegovih presnovkov nismo ugotovili. Pri polimorfizmih 521T>C v genu *SLCO1B1* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* smo zaznali statistično neznačilno nižje serumske koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov pri nemutiranih homozigotih kot pri nosilkah genotipa TC, v primeru polimorfizma 521T>C v genu *SLCO1B1* oziroma genotipa ne-CC v primeru nukleotidne zamenjave C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*. Serumske koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov so bile tudi v primeru polimorfizmov 3435C>T v genu *ABCB1* in 3972C>T v genu *ABCC2* višje pri posameznikah z vsaj enim polimorfnim alelom T v primerjavi z nemutiranimi homozigoti, vendar niso dosegle meje statistične značilnosti.

Učinki polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1* se pogosteje kažejo skozi haplotipe, ki lahko vplivajo na farmakokinetiko številnih učinkovin in fizioloških substratov. V naši nalogi smo ugotovili, da se koncentracije raloksifena, M3 in TRHP statistično značilno razlikujejo med preiskovankami z eno, dvema ali nobeno kopijo haplotipa *1b (388A>G). Najvišje vrednosti raloksifena, M3 in TRHP so imele preiskovanke z dvema kopijama haplotipa *1b. To lahko pomeni, da je pri teh preiskovankah privzem raloksifena in njegovih presnovkov v hepatocitih nižji, zato so njihove koncentracije v serumu višje. Ti rezultati potrjujejo delovanje polimorfizma 388A>G, kjer so bile koncentracije raloksifena, M3 in TRHP najvišje pri polimorfnih homozigotih. Koncentracije raloksifena, M3 in TRHP so se tudi med preiskovankami, ki imajo eno, dve ali nimajo nobene kopije haplotipa *1a (referenčnega haplotipa) statistično značilno razlikovale. Kot smo pričakovali, so bili rezultati ravno nasprotni kot pri haplotipu *1b. Koncentracije raloksifena in omenjenih presnovkov so bile namreč najvišje pri preiskovankah, ki nimajo nobene kopije haplotipa *1a. Prisotnost haplotipa *15 (388A>G in 521T>C) ni statistično značilno vplivala na koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov med preiskovankami z eno in tistimi brez kopij tega haplotipa. Kljub temu lahko opazimo trend višjih koncentracij raloksifena in njegovih presnovkov pri preiskovankah z eno kopijo v primerjavi s tistimi, ki nimajo nobene kopije haplotipa *15. Zaradi premajhnega števila preiskovank s haplotipom *5 (521T>C) vpliva le-tega nismo ugotavljali. Obstajajo številne raziskave o vplivu haplotipov polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1* na farmakokinetiko različnih substratov prenašalnega proteina OATP1B1. Oswald s sodelavci je na primeru ezetimiba in njegovega glukuronida ugotovil

podoben učinek haplotipov polimorfizmov 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*. Pokazali so, da haplotipi *1b, *15 in *5 znižajo aktivnost prenašalnega proteina OATP1B1. Privzem glukuronida v hepatocitih je bil pri homozigotih za OATP1B1 *1b, zaradi znižane aktivnosti OATP1B1, nižji. To pa je povzročilo le manjše povečanje serumske koncentracije glukuronida, saj je le-ta v večji meri podvržen glomerularni filtraciji v ledvicah. Izločanje ezetimiba s fecesom se je tako značilno znižalo, medtem ko se je izločanje z urinom povečalo (135). Nozawa s sodelavci je pokazal, da je OATP1B1 vključen v transport aktivnega presnovka irinotekana (SN-38), ne pa tudi samega irinotekana in ostalih njegovih presnovkov. V raziskavi *in vitro* so ugotavljali učinke haplotipov *1a, *1b, *5 in *15 v genu za OATP1B1 na farmakokinetiko SN-38. Raziskava je pokazala, da je aktivnost OATP1B1*15 nižja v primerjavi s transportno aktivnostjo OATP1B1*1a. Posledično je tudi privzem aktivnega presnovka irinotekana SN-38 v hepatocitih v primeru haplotipa *15 nižji (112). Zhang s sodelavci pa je ugotovil, da genotip prenašalnega proteina OATP1B1 vpliva tudi na serumske koncentracije nekaterih fizioloških substratov. Nosilci haplotipa *15 so imeli višje koncentracije nekonjugiranega in celokupnega bilirubina kot nosilci referenčnega haplotipa in haplotipa *1b (121).

5.2 Vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na farmakodinamske parametre

V nalogi smo želeli, poleg vpliva polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na farmakokinetiko raloksifena, proučiti tudi njihov vpliv na učinkovitost zdravljenja osteoporoze in na dejavnike tveganja za nastanek bolezni srca in ožilja med zdravljenjem z raloksifenom. Raloksifen poleg tega, da zmanjša število in aktivnost osteoklastov ter posledično zveča MKG hrbtenice in vratu stegenice in zmanjša tveganje za zlome vretenc ter zniža koncentracije BOKP namreč ne zveča tveganja za akutne srčno-žilne dogodke (54, 55, 56, 58, 61, 62). Vpliv polimorfizmov na učinkovitost zdravljenja osteoporoze smo ugotavljali z analizo vrednosti BOKP, MKG in parametrov kvantitativnega ultrazvoka po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Vpliv na dejavnike tveganja za razvoj srčno-žilnih obolenj pa smo ugotavljali z analizo krvnih maščob po 12 mesecih zdravljenja ter celičnih adhezijskih molekul, CRP, vWf, EOD, END in dIM po 6 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Proučevani polimorfizmi v genih za prenašalne proteine delujejo posredno na farmakodinamske parametre. Poleg tega lahko na farmakodinamske parametre vplivajo

tudi številni drugi dejavniki, zato pričakujemo, da bo vpliv proučevanih polimorfizmov na parametre med zdravljenjem z raloksifenom manjši kot na farmakokinetiko raloksifena. Prvoten cilj naše naloge je bil določiti vpliv proučevanih polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na koncentracije raloksifena in njegovih presnovkov. Na voljo smo imeli tudi rezultate farmakodinamskih parametrov pred zdravljenjem z raloksifenom in po njem, zato smo želeli raziskati še vpliv omenjenih polimorfizmov na te parametre.

Raziskav, ki bi proučevale vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na MKG, UZ-parametre in BOKP ter dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja med zdravljenjem z raloksifenom, ni in naša raziskava je prva na tem področju. Zavratnik s sodelavci je v svoji raziskavi isti skupini preiskovank določil farmakodinamske parametre med zdravljenjem z raloksifenom neodvisno od genotipov ter ugotovil manjše, vendar še vedno statistično značilno zvečanje MKG ledvene hrbtenice in vratu stegenice ter neznačilno zvečanje UZ-parametrov po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Potrdil je tudi značilno znižanje BALP, OC in CTX, neodvisno od genotipov, po zdravljenju z raloksifenom. Ugotovil je, da raloksifen neodvisno od genotipov značilno zniža vrednosti krvnih maščob, E-selektina in dIM, zviša vrednosti ICAM-1 ter neznačilno zveča EOD (43). Na podlagi teh rezultatov smo se odločili dodatno raziskati, kakšen je vpliv genotipov prenašalnih proteinov na MKG, UZ-parametre in BOKP ter dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja pred zdravljenjem z raloksifenom in po njem, saj pričakujemo, da del interindividualne variabilnosti prispevajo genotipi prenašalnih proteinov. Pričakovali smo, da bo v vseh genotipskih skupinah opazen trend zvišanja oziroma znižanja posameznih farmakodinamskih parametrov ter da bo posamezen polimorfizem vplival izključno na velikost spremembe parametrov, vendar predvidevamo, da tega ni bilo mogoče vedno potrditi zaradi majhnega števila preiskovank.

5.2.1 Vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na MKG, UZ-parametre in BOKP pred zdravljenjem z raloksifenom in po njem

Ugotovili smo, da polimorfizem 388A>G v genu *SLCO1B1* statistično značilno vpliva na spremembo MKG vratu stegenice po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. MKG vratu stegenice se je, glede na izhodiščne vrednosti, značilno zvišala le pri nosilkah genotipa AG, kjer je prirastek MKG znašal 3,44 %. To bi lahko pomenilo manjše tveganje za osteoporotične zlome kolka te genotipske podskupine v primerjavi z ostalimi genotipi

polimorfizma 388A>G. Največje zvečanje MKG bi pričakovali pri nosilkah genotipa GG, saj so te imele tudi najvišje koncentracije raloksifena in presnovkov. Vendar zaradi majhnega števila preiskovank in relativno majhne spremembe MKG po 12 mesecih zdravljenja tega trenda ne moremo potrditi.

MKG ledvene hrbtenice je bila pred zdravljenjem z raloksifenom statistično značilno višja v skupini s polimorfnim alelom C polimorfizma 521T>C, kar govori v prid manjšem tveganju za osteoporotične zlome vretenc pri nosilkah genotipa TC. MKG ledvene hrbtenice se je v odvisnosti od polimorfizma 521T>C v genu *SLCO1B1* po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom, v primerjavi z izhodiščnimi vrednostmi, le neznatno povečala. Naši rezultati kažejo, da je možen tudi statistično značilen vpliv polimorfizma 521T>C na parameter QUI med zdravljenjem z raloksifenom. Namreč, vrednosti tega parametra so se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom, v primerjavi z izhodiščnimi vrednostmi, statistično značilno spremenile v odvisnosti od genotipov polimorfizma 521T>C v genu *SLCO1B1*. Pri nemutiranem homozigotu je prirastek parametra QUI, po 12 mesecih zdravljenja, znašal 2,52 %, medtem ko so se vrednosti pri preiskovankah z enim polimorfnim alelom znižale, kar bi lahko pomenilo slabšo odzivnost genotipa CT na zdravljenje z raloksifenom ter slabšo kakovost kosti. Tudi tukaj bi pri nosilkah polimorfnega alela C pričakovali zvečanje parametra QUI, saj so te imele neznatno višje koncentracije raloksifena. Sklepamo, da tega trenda ni mogoče potrditi zaradi majhnega števila preiskovank in relativno majhnega prirastka parametra QUI.

Ugotovili smo, da haplotipi *1b, *15 in *1a vplivajo tudi na številne farmakodinamske parametre. Kot smo pričakovali, prisotnost haplotipa *1b značilno zniža koncentracije CTX, glede na izhodiščne vrednosti, po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Največje znižanje koncentracij CTX smo opazili pri preiskovankah z dvema kopijama haplotipa *1b, kar kaže, da je pri njih prišlo do najbolj intenzivnega zmanjšanja kostne premene. Domnevamo, da je to lahko posledica dejstva, da prisotnost haplotipa *1b značilno zviša koncentracije raloksifena in nekaterih presnovkov, še zlasti pri osebah z dvema kopijama tega haplotipa. Na izhodiščne koncentracije biokemičnih označevalcev kostne premene haplotip 1*b ni značilno vplival.

Prisotnost haplotipa*15 je statistično značilno vplivala na MKG ledvene hrbtenice pred zdravljenjem z raloksifenom. Preiskovanke z eno kopijo haplotipa *15 so imele pred zdravljenjem z raloksifenom največjo MKG ledvene hrbtenice in zato verjetno najmanjše tveganje za zlome vretenc. Po 12 mesecih zdravljenja opazamo, glede na izhodiščne

vrednosti, statistično neznačilen priprstek MKG ledvene hrbtenice tako pri posameznicah z eno kot pri tistih z nobeno kopijo haplotipa *15. Haplotip *15 je statistično značilno vplival tudi na spremembo parametrov SOS in QUI po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Pri preiskovankah, ki imajo eno kopijo haplotipa *15, se vrednosti QUI in SOS parametrov po 12 mesecih zdravljenja značilno znižajo, medtem ko se pri tistih, ki nimajo nobene kopije haplotipa *15, te vrednosti povečajo. Domnevamo, da to lahko pomeni večjo učinkovitost varovanja pred zlomi z raloksifenom pri preiskovankah, ki nimajo nobene kopije tega haplotipa.

MKG ledvene hrbtenice se je pred zdravljenjem z raloksifenom statistično značilno razlikovala med preiskovankami z eno, dvema ali nobeno kopijo haplotipa *1a. Najvišja je bila pri preiskovankah, ki nimajo nobene kopije referenčnega haplotipa. To je verjetno posledica dejstva, da se pri teh preiskovankah, zaradi nižje transportne aktivnosti OATP1B1, zviša serumska koncentracija estron sulfata, kar lahko ima za posledico večjo MKG ledvene hrbtenice in s tem manjše tveganje za osteoporotične zlome. Sprememba MKG ledvene hrbtenice je po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom kazala trend zvečanja, ki pa ni bil statistično značilen. Ugotovili smo tudi, da haplotip *1a značilno vpliva na spremembo MKG vratu stegenice po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom, vendar zaradi majhnega števila preiskovank, relativno majhne spremembe MKG po 12 mesecih zdravljenja in napake pri DXA meritvah rezultat težko označimo kot zanesljiv.

Za polimorfizem C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* smo ugotovili, da kljub statistično neznačilnem vplivu na koncentracije raloksifenovih zvrsti statistično značilno vpliva na spremembo koncentracij OC po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Znižanje OC je bilo pri nosilkah genotipa ne-CC po 12 mesecih zdravljenja statistično značilno večje kot pri preiskovankah z genotipom CC. Domnevamo, da je to posledica neznačilno višjih koncentracij raloksifena in njegovih presnovkov pri nosilkah genotipa ne-CC. Prav tako sklepamo, da to lahko pomeni bolj učinkovito zmanjšanje kostne premene pri nosilkah genotipa ne-CC. Naša raziskava je prva, ki je proučevala učinek raloksifena na BOKP v odvisnosti od genotipov. V literaturi je omenjenih več raziskav, ki so proučevale učinek raloksifena na BOKP, vendar neodvisno od genotipov. Z našo raziskavo smo pri polimorfizmu 3435C>T v genu *ABCB1* ugotovili statistično značilno spremembo MKG celotnega kolka po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. MKG kolka se je pri osebah z genotipoma CC in CT po zdravljenju z raloksifenom znižala, medtem ko smo pri polimorfnih homozigotih ugotovili prirastek MKG, ki je znašal 6,50 %, kar bi za to

skupino preiskovank lahko pomenilo manjše tveganje za zlom kolka. Vrednosti parametra QUI so se v odvisnosti od polimorfizma 3435C>T v genu *ABCBI* po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom, v primerjavi z izhodišnimi vrednostmi, statistično značilno zvišale. Po zdravljenju je bil prirastek QUI značilno večji pri genotipu TT v primerjavi z nosilkami genotipov CT in CC. Domnevamo, da bi te ugotovitve lahko pomenile večjo zaščito pred zlomi pri nosilkah genotipa TT. Vrednosti MKG kolka in parametra QUI so po zdravljenju z raloksifenom pri polimorfni homoizgotih kazale trend zvečanja, zato lahko sklepamo, da polimorfizem 3435C>T vpliva tako na gostoto kot tudi na kakovost kosti te genotipske podskupine.

5.2.2 Vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja pred zdravljenjem z raloksifenom in po njem

Polimorfizem 388A>G je, glede na izhodiščne vrednosti, statistično značilno vplival na spremembo trigliceridov po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Pri nosilkah genotipa AG so se koncentracije trigliceridov, glede na izhodiščne vrednosti, po 12 mesecih zdravljenja znižale, kar bi lahko pomenilo manjše tveganje za bolezni srca in ožilja te genotipske podskupine. Nemutirani in polimorfni homoizgoti so se bistveno slabše odzvali na zdravljenje z raloksifenom, zato smo pri njih, v nasprotju s pričakovanji, zaznali prirastek trigliceridov. Naša raziskava je prva, ki je proučevala vpliv polimorfizmov v genih za prenašalne proteine na dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja med zdravljenjem z raloksifenom. Vpliv zdravljenja z raloksifenom na dejavnike tveganja srčno-žilnih obolenj, neodvisno od genotipov, so že večkrat raziskovali. Oztas s sodelavci je pokazal, da raloksifen zniža serumske koncentracije celotnega in LDL-holesterola, pri tem pa ne zviša koncentracij trigliceridov (61). Ugotovili smo, da polimorfizem 388A>G v genu *SLCO1B1* vpliva tudi na druge dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja, kot sta ICAM-1 in dIM. ICAM-1 je adhezivna molekula imunoglobulinskega tipa, ki jo izražajo različne celice, vključno z levkociti in endotelijskimi celicami. Serumske koncentracije ICAM-1 so povišane pri bolnikih s srčno-žilnimi in avtoimunskimi obolenji ter rakom (136). Pred uvedbo terapije z raloksifenom je polimorfizem 388A>G značilno vplival na vrednosti ICAM-1. Povprečne vrednosti so bile pred terapijo statistično značilno nižje pri genotipu GG, kar bi lahko pomenilo manjše tveganje za srčno-žilna obolenja pri nosilkah tega genotipa. Debelina intime medije je bila pred zdravljenjem z raloksifenom statistično

značilno višja pri nosilkah genotipa 388GG, v primerjavi z nosilkami genotipov AA in AG. Domnevamo, da je povečana debelina IM pri posameznicah z genotipom GG lahko povezana z višjim tveganjem za srčno-žilna obolenja. Po zdravljenju z raloksifenom se je dIM v vseh genotipskih podskupinah statistično neznačilno znižala.

Debelina intime medije se je pred zdravljenjem z raloksifenom statistično značilno razlikovala tudi glede na število kopij haplotipa *1b. Čeprav trenda zniževanja dIM med podskupinami ni mogoče opaziti, lahko potrdimo, da je najmanjša dIM pri osebah, ki nimajo nobene kopije tega haplotipa, kar bi lahko pomenilo, da je tveganje za srčno-žilna obolenja pri teh osebah najmanjše. Tako pri polimorfizmu 388A>G kot tudi pri haplotipu *1b opažamo statistično neznačilno zmanjšanje debeline IM po 6 mesecih zdravljenja z raloksifenom. Referenčni haplotip *1a je značilno vplival na koncentracije celične adhezijske molekule ICAM-1 pred zdravljenjem z raloksifenom. Med posameznimi podskupinami smo opazili trend naraščanja koncentracij ICAM-1. Koncentracije so bile najvišje pri preiskovankah, ki imajo dve kopiji tega referenčnega haplotipa, kar bi lahko pomenilo večje tveganje te skupine preiskovank za bolezni srca in ožilja. Ugotovitve so skladne z rezultati za polimorfizem 388A>G, kjer so povprečne vrednosti ICAM-1 pred zdravljenjem statistično značilno nižje pri polimorfnih homozigotih.

Ugotovili smo tudi, da polimorfizem 3435C>T v genu *ABCB1* statistično značilno vpliva na koncentracije LDL-holesterola pred zdravljenjem z raloksifenom. Njegove koncentracije so bile najvišje pri posameznicah z genotipom TT, najnižje pa pri nemutiranih homozigotih, kar bi lahko pomenilo nižje tveganje za srčno-žilna obolenja pri nosilkah genotipa CC. Jeannesson s sodelavci je na skupini zdravih preiskovank ugotovila, da so koncentracije apolipoproteina A1 pri nosilkah vsaj enega polimorfnega alela T značilno višje kot pri nemutiranih homozigotih (137). Po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom so koncentracije LDL-holesterola, v primerjavi z izhodiščnimi vrednostmi, pri vseh genotipih kazale trend znižanja, vendar niso dosegle statistične značilnosti. Pri nosilkah genotipov CC in CT polimorfizma 3435C>T v genu *ABCB1* smo po 6 mesecih zdravljenja z raloksifenom ugotovili statistično značilno zvišanje vrednosti endotelijsko neodvisne vazodilatacije (END), kar bi lahko pomenilo, da raloksifen izboljša delovanje gladkomišičnih celic medije pri omenjenih genotipih ter zmanjša tveganje za srčno-žilna obolenja. Od endotelija neodvisna vazodilatacija namreč meri maksimalni farmakološki odgovor žilne gladke mišičnine na gliceriltrinitrat in nam prikaže motnje v delovanju gladkomišičnih celic medije (138).

Pri polimorfizmu 3972C>T v genu *ABCC2* smo po 6 mesecih zdravljenja z raloksifenom ugotovili statistično značilno zvečanje EOD pri nosilkah genotipov CT in TT, ne pa tudi pri nemutiranih homozigotih. Zvečanje EOD pomeni boljše delovanje endotelija, kar bi lahko pomenilo, da zdravljenje z raloksifenom pri določenih genotipih zmanjša tveganje za bolezni srca in ožilja. Vpliv zdravljenja z raloksifenom na EOD v odvisnosti od genotipov prenašalnih proteinov do sedaj še niso proučevali. Ugotovili smo tudi, da je polimorfizem 3972C>T v genu *ABCC2* statistično značilno vplival na spremembe koncentracij celotnega in LDL-holesterola po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom, v primerjavi z izhodiščnimi koncentracijami. Koncentracije celotnega in LDL-holesterola so se po 12 mesecih zdravljenja z raloksifenom pri nosilkah genotipov CC in TT znižale, kar bi lahko pomenilo nižje tveganje za bolezni srca in ožilja, medtem ko je pri genotipu CT opaziti prirastek tako celotnega kot LDL-holesterola. Tudi v tem primeru lahko govorimo o različni odzivnosti genotipov na zdravljenje z raloksifenom.

Naši rezultati kažejo, da lahko del interindividualne variabilnosti koncentracij raloksifena in njegovih presnovkov ter farmakodinamike raloksifena pojasnimo z vplivom petih proučevanih polimorfizmov v genih za prenašalne proteine. Ugotavljanje vpliva genetske raznolikosti na posameznikov odgovor na zdravilo je zelo pomembno za razvoj varnih in učinkovitih zdravil, saj je to eden izmed dejavnikov, ki lahko močno vplivajo na uspeh zdravljenja. Na področju zdravljenja osteoporoze je relativno malo znanega o vplivu genetske raznolikosti. Z našimi rezultati smo prispevali k odkritju klinično pomembnih polimorfizmov v genih za prenašalne proteine, ki so lahko povezani s farmakokinetiko raloksifena ter posledično lahko vplivajo na uspešnost zdravljenja osteoporoze.

Osnovna omejitev naše raziskave, poleg majhnega števila preiskovank, je njeno trajanje in spremljanje bolnic. Zaradi majhnega števila preiskovank in relativno majhne spremembe nekaterih farmakodinamskih parametrov med zdravljenjem z raloksifenom, nekatere rezultate namreč težko označimo kot zanesljive. Zato bi bilo verjetno smiselno rezultate potrditi z raziskavo na večjem številu preiskovank.

6. SKLEP

Namen našega dela je bil ugotoviti, ali obstaja povezava med proučevanimi polimorfizmi v genih za prenašalne proteine in serumskimi koncentracijami raloksifena ter njegovih presnovkov, izmerjenimi po 12 mesecih zdravljenja. Nadalje smo želeli raziskati vpliv teh polimorfizmov na spremembe MKG, biokemijske označevalce kostne premene in parametre za oceno kakovosti kostnega tkiva ter dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja po uvedbi terapije z raloksifenom.

Pomemben rezultat naše raziskave so tudi frekvence genotipov posameznih polimorfizmov, ki so predstavljene v nadaljevanju.

- polimorfizem 388A>G v genu *SLCO1B1*: AA (28,6 %), AG (49,2 %) in GG (22,2%);
- polimorfizem 521T>C v genu *SLCO1B1*: TT (65,1 %), TC (34,9 %), CC (0 %);
- polimorfizem 3435C>T v genu *ABCB1*: CC (30,2 %), CT (41,3 %), TT (28,6 %);
- polimorfizem 3972C>T v genu *ABCC2*: CC (46,0 %), CT (36,5 %), TT (17,5 %);
- polimorfizem C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*: CC (68,2 %), CG (30,2 %), GG (1,6 %).

Z našo raziskavo smo pokazali, da polimorfizem 388A>G v genu *SLCO1B1* ter haplotipa *1b in *1a statistično značilno vplivajo na koncentracije raloksifena, M3 in TRHP. Polimorfni alel G namreč zniža substratno specifično transportno aktivnost OATP1B1, kar povzroči zmanjšan privzem raloksifena, M3 in TRHP v hepatocite in višje serumske koncentracije.

Pokazali smo tudi, da posamezni polimorfizmi statistično značilno vplivajo tako na a) kostne farmakodinamske parametre kot na b) dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja po zdravljenju z raloksifenom.

a) Polimorfizem 388A>G v genu *SLCO1B1* je statistično značilno vplival na MKG vratu stegenice, vendar so se na zdravljenje odzvale samo nosilke genotipa AG. Pri ostalih genotipskih podskupinah prirastka MKG ni bilo. Prisotnost polimorfizma 3435C>T v genu *ABCB1* pa je povzročila zvečanje MKG celotnega kolka, vendar samo pri polimorfni homozigotih. Preostali genotipski podskupini sta se slabše odzvali na zdravljenje.

Polimorfizma 521T>C v genu *SLCO1B1* in 3435C>T v genu *ABCB1* sta statistično značilno vplivala na spremembo parametra QUI. Nemutirani homozigoti polimorfizma 521T>C so se bolje odzvali na terapijo z raloksifenom, saj je bilo pri njih, za razliko od heterozigotov, opaziti prirastek vrednosti parametra QUI. Pri polimorfizmu 3435C>T v genu *ABCB1* smo v vseh genotipskih podskupinah opazili prirastek parametra QUI, ki je bil največji pri polimorfni homozigoti tega polimorfizma. Polimorfizem C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3* je značilno vplival na spremembo koncentracij OC. Na terapijo so se najbolje odzvali heterozigoti in polimorfni homozigoti polimorfizma C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*. Prisotnost haplotipa *1b je značilno znižala koncentracije CTX v vseh haplotipskih podskupinah, najbolj pa pri posameznicah z dvema kopijama tega haplotipa. Pri preiskovankah, ki imajo eno kopijo haplotipa *15, so se vrednosti parametrov QUI in SOS po zdravljenju značilno znižale, medtem ko so se pri tistih, ki nimajo nobene kopije haplotipa *15, te vrednosti povečale.

b) Polimorfizem 388A>G v genu *SLCO1B1* je statistično značilno vplival na spremembe koncentracij trigliceridov. Heterozigoti tega polimorfizma so se najbolje odzvali na zdravljenje, saj je le pri njih prišlo do znižanja koncentracij trigliceridov. Polimorfizem 3972C>T v genu *ABCC2* je statistično značilno vplival na vrednosti celotnega in LDL- holesterola ter EOD po terapiji z raloksifenom. V primeru krvnih maščob so se na zdravljenje najbolje odzvale nosilke genotipov CC in TT, saj je pri njih prišlo do znižanja koncentracij tako LDL- kot celotnega holesterola. V primeru EOD, so se na terapijo najbolje odzvali polimorfni homozigoti in heterozigoti polimorfizma 3972C>T v genu *ABCC2*. Pri nosilkah genotipov CC in CT polimorfizma 3435C>T v genu *ABCB1* smo po zdravljenju z raloksifenom ugotovili statistično značilno zvišanje vrednosti END.

Naši rezultati kažejo, da je vpliv petih proučevanih polimorfizmov v štirih genih za prenašalne proteine na farmakokinetiko in farmakodinamiko raloksifena mogoč, vendar bi ga bilo treba potrditi na večjem številu preiskovank. Ugotovili smo namreč, da lahko del interindividualne variabilnosti koncentracij raloksifena in njegovih presnovkov pojasnimo z vplivom polimorfizma 388A>G v genu *SLCO1B1*. Pokazali smo tudi, da lahko polimorfizmi v genih *SLCO1B1* in *ABCB1* vplivajo tako na kostne farmakodinamske parametre kot na dejavnike tveganja za bolezni srca in ožilja po zdravljenju z raloksifenom, medtem ko lahko polimorfizem v genu *SLCO1B3* vpliva izključno na kostne farmakodinamske parametre, polimorfizem v genu *ABCC2* pa na dejavnike tveganja za

bolezni srca in ožilja po uvedbi zdravljenja z raloksifenom. Če bi te vplive potrdili na večjem številu preiskovank, bi lahko genotipizacija pripomogla k učinkovitejšem zdravljenju osteoporoze.

7. LITERATURA IN VIRI

- (1) Kocijančič A. Kostne bolezni. V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D. Interna medicina 3. Izdaja; Littera picta, 2005: 916–925.
- (2) Downey PA, Siegel MI. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Phys Ther* 2006; 86 (1): 77–91.
- (3) Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21 (2): 115–137.
- (4) Lerner UH: Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *J Dent Res* 2006; 85: 584–595.
- (5) Mencej Bedrač S, Marc J. Sistem RANKL/RANK/OPG – nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze. *Farm Vestn* 2008; 59 (4): 175–178.
- (6) Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001; 142: 5050–5055.
- (7) Franić D. Novi vidiki diagnostike in zdravljenja osteoporoze. *Zdrav Vestn* 2009; 78: I-143–150.
- (8) Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and Osteoprotegerin. *Cancer* 2001; 92 (3): 460–470.
- (9) Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Gene Dev* 1999; 13: 3037–3051.
- (10) Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1092: 385–396.
- (11) Raisz LG. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clin Chem* 1999; 45 (8B): 1353–1358.
- (12) Canalis E. Systemic and Local Factors and the Maintenance of Bone Quality. *Calcified Tissue Int* 1993; 53: S90–S93.
- (13) Cooper C. Epidemiology of Osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1999; Supplement 2: S2–S8.
- (14) Žorž G. Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. *ISIS* 2006; Leto XV (3): 34–37.
- (15) Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone* 2006; 38: S4–S9.

- (16) Stewart TL, Ralston SH. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol* 2000; 166: 235–245.
- (17) Recker RR, Deng HW. Role of Genetics in Osteoporosis. *Endocrine* 2002; 17 (1): 55–66.
- (18) Ralston SH. Genetics of osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192: 181–189.
- (19) Mencej Bedrač S, Preželj J, Marc J. TNFRSF11B gene polymorphisms 1181G > C and 245T > G as well as haplotype CT influence bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2011; 69: 263–267.
- (20) Zupan J, Mencej Bedrač S, Jurković-Mlakar S et al. Gene–gene interactions in RANK/RANKL/OPG system influence bone mineral density in postmenopausal women. *J Steroid Biochem* 2010; 118: 102–106.
- (21) Estrada K, Stykarsdottir U, Evangelou E et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet* 2012; 44 (5): 491–503.
- (22) Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H et al. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone* 2008; 42: 467–475.
- (23) Kocijančič A. Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. *Zdrav Vestn* 2002; 71: 571–573.
- (24) Blake GM, Fogelman I. Role of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in the Diagnosis and Treatment of Osteoporosis. *J Clin Densitom* 2007; 10 (1): 102–110.
- (25) Marc J. Biokemični in genetični kazalci osteoporoze. *Farm Vestn* 2000; 51: 352–355.
- (26) Delmas PD, Eastell R, Garnero P. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis Int* 2000; Supplement 6: S2–S17.
- (27) Seibel MJ. Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev* 2005; 26: 97–122.
- (28) Szulc P. The role of bone turnover markers in monitoring treatment in postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem* 2012; doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.01.022: 1–13.
- (29) Vasikaran A, Eastell R, Bruyere O et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* 2011; 22: 391–420.

- (30) Gamie Z, Korres N, Leonidou A et al. Sclerostin monoclonal antibodies on bone metabolism and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs* 2012 (Epub ahead of print).
- (31) Kovačič N. Vpliv hormonskega nadomestnega zdravljenja na koncentracijo testosterona pri pomenopavznih ženskah. *Diplomska naloga*, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 2010.
- (32) Sosa M, Gonzalez-Padilla E. Promising developments in osteoporosis treatment. *Int J Clin Rheumatol* 2011; 6 (3): 325–332.
- (33) Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 2002; 359: 2018–2026.
- (34) Greenspan SL, Resnick NM, Parker RA. Early Changes in Biochemical Markers of Bone Turnover Are Associated with Long-Term Changes in Bone Mineral Density in Elderly Women on Alendronate, Hormone Replacement Therapy, or Combination Therapy: A Three-Year, Double-Blind, Placebo- Controlled, Randomized Clinical Trial. *J Clin Endocr Metab* 2005; 90 (5): 2762–2767.
- (35) McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB et al. Denosumab in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density. *New Engl J Med* 2006; 354: 821–831.
- (36) Cummings SR, San Martin J, McClung MR et al. Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *New Engl J Med* 2009; 361 (8): 756–765.
- (37) Seeman E, Eisman JA. 7: Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. *Med J Australia* 2004; 180: 298–303.
- (38) Costa AG, Bilezikian JP. Sclerostin: Therapeutic Horizons Based Upon Its Actions. *Curr Osteoporos Rep* 2012; 10: 64–72.
- (39) Lewiecki EM. Sclerostin monoclonal antibody therapy with AMG 785: a potential treatment for osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11 (1): 117–127.
- (40) Hamdy NAT. Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. *Rheumatology* 2009; 48: iv9–iv13.
- (41) Meunier PJ, Roux C, Seeman E et al. The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. *New Engl J Med* 2004; 350: 459–468.
- (42) Marini F, Brandi ML. Pharmacogenetics of Osteoporosis: What is the Evidence? *Curr Osteoporos Rep* 2012; 10: 221–227.

- (43) Zavrtnik A. Vpliv polimorfizmov gena za estrogenski receptor alfa na zdravljenje z raloksifenom pri preiskovankah s pomenopavzno osteoporozo. Doktorska disertacija, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani 2007.
- (44) Palomba S, Numis FG, Mossetti G et al. Raloxifene administration in postmenopausal women with osteoporosis: effect of different BsmI vitamin D receptor genotypes. *Hum Reprod* 2003; 18 (1): 192–198.
- (45) Marc J, Preželj J, Komel R, Kocijančič A. VDR Genotype and Response to Etidronate Therapy in Late Postmenopausal Women. *Osteoporos Int* 1999; 10: 303–306.
- (46) Palomba S, Orio F Jr, Russo T et al. BsmI vitamin D receptor genotypes influence the efficacy of antiresorptive treatments in postmenopausal osteoporotic women. A 1-year multicenter, randomized and controlled trial. *Osteoporos Int* 2005; 16: 943–952.
- (47) Qureshi AM, Herd RJ, Blake GM et al. Col1a1 Sp1 Polymorphism Predicts Response of Femoral Neck Bone Density to Cyclical Etidronate Therapy. *Calcif Tissue Int* 2002; 70: 158–163.
- (48) Kim H, Choe SA, Ku SY et al. Association between Wnt signaling pathway gene polymorphisms and bone response to hormone therapy in postmenopausal Korean women. *Menopause* 2011; 18 (7): 808–813.
- (49) Dutertre M, Smith CL. Molecular Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Action. *JPET* 2000; 295 (2): 431–437.
- (50) Maricic M, Gluck O. Review of raloxifene and its clinical applications in osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3 (6): 767–775.
- (51) European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000184/human_med_000772.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Dostop: 06.03.2012.
- (52) Osborne CK, Zhao HH, Fuqua SAW. Selective Estrogen Receptor Modulators: Structure, Function, and Clinical Use. *J Clin Oncol* 2000; 18 (17): 3172–3186.
- (53) Ullrich JW, Miller CP. Estrogen receptor modulator review. *Expert Opin Ther Patents* 2006; 16 (5): 559–572.
- (54) Ettinger B, Black DM, Mitlak BH et al. Reduction of Vertebral Fracture Risk in Postmenopausal Women With Osteoporosis Treated With Raloxifene Results From a 3-Year Randomized Clinical Trial. *JAMA* 1999; 282 (7): 637–645.

- (55) Rey JRC, Cervino EV, Rentero ML et al. Raloxifene: Mechanism of Action, Effects on Bone Tissue, and Applicability in Clinical Traumatology Practice. *Open Orthop J* 2009; 3: 14–21.
- (56) Seeman E, Crans GG, Diez-Perez A et al. Anti-vertebral fracture efficacy of raloxifene: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2006; 17: 313–316.
- (57) Jolly EE, Bjarnason NH, Neven P et al. Prevention of osteoporosis and uterine effects in postmenopausal women taking raloxifene for 5 years. *Menopause* 2003; 10 (4): 337–344.
- (58) Johnell O, Scheele WH, Lu Y et al. Additive Effects of Raloxifene and Alendronate on Bone Density and Biochemical Markers of Bone Remodeling in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *J Clin Endocr Metab* 2002; 87 (3): 985–992.
- (59) Reginster JY, Sarkar S, Zegels B et al. Reduction in PINP, a marker of bone metabolism, with raloxifene treatment and its relationship with vertebral fracture risk. *Bone* 2004; 34: 344–351.
- (60) Vogel VG, Constantino JP, Wickerham DL et al. Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing Breast Cancer. *Cancer Prev Res* 2010; 3 (6): 696–706.
- (61) Oztas E, Kurtay G. Randomized, controlled study of the effects of raloxifene on high sensitivity C-reactive protein and serum lipids. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283: 71–77.
- (62) Colacurci N, Fornaro F, Cobellis L et al. Raloxifene slows down the progression of intima-media thickness in postmenopausal women. *Menopause* 2007; 14 (5): 879–884.
- (63) Hochner-Celnikier D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 85: 23–29.
- (64) Jeong EJ, Lin H, Hu M. Disposition Mechanisms of Raloxifene in the Human Intestinal Caco-2 Model. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310 (1): 376–385.
- (65) Kiang TKL, Ensom MHH, Chang TKH. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Therapeut* 2005; 106: 97–132.
- (66) Mizuma T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: A study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *Int J Pharm* 2009; 378: 140–141.

- (67) Trontelj J. Raziskave metabolizma raloksifena z eksperimentalnimi modeli naraščajoče kompleksnosti. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani 2007.
- (68) Kemp DC, Fan PW, Stevens JC. Characterization of raloxifene glucuronidation *in vitro*: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug Metab Dispos* 2002; 30 (6): 694–700.
- (69) Yengi LG, Leung L, Kao J. The Evolving Role of Drug Metabolism in Drug Discovery and Development. *Pharm Res* 2007; 24 (5): 842–858.
- (70) Russel FGM. Chapter 2 Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal. *Enzyme and Transporter Based Drug–Drug Interactions* 2010; DOI 10.1007/978-1-4419-0840-7_2.
- (71) Beringer PM, Slaughter RL. Transporters and Their Impact on Drug Disposition. *Ann Pharmacother* 2005; 39: 1097–1108.
- (72) DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ, Kim RB. Drug Transporters in Drug Efficacy and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012; 52: 249–273.
- (73) Chang JH, Kochansky CJ, Shou M. The Role of P-glycoprotein in the Bioactivation of Raloxifene. *Drug Metab Dispos* 2006; 34 (12): 2073–2078.
- (74) Lin JH. Drug–drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Adv Drug Deliver Rev* 2003; 55: 53–81.
- (75) Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharm* 2005; 204: 216–237.
- (76) Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JHM. Concise Review: Clinical Relevance of Drug–Drug and Herb–Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter *ABCB1* (MDR1, P-glycoprotein). *The Oncologist* 2007; 12: 927–941.
- (77) Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human *ABCB1* (MDR1), *ABCC* (MRP), and *ABCG2* (BCRP) Efflux Transporters. *Int J Toxicol* 2006; 25: 231–259.
- (78) Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O et al. Functional polymorphisms of the human multidrugresistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *PNAS* 2000; 97 (7): 3473–3478.

- (79) Becker ML, Elens LLFS, Visser LE et al. Genetic variation in the *ABCC2* gene is associated with dose decreases or switches to other cholesterol-lowering drugs during simvastatin and atorvastatin therapy. *The Pharmacogenomics J* 2011; 1–6.
- (80) Franke RM, Lancaster CS, Peer CJ et al. Effect of *ABCC2* (MRP2) Transport Function on Erythromycin Metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89 (5): 693–701.
- (81) Elens L, Yombi JC, Lison D et al. Association between *ABCC2* polymorphism and lopinavir accumulation in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients. *Pharmacogenomics* 2009; 10 (10): 1189–1197.
- (82) Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (*ABCC2*) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006; 2 (3): 351–366.
- (83) Chandra P, Brouwer KLR. The Complexities of Hepatic Drug Transport: Current Knowledge and Emerging Concepts. *Pharm Res* 2004; 21 (5): 719–735.
- (84) Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Brit J Pharmacol* 2009; 158: 693–705.
- (85) Niemi M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* 2007; 8 (7): 787–802.
- (86) Fromm MF. The influence of *MDR1* polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliver Rev* 2002; 54: 1295–1310.
- (87) Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21: 25–51.
- (88) Lee CA, Cook JA, Reyner EL, Smith DA. P-glycoprotein related drug interactions: clinical importance and a consideration of disease states. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6 (5): 603–619.
- (89) Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008; 38 (7-8): 802–832.
- (90) Siarheyeva A, Lopez JJ, Glaubitz C. Localization of Multidrug Transporter Substrates within Model Membranes. *Biochemistry* 2006; 45: 6203–6211.

- (91) Han B, Gao G, Wu W et al. Association of *ABCC2* polymorphisms with platinum-based chemotherapy response and severe toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Lung cancer* 2010; doi:10.1016/j.lungcan.2010.09.001.
- (92) Svoboda M, Riha J, Wlcek K et al. Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): Regulation of Expression and Function. *Curr Drug Metab* 2011; 12: 139–153.
- (93) Fahrmayr C, Fromm MF, Koenig J. Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. *Drug Metab Rev* 2010; 42 (3): 380–401.
- (94) Funk C. The role of hepatic transporters in drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4 (4): 363–379.
- (95) Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common *MDR1* (*ABCB1*) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 860–871.
- (96) Wang D, Johnson AD, Papp AC et al. Multidrug resistance polypeptide 1 (*MDR1*, *ABCB1*) variant 3435C > T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genom* 2005; 15: 693–704.
- (97) Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW et al. A “Silent” Polymorphism in the *MDR1* Gene Changes Substrate Specificity. *Science* 2007; 315: 525–528.
- (98) Hemauer SJ, Nanovskaya TN, Abdel-Rahman SZ et al. Modulation of human placental P-glycoprotein expression and activity by *MDR1* gene polymorphisms. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 921–925.
- (99) Foote CJ, Greer W, Kiberd BA et al. *MDR1* C3435T Polymorphisms Correlate With Cyclosporine Levels in De Novo Renal Recipients. *Transpl P* 2006; 38: 2847–2849.
- (100) Basic S, Hajnsek S, Bozina N et al. The influence of C3435T polymorphism of *ABCB1* gene on penetration of phenobarbital across the blood—brain barrier in patients with generalized epilepsy. *Seizure* 2008; 17: 524–530.
- (101) Saitoh A, Singh KK, Powell CA. An *MDR1*-3435 variant is associated with higher plasma nelfinavir levels and more rapid virologic response in HIV-1 infected children. *Aids* 2005; 19: 371–380.
- (102) Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E et al. Digoxin pharmacokinetics and *MDR1* genetic polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 58: 809–812.

- (103) Laechelt S, Turrini E, Ruehmkorf A et al. Impact of *ABCC2* haplotypes on transcriptional and posttranscriptional gene regulation and function. *Pharmacogenomics J* 2011; 11: 25–34.
- (104) Naesens M, Kuypers DRJ, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug Resistance Protein 2 Genetic Polymorphisms Influence Mycophenolic Acid Exposure in Renal Allograft Recipients. *Transplantation* 2006; 82: 1074–1084.
- (105) Marsh S. Pharmacogenetics of colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6 (15): 2607–2616.
- (106) Innocenti F, Undevia SD, Chen PX et al. Pharmacogenetic analysis of interindividual irinotecan (CPT-11) pharmacokinetic (PK) variability: evidence for functional variant of *ABCC2*. *J Clin Oncol, ASCO Annual Meeting Proceedings* 2004; 22 (14S): s2010.
- (107) Izzedine H, Hulot JS, Villard E et al. Association between *ABCC2* Gene Haplotypes and Tenofovir-Induced Proximal Tubulopathy. *J Infect Dis* 2006; 194: 1481–1491.
- (108) Rodriguez-Novoa S, Labarga P, Soriano V et al. Predictors of Kidney Tubular Dysfunction in HIV-Infected Patients Treated with Tenofovir: A Pharmacogenetic Study. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 108–116.
- (109) Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. *SLCO1B1* polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genom* 2006; 16: 873–879.
- (110) Maeda K, Sugiyama Y. Impact of Genetic Polymorphisms of Transporters on the Pharmacokinetic, Pharmacodynamic and Toxicological Properties of Anionic Drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008; 23 (4): 223–235.
- (111) Lee E, Ryan S, Birmingham B et al. Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 330–341.
- (112) Nozawa T, Minami H, Sugiura S et al. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydrxycamptothecin: *in vitro* evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 2005; 33 (3): 434–439.

- (113) Niemi M, Kivistö KT, Hofmann U et al. Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the *SLCO1B1* gene (encoding OATP1B1). *Br J Clin Pharmacol* 2005; 59 (5): 602–604.
- (114) Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI et al. Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77: 468–478.
- (115) Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K et al. Functional characterization of *SLCO1B1* (OATP-C) variants, *SLCO1B1**5, *SLCO1B1**15 and *SLCO1B1**15 + C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genom* 2005; 15 (7): 513–522.
- (116) Tirona RG, Leake BF, Wolkoff AW, Kim RB. Human Organic Anion Transporting Polypeptide-C (SLC21A6) Is a Major Determinant of Rifampin-Mediated Pregnane X Receptor Activation. *JPET* 2003; 304: 223–228.
- (117) Michalski C, Cui Y, Nies AT et al. A Naturally Occurring Mutation in the *SLC21A6* Gene Causing Impaired Membrane Localization of the Hepatocyte Uptake Transporter. *J Biol Chem* 2002; 277 (45): 43058–43063.
- (118) Mwinyi J, John A, Bauer S et al. Evidence for inverse effects of *OATP-C* (*SLC21A6*) *5 and *1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 415–421.
- (119) Chung J-Y, Cho J-Y, Yu K-S et al. Effect of OATP1B1 (*SLCO1B1*) variant alleles on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 342–350.
- (120) Pasanen MK, Fredrikson H, Neuvonen PJ, Niemi M. Different Effects of *SLCO1B1* Polymorphism on the Pharmacokinetics of Atorvastatin and Rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82 (6): 726–733.
- (121) Zhang W, He Y-J, Gan Z et al. OATP1B1 polymorphism is a major determinant of serum bilirubin level but not associated with rifampicin-mediated bilirubin elevation. *Clin Exp Pharmacol P* 2007; 34: 1240–1244.
- (122) Boivin AA, Cardinal H, Barama A et al. Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1) and OATP1B3: Genetic Variability and Haplotype Analysis in White Canadians. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010; 25 (5): 508–515.
- (123) Sanna S, Busonero F, Maschio A et al. Common variants in the *SLCO1B3* locus are

- associated with bilirubin levels and unconjugated hyperbilirubinemia. *Human Molecular Genetics* 2009; 18 (14): 2711–2718.
- (124) Kang T-W, Kim H-J, Ju H et al. Genome-wide association of serum bilirubin levels in Korean population. *Hum Mol Genet* 2010; 19 (18): 3672–3678.
- (125) Trontelj J, Bogataj M, Marc J, Mrhar A. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma. *J Chrom B* 2007; 855: 220–227.
- (126) Lee H-D, Hwang H-F, Lin M-R. Use of quantitative ultrasound for identifying low bone density in older people. *J Ultrasound Med* 2010; 29: 1083–1092.
- (127) Gluer CC, Wu CY, Jergas M et al. Three quantitative ultrasound parameters reflect bone structure. *Calcified Tissue Int* 1994; 55 (1): 46–52.
- (128) Minkov DM, Rossmanov VB, Clerck N et al. Micro-computer tomography and bilateral ultrasound osteometry of patients subject to total hip arthroplasty. *J Biomed Clin Res* 2009; 2 (2): 119–124.
- (129) NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. Thermo Fisher Scientific Inc. 2008.
- (130) Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215–220.
- (131) TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol. Applied Biosystems 2005; Part Number 4362038 Rev. A, 6/2005.
- (132) Gou SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 361–372.
- (133) Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 449–462.
- (134) Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978–989.
- (135) Oswald S, König J, Lütjohann D et al. Disposition of ezetimibe is influenced by polymorphisms of the hepatic uptake carrier OATP1B1. *Pharmacogenet Genom* 2008, 18: 559–568.
- (136) Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 22–32.

- (137) Jeannesson E, Siest G, Bastien B et al. Association of ABCB1 gene polymorphisms with plasma lipid and apolipoprotein concentrations in the STANISLAS cohort. *Clin Chim Acta* 2009; 403: 198–202.
- (138) Štalc J, Tominc U. Primerjava endotelijske funkcije in magnetnoresonančnih lastnosti žilne stene med bolniki s klasično in dilatativno obliko ateroskleroze. *Med Razgl* 2003; 42: 229–242.

8. PRILOGE

Priloga 1: Genotipi preiskovank za polimorfizme 388A>G in 521T>C v genu *SLCO1B1*, 3435C>T v genu *ABCB1*, 3972C>T v genu *ABCC2* in C>G v intronu 7 gena *SLCO1B3*.

Zaporedna št. vzorca	Genotip za polimorfizem				
	388A>G v genu <i>SLCO1B1</i>	521T>C v genu <i>SLCO1B1</i>	3435C>T ali 3435G>A v genu <i>ABCB1</i>	3972C>T v genu <i>ABCC2</i>	C>G v intronu 7 gena <i>SLCO1B3</i>
587	AG	TT	AA	TT	CC
588	AA	TT	GA	CT	CC
589	AG	TT	GA	CC	CC
590	AG	TT	GG	TT	CC
591	GG	TT	AA	CT	CG
592	AG	TC	GA	CC	CG
593	AA	TT	GA	CT	CC
594	AG	TC	GG	CC	CC
595	AA	TT	AA	CT	CC
596	AA	TT	GG	CC	CC
597	AG	TT	AA	TT	CC
598	GG	TC	GA	CT	CC
599	AA	TC	AA	CT	CC
600	AG	TT	GA	CT	CC
601	AG	TT	GG	CC	CG
602	GG	TT	GG	CC	GG
603	AG	TT	GA	CC	CC
604	AG	TT	GA	CC	CG
605	AG	TT	AA	TT	CG
606	AG	TT	GG	CC	CG
607	AA	TT	GA	CC	CC
608	AA	TT	GG	CC	CC
609	AG	TT	GA	CC	CC
610	AG	TT	GA	CC	CC
611	AG	TT	GG	TT	CG
612	AA	TT	GA	CC	CC
613	AG	TT	GA	CC	CC
614	GG	TC	GG	TT	CG
615	GG	TC	GG	CT	CC
616	AG	TC	GA	CT	CC
617	AA	TT	AA	CC	CC

618	GG	TT	GA	TT	CC
619	AG	TT	GA	CT	CC
620	GG	TC	GG	CT	CC
621	AA	TT	AA	TT	CC
622	AG	TC	AA	CC	CC
623	AG	TC	GG	CC	CC
624	AA	TT	GG	CT	CC
625	AA	TT	GG	CC	CC
626	GG	TC	AA	CC	CC
627	AG	TC	AA	CC	CG
628	AG	TT	AA	CC	CC
629	AG	TT	AA	TT	CC
630	AG	TC	GA	CC	CC
631	AG	TC	AA	CT	CC
632	GG	TC	GA	CT	CC
633	AG	TT	AA	CC	CG
634	AA	TC	GG	CC	CG
635	GG	TT	GA	TT	CG
636	AG	TC	GG	CT	CC
637	GG	TT	AA	TT	CG
638	AA	TT	GA	CC	CC
639	AG	TT	GG	CT	CG
640	GG	TC	GG	CC	CG
659	AG	TT	AA	CT	CG
660	AA	TC	AA	CT	CC
661	AG	TC	GA	CT	CC
662	AG	TC	GA	CC	CG
663	AA	TT	GA	CT	CC
664	AA	TT	GG	CT	CC
665	GG	TT	GA	CT	CG
666	GG	TC	GA	CC	CG
667	AA	TT	GA	CT	CC