

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katarina ŠTRUKELJ

**VPLIV GENETSKEGA POLIMORFIZMA ApoE
NA KONCENTRACIJO PLAZEMSKIH
LIPOPROTEINOV IN NA VIŠINO DNEVNEGA
ODMERKA VARFARINA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katarina ŠTRUKELJ

**VPLIV GENETSKEGA POLIMORFIZMA ApoE NA
KONCENTRACIJO PLZEMSKIH LIPOPROTEINOV IN NA
VIŠINO DNEVNEGA ODMERKA VARFARINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF ApoE GENETIC POLYMORPHISM ON
PLASMA LIPOPROTEIN LEVELS AND WARFARIN DAILY
DOSE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Vito Dolžan.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: prof. dr. Vita Dolžan
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 28.8.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Katarina Štrukelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 577.2:575.8:616(043.2)=863
- KG genetski polimorfizem/ApoE/lipoproteini/varfarin
- AV ŠTRUKELJ Katarina
- SA DOLŽAN Vita
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN VPLIV GENETSKEGA POLIMORFIZMA ApoE NA KONCENTRACIJO PLAZEMSKIH LIPOPROTEINOV IN NA VIŠINO DNEVNEGA ODMERKA VARFARINA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 63 str., 15 pregl., 10 sl., 28 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V diplomskem delu smo na vzorcu 200 bolnikov na dolgotrajnem antikoagulacijskem zdravljenju z varfarinom raziskovali vpliv genotipov *ApoE* na koncentracije plazemskega ApoE, plazemskih lipidov in višino dnevnega odmerka varfarina. Rezultati so pokazali, da imajo osebe z genotipom e2/e4 statistično značilno višje koncentracije ApoE v plazmi kot osebe z genotipom e3/e3 ($p=0,001$) in e3/e4 ($p<0,001$). Prav tako so imele osebe z genotipom e2/e3 statistično značilno višje koncentracije ApoE v plazmi kot osebe z genotipom e3/e3 ($p<0,001$) in e3/e4 ($p<0,001$). Tudi osebe z genotipom e3/e3 so imele statistično značilno višje koncentracije plazemskega ApoE v primerjavi z osebami z genotipom e3/e4 ($p=0,016$). Statistično značilnih razlik v koncentracijah celokupnega holesterola in HDL holesterola v plazmi med osebami z različnimi genotipi *ApoE* nismo zasledili. Osebe z genotipom e2/e3 so imele statistično značilno nižje koncentracije LDL holesterola v plazmi v primerjavi z osebami, ki so imele genotip e3/e3 ($p=0,005$) in e3/e4 ($p=0,044$), osebe z genotipom e2/e4 pa so imele statistično značilno višje koncentracije trigliceridov v plazmi kot osebe z genotipom e3/e3 ($p=0,027$). Z multiplo logistično regresijo smo ob upoštevanju drugih genetskih in negenetskih dejavnikov, za katere je znano, da vplivajo na odmerek varfarina, ugotovili, da potrebujejo osebe z genotipom e2/e4 statistično značilno višje dnevne odmerke varfarina v primerjavi z osebami, ki imajo genotip e3/e3 ($p=0,005$).

KEY WORDS DOCUMENTATION

- SD Dn
- DC UDC 577.2:575.8:616(043.2)=863
- CX genetic polymorphism/ApoE/lipoproteins/warfarin
- AU ŠTRUKELJ Katarina
- AA DOLŽAN Vita
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI THE INFLUENCE OF ApoE GENETIC POLYMORPHISM ON PLASMA LIPOPROTEIN LEVELS AND WARFARIN DAILY DOSE
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 63 p., 15 tab., 10 fig., 28 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We investigated the effect of *ApoE* genotypes on plasma ApoE, plasma lipid levels and warfarin daily dose in 200 patients on warfarin maintenance therapy. Plasma ApoE levels were significantly higher in patients carrying e2/e4 genotype compared to the e3/e3 (p=0,001) and e3/e4 (p<0,001) genotype. Patients with e2/e3 genotype had statistically significant higher plasma ApoE levels than patients with e3/e3 (p<0,001) and e3/e4 (p<0,001) genotype. Patients with e3/e3 genotype had statistically significant higher plasma ApoE levels compared to the patients with e3/e4 (p=0,016) genotype. The levels of plasma total cholesterol and HDL cholesterol did not differ significantly between the *ApoE* genotypes, but plasma LDL cholesterol levels were significantly lower in patients with e2/e3 genotype compared to the e3/e3 (p=0,005) and e3/e4 (0,044) genotype. The triglyceride plasma levels were significantly higher in patients with e2/e4 genotype compared to the e3/e3 (p=0,027) genotype. Multivariate linear regression was performed to evaluate the influence of *ApoE* genotype on warfarin daily dose. When we accounted for other variables, reported to influence warfarin dose requirement the results showed that patients with e2/e4 genotype required significantly higher warfarin doses than patients with the e3/e3 (p=0,005) reference genotype.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO TABEL	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1. UVOD	1
2. NAMEN DELA	3
3. DELOVNE HIPOTEZE	3
4. PREGLED OBJAV	4
4.1. Gen <i>ApoE</i>	4
4.1.1. Polimorfizmi gena <i>ApoE</i>	4
4.1.2. Pogostost alelov <i>ApoE</i>	5
4.2. ApoE	6
4.2.1. Funkcije ApoE	7
4.3. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na koncentracijo ApoE v plazmi	8
4.4. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na koncentracijo lipidov v plazmi	9
4.5. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na nekatere bolezni	11
4.6. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na farmakokinetiko nekaterih zdravil	13
4.7. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na zdravljenje z varfarinom	14
4.7.1. Varfarin	14
4.7.1.1. Farmakokinetika varfarina	16
4.7.1.2. Farmakodinamika varfarina	17
4.7.2. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na privzem vitamina K1 v jetra	17
4.7.3. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na odmerek varfarina	18
5. MATERIAL IN METODE	20
5.1. Preiskovanci	20
5.2. Odvzem krvi	21
5.3. Izolacija DNA	21

5.4. Meritve koncentracij ApoE in lipidov v plazmi	21
5.5. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	21
5.5.1. Princip	21
5.5.2. Reagenti	22
5.5.3. Postopek	22
5.6. Preverjanje produktov reakcije PCR z elektroforezo na agaroznem gelu	23
5.6.1. Princip	23
5.6.2. Reagenti	23
5.6.3. Postopek	23
5.7. Cepljenje pomnoženih produktov z encimom <i>HhaI</i>	24
5.7.1. Princip	24
5.7.2. Reagenti	25
5.7.3. Postopek	25
5.8. Ločevanje cepljenih produktov z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu	25
5.8.1. Princip	25
5.8.2. Reagenti	26
5.8.3. Postopek	26
5.9. Določanje genotipov <i>ApoE</i>	27
5.10. Statistična analiza	27
5.10.1. Analiza variance	27
5.10.2. Linearna regresija	28
6. REZULTATI	29
6.1. Določanje genotipov <i>ApoE</i>	29
6.2. Pogostost genotipov in alelov <i>ApoE</i>	32
6.3. Genotip <i>ApoE</i> in koncentracija ApoE v plazmi	34
6.4. Genotip <i>ApoE</i> in koncentracija lipidov v plazmi	36
6.4.1. Genotip <i>ApoE</i> in koncentracija celokupnega holesterola v plazmi	36
6.4.2. Genotip <i>ApoE</i> in koncentracija HDL holesterola v plazmi	37
6.4.3. Genotip <i>ApoE</i> in koncentracija LDL holesterola v plazmi	39
6.4.4. Genotip <i>ApoE</i> in koncentracija trigliceridov v plazmi	40
6.5. Genotip <i>ApoE</i> in višina dnevnega odmerka varfarina	42

7. RAZPRAVA IN SKLEPI	44
7.1. Razprava	44
7.1.1. Določanje genotipov <i>ApoE</i>	44
7.1.2. Pogostost genotipov in alelov <i>ApoE</i>	44
7.1.3. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na koncentracijo ApoE v plazmi	45
7.1.4. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na koncentracijo lipidov v plazmi	46
7.1.4.1. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na koncentracijo celokupnega holesterola v plazmi	47
7.1.4.2. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na koncentracijo HDL holesterola v plazmi	48
7.1.4.3. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na koncentracijo LDL holesterola v plazmi	49
7.1.4.4. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na koncentracijo trigliceridov v plazmi	50
7.1.5. Vpliv genotipa <i>ApoE</i> na višino dnevnega odmerka varfarina	52
7.2. Sklepi	55
8. POVZETEK	57
9. VIRI	60

KAZALO TABEL

Tabela 1: Razlike med aleli <i>ApoE</i> in izoformami ApoE	5
Tabela 2: Lipoproteini v človeški plazmi	7
Tabela 3: Zaporedja začetnih oligonukleotidov ApoE F in ApoE R	22
Tabela 4: Velikost fragmentov pri različnih genotipih <i>ApoE</i> po cepitvi z encimom <i>HhaI</i>	27
Tabela 5: Pogostost genotipov <i>ApoE</i> v preiskovanem vzorcu	32
Tabela 6: Pogostost alelov <i>ApoE</i> v preiskovanem vzorcu	32
Tabela 7: Pogostost genotipov <i>ApoE</i> v različnih populacijah	33
Tabela 8: Pogostost alelov <i>ApoE</i> v različnih populacijah	33
Tabela 9: Koncentracija ApoE v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	34
Tabela 10: Koncentracija celokupnega holesterola v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	36
Tabela 11: Koncentracija HDL holesterola v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	37
Tabela 12: Koncentracija LDL holesterola v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	39
Tabela 13: Koncentracija trigliceridov v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	40
Tabela 14: Višina dnevnega odmerka varfarina glede na genotip <i>ApoE</i>	42
Tabela 15: Vpliv spremenljivk na višino dnevnega odmerka varfarina	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz cepitvenih mest za encim <i>HhaI</i> na alelih <i>ApoE</i>	25
Slika 2: Preverjanje produktov reakcije PCR pomnoženega dela gena <i>ApoE</i> po elektroforezi na agaroznem gelu	29
Slika 3: Analiza pomnoženih produktov dela gena <i>ApoE</i> , cepljenih z encimom <i>HhaI</i> , po elektroforezi na poliakrilamidnem gelu	30
Slika 4: Analiza pomnoženih produktov dela gena <i>ApoE</i> , cepljenih z encimom <i>HhaI</i> , po elektroforezi na poliakrilamidnem gelu	31
Slika 5: Koncentracija ApoE v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	34
Slika 6: Koncentracija celokupnega holesterola v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	36
Slika 7: Koncentracija HDL holesterola v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	38
Slika 8: Koncentracija LDL holesterola v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	39
Slika 9: Koncentracija trigliceridov v plazmi glede na genotip <i>ApoE</i>	41
Slika 10: Višina dnevnega odmerka varfarina glede na genotip <i>ApoE</i>	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ApoE	apolipoprotein E
<i>ApoE</i>	gen za apolipoprotein E
APS	amonijev peroksodisulfat
Arg	aminokislina arginin
bp	bazni par
Cys	aminokislina cistein
CYP2C9	encim citokrom P450 2C9
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
FII	koagulacijski faktor II
FVII	koagulacijski faktor VII
FIX	koagulacijski faktor IX
FX	koagulacijski faktor X
GGCX	encim gama glutamil karboksilaza
HDL	lipoproteini visoke gostote
IDL	lipoproteini srednje gostote
INR	mednarodno umerjeno razmerje (»international normalized ratio«)
LDL	lipoproteini nizke gostote
PCR	verižna reakcija s polimerazo
TBE	Tris-borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-1-,2-diaminometan
Tris-HCL	tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorid
VKOR	encim vitamin K epoksid reduktaza
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote

1. UVOD

Apolipoprotein E (ApoE) je 34 kDa velik glikoziliran protein. Najpomembnejša naloga ApoE je prenašanje lipidov po krvnem obtoku do tarčnih celic, v plazmi pa ga najdemo tudi prostega, nevezanega z lipidi. ApoE je eden izmed glavnih proteinov, ki sestavljajo hilomikrone in njihove ostanke, lipoproteine zelo majhne gostote (VLDL) in lipoproteine srednje gostote (IDL). Najdemo ga tudi v nekaterih subfrakcijah lipoproteinov velike gostote (HDL), v zelo majhnih količinah pa naj bi gradil tudi lipoproteine majhne gostote (LDL). ApoE je pomemben tudi kot ligand za nekatere lipoproteinske receptorje na celicah. Znano je, da prav ApoE s svojo vezavo na receptorje omogoči vstop lipoproteinskim delcem v tarčne celice. Čeprav ga nekateri lipoproteinski delci ne vsebujejo, pa ga, preden vstopijo v celice, vežejo nase, kar omogoči prenos lipidov v celično notranjost.

V genu za ApoE (*ApoE*) je znanih veliko polimorfizmov. Najpogostejši genetski polimorfizem *ApoE* določa tri alele, e2, e3 in e4, med katerimi je v populacijah najpogosteje zastopan alel e3. Trije aleli *ApoE* določajo tri izoforme ApoE, E2, E3 in E4. Izoformi E2 in E4 se od izoforme E3 razlikujeta v eni aminokislino na mestu 112 (E4) oziroma na mestu 158 (E2). Mesto za vezavo ApoE na receptorje naj bi po nekaterih podatkih obsegalo področje med 130. in 150. aminokislino proteina, drugi pa navajajo kot področje s to funkcijo mesta med 136. in 158. aminokislino v proteinu. Če velja zadnja hipoteza, potem je povsem možno, da genetski polimorfizem *ApoE* prek vpliva, ki ga ima na zgradbo ApoE, določa afiniteto vezave ApoE v lipoproteinih na lipoproteinske celične receptorje, s tem pa na količino sprejetih lipidov v celice. Mesto 112 v ApoE naj bi bilo odgovorno za vezavo ApoE na specifične lipide in posledica genetskega polimorfizma *ApoE*, ki spremeni aminokislino na mestu 112, bi lahko bila spremenjena afiniteta izoform ApoE do nekaterih lipidov v plazmi. To bi pomenilo spremenjene koncentracije lipidov v plazmi pri nosilcih različnih genotipov *ApoE*. Koncentracija ApoE v plazmi bi bila prav tako lahko odvisna od afinitete izoform ApoE do lipoproteinskih celičnih receptorjev.

Zaradi naraščanja srčno-žilnih bolezni v razvitem svetu se močno povečuje uporaba zdravil za njihovo zdravljenje. Eno izmed pogosto uporabljenih zdravil, ki se ga predpisuje pri atrijski fibrilaciji, venski trombozi, pljučni emboliji, težavah z zaklopkami in po infarktu je varfarin, kumarinski antikoagulant. Varfarin zavira delovanje encima vitamin K1 1,2-epoksid reduktaze (VKOR), ki pretvarja oksidirano obliko vitamina K1 v reducirano obliko vitamina K1, ki je kofaktor encima gama glutamil karboksilaze (GGCX). Encim GGCX pretvori koagulacijske faktorje FII, FVII, FIX in FX ter proteine C, S in Z v aktivno obliko. Varfarin tako preprečuje aktivacijo od vitamina K odvisnih faktorjev strjevanja krvi, s tem pa zavira nastajanje krvnih strdkov in zmanjšuje tveganje za možganski ali srčni infarkt. Varfarin je znan po svoji ozki terapevtski širini ter po velikih razlikah v višini dnevnega odmerka med bolniki. Če bolnik jemlje previsoke odmerke varfarina, se lahko pojavijo hude krvavitve, ob prenizkem odmerku varfarina pa ni zaščitnega učinka pred trombozo. Vitamin K1, ki je topen v maščobah, dobi organizem s prehrano, po absorpciji iz črevesja pa se veže na hilomikrone in prenese do jetrnih celic. Da lahko vitamin K1 vstopi v celice, je potrebna vezava ApoE, ki gradi hilomikrone, na receptorje. Izoforme ApoE, določene z genetskimi polimorfizmi gena *ApoE*, bi lahko določale afiniteto vezave hilomikronov na celične receptorje in s tem vplivale na količino privzetega vitamina K1 v celice. Koncentracija vitamina K1 v jetrnih celicah pa bi lahko vplivala na višino dnevnega odmerka varfarina, potrebnega za doseg terapevtskega učinka.

Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracije lipidov v plazmi je že precej raziskan, o vplivu genotipa *ApoE* na višino odmerka varfarina pa je le malo znanega. Maloštevilne raziskave na to temo so pokazale nasprotujoče rezultate, zato nas je v diplomskem delu zanimalo, kakšen je vpliv genotipa *ApoE* na odmerek varfarina v slovenski populaciji bolnikov. Na preučevanem vzorcu, ki ga je sestavljalo 200 bolnikov na dolgotrajnem antikoagulacijskem zdravljenju z varfarinom, smo ugotavljali odnos med genotipi *ApoE* in šestimi izbranimi dejavniki: plazemsko koncentracijo ApoE, celokupnega holesterola, HDL holesterola, LDL holesterola, trigliceridov in višino dnevnega odmerka varfarina. Bolnikom smo določili genotip *ApoE* tako, da smo najprej z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožili specifičen del gena *ApoE* in pomnožene produkte preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Uspešno pomnožene dele gena *ApoE* smo cepili z encimom *HhaI*,

produkte cepljenja analizirali z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu in določili pogostost genotipov in alelov *ApoE* v vzorcu. Pogostost genotipov in alelov *ApoE* v slovenski populaciji smo primerjali s pogostostjo genotipov in alelov *ApoE* v nekaterih drugih evropskih populacijah. S statistično analizo smo preverjali morebitno statistično značilno povezanost genotipov *ApoE* s plazemsko koncentracijo ApoE, celokupnega holesterola, HDL holesterola, LDL holesterola ter trigliceridov in višino dnevnega odmerka varfarina.

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil:

- določiti pogostost genotipov in alelov *ApoE* 200 bolnikom na dolgotrajnem antikoagulacijskem zdravljenju z varfarinom in jih primerjati s pogostostjo ostalih evropskih populacij.

Poleg tega smo želeli odgovoriti na vprašanja:

- ali genotip *ApoE* vpliva na koncentracijo ApoE v plazmi,
- ali genotip *ApoE* vpliva na koncentracijo celokupnega holesterola, HDL holesterola, LDL holesterola in trigliceridov v plazmi,
- ali genotip *ApoE* vpliva na višino dnevnega odmerka varfarina.

3. DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljali smo, da imajo osebe z različnimi genotipi *ApoE* v plazmi različne koncentracije ApoE, celokupnega holesterola, HDL holesterola, LDL holesterola in trigliceridov. Prav tako smo pričakovali, da genotip *ApoE* vpliva na višino dnevnega odmerka varfarina.

4. PREGLED OBJAV

4.1. Gen *ApoE*

Gen, v katerem je zapis za ApoE, leži na dolgem kraku devetnajstega kromosoma (19q13.2) in obsega 3700 nukleotidov (Hixson in Vernier, 1990, Siest s sod., 2000). Gen *ApoE* pripada genski družini, ki vsebuje še pet genov za apolipoproteine A-I, A-II, C-I, C-II in C-III. Gen *ApoE* je na lokusu v skupini genov, ki jo sestavljajo gena *ApoC-I* in *ApoC-II* ter psevdogen *ApoC-I'* (Siest s sod., 2000).

Gen *ApoE* obsega štiri eksone, ki jih ločujejo trije introni. Prvi ekson ne nosi zapisa za aminokislino funkcionalnega ApoE. Drugi ekson nosi zapis za prvih 14 aminokislin signalnega peptida. Tretji ekson določa aminokislino konca signalnega peptida in prvih 61 aminokislin zrelega proteina. Četrty ekson vsebuje zapis za ostale aminokislino zrelega proteina. Ima tudi specifično strukturo in sicer vzorec 66 ponavljajočih se nukleotidov, ki v proteinu tvorijo alfa amfifilne helikse. Ta del gena predstavlja predel v človeškem genomu, ki je bogat z gvaninom in citozinom. Četrty ekson vsebuje tudi stotine nekodirajočih nukleotidov na 3' koncu. Opisanih je kar nekaj pozitivnih in negativnih regulatornih elementov v intronskem in 5' regulatornem zaporedju gena *ApoE*. Nekateri elementi v 5' in 3' neprevedenem območju so tkivno specifični (Siest s sod., 2000).

4.1.1. Polimorfizmi gena *ApoE*

V genu *ApoE* je znanih kar nekaj mutacij, med katerimi je najpogostejši polimorfizem, ki določa tri alele e2, e3 in e4 ter daje šest možnih genotipov. Najpogosteje zastopan alel *ApoE* v vseh populacijah po svetu je alel e3, zato velja za normalni alel. Kot je prikazano v tabeli 1, se alel e4 od alela e3 razlikuje v nukleotidu 334 (T→C), alel e2 pa v nukleotidu 472 (C→T) (Kohnke s sod., 2005a). Pri tem gre za tranzicijsko zamenjavo, saj se zamenja pirimidin s pirimidinom. Vprašanje, kateri alel je predniški, še ni v celoti pojasnjeno. Kljub temu, da večina znanstvenikov za izvirno obliko gena zaradi njegove pogostosti postavlja alel e3, pa Siest meni, da je predniška oblika gena alel e4 (Siest s sod., 2000).

Ker substitucija prve baze v kodonu v primeru gena *ApoE* spremeni zapis za aminokislino, je ApoE polimorfen protein. Posledica genetskega polimorfizma *ApoE* so tri izoforme ApoE, E2, E3 in E4, ki se med seboj razlikujejo v eni ali dveh aminokislinah, kot kaže tabela 1 (Siest s sod., 2000).

Tabela 1: Razlike med aleli *ApoE* in izoformami ApoE.

alel <i>ApoE</i> (izoforma ApoE)	baze na mestih 472-474 v 4. eksonu (aminokislina na mestu 158)	baze na mestih 334-336 v 4. eksonu (aminokislina na mestu 112)
e2 (E2)	- TGC - (cistein)	- TGC - (cistein)
e3 (E3)	- CGC - (arginin)	- TGC - (cistein)
e4 (E4)	- CGC - (arginin)	- CGC - (arginin)

Poleg teh dveh najpogostejših polimorfizmov so opisali še štiri polimorfizme v promotorski regiji gena *ApoE*. Kaže, da je njihov najpomembnejši vpliv izražanje gena *ApoE*. Od stopnje izražanja pa je odvisna koncentracija ApoE v organizmu (Siest s sod., 2000). V genu *ApoE* je bilo opisanih še nekaj polimorfizmov, ki pa se ne odražajo v spremembah aminokislinskega zaporedja (Siest s sod., 2000).

4.1.2. Pogostost alelov *ApoE*

Pogostost alelov *ApoE* je med populacijami po svetu različna, najpogosteje pa je zastopan alel e3. Za kavkazijsko populacijo v Evropi veljajo približki frekvenc: alel e2 5 %, alel e3 80 % in alel e4 15 %. Frekvence alela e4 se sicer v Evropi gibljejo med 5 % in 23 % in frekvenčni gradient alela e4 je zelo opazen: najvišje frekvence so v severnih državah Evrope, najnižje frekvence pa se pojavljajo v južni Evropi. Najvišje frekvence alela e4 najdemo pri prebivalcih Papua Nove Gvineje - okrog 37 %, sledijo jim Laponci z 31 %. Tudi avstralski Aborigini imajo visok delež alela e4, kar 26 %. V črnski populaciji prebivalcev Afrike in Združenih držav Amerike ima alel e4 20 % do 30 % oseb. Najnižje frekvence alela e4 so ugotovljene pri Azijcih (Tajci - 5 %, Kitajci - 7 % do 9 %, Japonci - 6,7 % do 12 %). Pogostost alelov se spreminja tudi s starostno strukturo prebivalstva. Alela e2 je pri osebah, starejših od 80 let, dvakrat več kot pri mlajših (Siest s sod., 2000).

4.2. ApoE

ApoE se sintetizira kot propeptid. Ta vsebuje signalni peptid iz 18 aminokislin, ki se odcepijo v endoplazemskem retikulumu. Zrel protein sestavlja 299 aminokislin in njegova molekulska masa je 34 200 Da (Siest s sod., 2000). Na aminokislinskem ostanku 194 je O-glikoziliran. Vloga glikozilacije ni popolnoma pojasnjena, vendar pa domnevajo, da glikozilacija ni nujno povezana s sekrecijo (Siest s sod., 2000). ApoE ima dve mesti, to sta aminokislini na mestih 191 in 215, kjer pride do cepitve ob navzočnosti trombina. Po cepitvi s trombinom na mestih 191 in 215 tako nastaneta dve proteinski domeni, ki se med seboj razlikujeta po strukturi in funkciji. N-terminalna domena vsebuje aminokislino od 1. do 191. mesta in ima 22 kDa. Vsebuje mesto (aminokislino 136 do 158), s katerim se ApoE veže na celične receptorje. Na tej domeni leži tudi področje (aminokislino 171 do 183), ki služi interakciji s heparan sulfat proteoglikani. Področje, ki obsega aminokislino med mestoma 21 in 62, je vezavno mesto za tiroidni hormon. Mesta 61, 109 in 112 pa so bistvena za vezavo izoform ApoE na specifične lipide. C-terminalno domeno sestavljajo aminokislino od 216. do 299. mesta. Molekulska masa te domene je 10 kDa. Na tej domeni je področje, na katerega se vežejo lipidi (najbolj specifično območje za vezavo lipidov je med aminokislina 245 do 299). Če ApoE ni povezan z lipidi, se spontano povezuje z drugimi ApoE in tvori tetramere. Področje, ki je odgovorno za to, leži na predelu od 267. do 299. aminokislino. ApoE lahko poleg prej omenjenih tetramerov tvori tudi homodimere in heterodimere z apolipoproteini A-II prek disulfidnih mostov, ki nastanejo na cisteinskih ostankih.

Gen *ApoE* se izraža v različnih tkivih, na primer v jetrih, možganih, pljučih, ledvici, jajčnikih, vranici in gladkih mišicah. V nasprotju z ostalimi apolipoproteini pa se ApoE ne sintetizira v endoteliju črevesnega trakta. Največ plazemskega ApoE, kar 90 %, nastane v jetrih. Od tega ga približno 10 % sintetizirajo zreli makrofagi, zbrani v jetrih. Jetrno sekrecijo ApoE pospešujejo holesterol in maščobne kisline, zmanjšujejo pa nekateri hormoni, kot so inzulin, ščitnični hormoni, estrogen. Na stopnjo izločanja naj bi lahko vplivala tudi nekatera zdravila in alkohol. Drugo pomembno področje sinteze ApoE so možganski astrociti, zato je ApoE eden glavnih proteinov, ki jih najdemo v cerebrospinalni tekočini (Siest s sod., 2000).

4.2.1. Funkcije ApoE

ApoE ima številne funkcije in ga najdemo tako v plazmi kot v tkivih. Njegova pomembna funkcija je povezovanje z lipidi, ki jih prenašajo po obtoku do tarčnih tkiv in organov (Siest s sod., 2000). Najpogostejši lipidi, ki se prenašajo po krvnem obtoku, so trigliceridi in prost ali zaestren holesterol. Prenasajo se v lipoproteinskih kompleksih, ki jih sestavljajo specifični proteini – apolipoproteini – in različne kombinacije lipidov (trigliceridi, fosfolipidi, holesterol ...). Lipidi so nepolarni in povezava med njimi in proteini, ki jih prenašajo, je nekovalentna. Hidrofobni del lipidov se poveže s hidrofobnimi aminokislinami v proteinu (Boyer, 2005). ApoE je večinski protein, ki gradi hilomikrone, delce VLDL in IDL, vsebujejo ga tudi delci HDL, v majhnih količinah pa so ga zaznali tudi v delcih LDL (Sing in Davignon, 1985). Lastnosti plazemskih lipoproteinov so prikazane v tabeli 2.

Tabela 2: Lipoproteini v človeški plazmi
(povzeto po <http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/studenti/Teze/Membrane/3TrnLip/LPSest.pdf>).

	hilomikroni	delci VLDL	delci LDL	delci IDL	delci HDL
velikost (nm)	75 – 1200	30 - 80	18 - 25	25 - 35	5 - 12
gostota (g/cm ³)	manj kot 0,950	manj kot 1,006	približno 1,041	približno 1,012	1,063 - 1,210
masa (MDa)	400	10 - 80	2,3	5 - 10	0,175 - 0,360
proteini (%)	1,5 - 2,5	5 - 10	20 - 25	15 - 20	40 – 55
trigliceridi (%)	84 – 89	50 - 65	7 - 10	22	3 – 5
fosfatidi (%)	7 - 9	15 - 20	15 - 20	22	20 – 35
prost holesterol (%)	1 – 3	5 - 10	7 - 10	8	3 – 4
zaestren holesterol (%)	3 – 5	10 - 15	35 - 40	30	12
apolipoproteini, ki jih sestavljajo	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	B-100, C-III, E	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E

Lipoproteini iz krvnega obtoka vstopajo v celice z receptorsko posredovano endocitozo. Tudi tu se izkaže pomembnost ApoE, saj v tem procesu nastopa v vlogi liganda za nekatere lipoproteinske celične receptorje. Avtorji člankov navajajo različne receptorje, na katere bi se ApoE lahko vezal. Največkrat omenjajo receptor LDL (ApoB/E) in receptor ApoE (z receptorjem LDL povezan protein). Med možne receptorje, na katere bi se ApoE lahko vezal, pa nekateri prištevajo še receptor VLDL, receptor 2 ApoE ter receptor tipa 1 razreda B (Siest s sod., 2000).

Nekatere novejšje študije predvidevajo, da se ApoE ne povezuje samo s prej omenjenimi receptorji, ampak tudi s heparan sulfat proteoglikani, ki so prav tako na celični površini. To sodelovanje naj bi med drugim uravnavalo znotrajcelične poti lipoproteinov, in sicer prek vpliva na delovanje lipoproteinske lipaze. Tako bi koncentracija kot tudi lokacija ApoE v lipoproteinih določala količino interakcij z receptorji na celicah in z lipazo znotraj celic (Siest s sod., 2000).

ApoE ima poleg klasične vloge - sodelovanja v lipidnem metabolizmu - še ostale pomembne funkcije. Sem sodijo obnova živčnih celic v perifernem živčevju, proliferacija in diferenciacija gladkih mišičnih celic, kot kofaktor uravnava aktivnost nekaterih encimov, ki sodelujejo v lipidnem metabolizmu, ima pa tudi pomembno vlogo pri regulaciji nekaterih imunskih procesov (Siest s sod., 2000).

4.3. Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo ApoE v plazmi

Po doslej znanih podatkih je genotip *ApoE* le eden izmed dejavnikov, ki vplivajo na koncentracije plazemskega ApoE. Posledica posameznikovega genotipa *ApoE* naj bi bila variabilnost v plazemskih koncentracijah ApoE v višini od 6 % do 30 %. Najvišje plazemske vrednosti ApoE najdemo pri nosilci genotipa e2/e2, najnižje pri nosilcih genotipa e4/e4, osebe z genotipom e3/e3 pa imajo vmesne vrednosti. Genetski dejavniki, ki bi prav tako lahko vplivali na koncentracije ApoE v plazmi, so polimorfizmi gena *ApoE* v promotorski regiji.

V zdravi populaciji naj bi imeli največji vpliv na plazemsko koncentracijo ApoE genetski polimorfizem *ApoE* (predvsem genotip e2/e2), indeks telesne mase, starost, spol in geografsko območje (v Evropi je opazen koncentracijski gradient ApoE v smeri sever - jug, saj so na severu Evrope koncentracije ApoE precej nižje kot na jugu Evrope). Koncentracija ApoE v plazmi pa naj ne bi bila povezana z življenjskim slogom posameznika, čeprav naj bi prekomerno pitje alkohola in kajenje zviševalo plazemske koncentracije ApoE (Siest s sod., 2000).

4.4. Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo lipidov v plazmi

Večina študij, ki je preučevala vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo lipidov v plazmi, je ugotovila, da je alel e4 pri zdravih posameznikih povezan z višjimi koncentracijami celokupnega in LDL holesterola, alel e2 pa z nižjimi. Poleg tega naj bi bila alela e2 in e4 povezana z višjimi koncentracijami plazemskih trigliceridov, najnižje trigliceridne vrednosti pa so našli pri osebah z genotipom e3/e3 (Siest s sod., 2000).

Raziskava, izvedena na zdravih prebivalcih Tajske, ni pokazala statistično značilnih razlik med genotipi *ApoE* in koncentracijami različnih plazemskih lipidov (Lin s sod., 2004).

Študija na finskih otrocih in mladostnikih je pokazala, da plazemske koncentracije celokupnega in LDL holesterola med genotipi *ApoE* statistično značilno naraščajo v naslednjem vrstnem redu: e2/e2 < e2/e3 < e2/e4 < e3/e3 < e3/e4 < e4/e4. Naraščanje omenjenih koncentracij je bilo opazno pri obeh spolih, močneje pa je bilo izraženo pri moškem spolu. Povišane koncentracije celokupnega in LDL holesterola v plazmi so zasledili že pri triletnih otrocih. Plazemske koncentracije HDL holesterola in trigliceridov pa se med različnimi genotipi *ApoE* niso statistično značilno razlikovale (Lehtimäki s sod., 1990).

Tudi raziskava na zdravih prebivalcih Irske je pokazala, da imajo nosilci alela e2 najnižje koncentracije celokupnega holesterola v plazmi, nosilci e4 alela najvišje, vmesne koncentracijske vrednosti pa pripadajo nosilcem alela e3. Rezultati te študije so še pokazali, da imajo osebe z alelom e4 statistično značilno višje vrednosti LDL holesterola v

primerjavi z osebami, ki tega alela niso imele. Razlike v vrednostih HDL holesterola se med različnimi genotipi *ApoE* niso statistično značilno razlikovale. Osebe z alelom e4 naj bi tako imele večjo verjetnost za razvoj srčno-žilnih bolezni v življenju (Sheehan s sod., 2000).

V podobni raziskavi, izpeljani na srbski populaciji, se je statistično značilen odnos med genotipi *ApoE* v plazemskih koncentracijah celokupnega in LDL holesterola pokazal le pri moškem spolu. Alel e2 je bil pri moških povezan z nižjimi plazemskimi koncentracijami celokupnega in LDL holesterola, alel e4 pa je bil povezan z višjimi plazemskimi koncentracijami celokupnega in LDL holesterola. Pri ženskah, ki so bile zastopane v manjšem številu, se različni genotipi *ApoE* niso statistično značilno razlikovali v koncentracijah lipidov v plazmi (Stankovic s sod., 2000).

Prav tako se je statistično značilen odnos med tremi najpogosteje zastopanimi genotipi *ApoE* (e3/e2, e3/e3, e3/e4) v plazemskih koncentracijah celokupnega in LDL holesterola pokazal pri zdravih Američankah španskega porekla ter pri ameriških belcih nešpanskega porekla, tako ženskah kot moških, ne pa pri Američanih španskega porekla. Plazemske koncentracije celokupnega in LDL holesterola so bile najnižje pri osebah z genotipom e3/e2, srednje pri osebah z genotipom e3/e3 in najvišje pri osebah z genotipom e3/e4. V tej raziskavi so imeli nosilci alela e2 nižje, nosilci alela e4 pa višje koncentracije celokupnega in LDL holesterola v primerjavi z nosilci alela e3. Genotip *ApoE* je v tej raziskavi pojasnil le 5,6 % in 7,6 % fenotipske variance v koncentracijah celokupnega in LDL holesterola pri Američankah španskega porekla, pri ameriških belcih ta delež znaša 10,2 %, pri ameriških belcih pa 6,2 % in 7,5 %. Statistično značilnih razlik med tremi genotipi *ApoE* (e3/e2, e3/e3, e3/e4) v koncentracijah celokupnega in LDL holesterola med sladkornimi bolniki niso opazili, niti med Američani španskega porekla niti med belskimi Američani nešpanskega porekla. Zanimivo pa je, da se je statistično značilna razlika v koncentracijah celokupnega holesterola med genotipi *ApoE* vendarle pokazala, in sicer v skupini španskih sladkornih bolnikov obeh spolov, ki imajo glikoziliran hemoglobin višji od 10,5 mg/dl. Osebe z genotipom e2/e3 so imele najnižje, osebe z genotipom e3/e3 srednje in osebe z genotipom e3/e4 najvišje koncentracije celokupnega holesterola v plazmi. Prav tako se je statistično značilen odnos pokazal med koncentracijo HDL holesterola v plazmi v skupini

nešpanskih belcev moškega spola, in sicer so imeli nosilci genotipa e3/e4 statistično značilno nižje koncentracije HDL holesterola v plazmi v primerjavi z nosilci genotipa e3/e2 in e3/e3. Pri ameriških Špancih, sladkornih bolnikih, pa so imeli nosilci genotipa e3/e4 statistično značilno višje koncentracije trigliceridov kot nosilci ostalih dveh genotipov (Kamboh s sod., 1995).

V raziskavi skupine žensk, mlajših od 65 let, zdravih ali pa v zgodnji fazi koronarne arterijske bolezni, so ugotovili, da imajo ženske z genotipom *ApoE* e2/e3 statistično značilno višje koncentracije trigliceridov v plazmi kot ženske z genotipom *ApoE* e3/e3. Koncentracije ostalih plazemskih lipidov (celokupnega holesterola, LDL holesterola, HDL holesterola) se med nosilkami različnih genotipov *ApoE* niso statistično značilno razlikovale. Prav tako prisotnost alela e4 pri preiskovankah ni bila povezana z višjimi plazemskimi koncentracijami celokupnega in LDL holesterola (Letonja s sod., 2004).

Ugotovili so, da polimorfizem gena *ApoE* in polimorfizem gena za lipoproteinsko lipazo (417C→G) sovplivata na koncentracijo plazemskih trigliceridov, ki so statistično značilno višji ob prisotnosti alela e4 in *LPL417C*. S tema polimorfizmoma so lahko pojasnili 42,3 % variacij v koncentracijah plazemskih trigliceridov pri ženskah in 53,3 % variacij v koncentracijah plazemskih trigliceridov pri moških (Salah s sod., 1997).

Študija, opravljena na zdravih korejskih moških, je razkrila, da so pri moških z genotipom e2/e3 plazemske koncentracije trigliceridov statistično značilno višje, pri moških z genotipom e3/e4 pa statistično značilno nižje v primerjavi z moškimi, ki nosijo genotip e3/e3 (Chun s sod., 2001).

4.5. Vpliv genotipa *ApoE* na nekatere bolezni

• genotip *ApoE* in motnje presnove holesterola

Večina bolnikov s tipom III hiperlipoproteinemije, ki imajo povišane koncentracije VLDL holesterola in trigliceridov, je homozigotov za alel e2 (Hixson in Vernier, 1990).

• genotip *ApoE* in srčno-žilne bolezni

Na splošno velja, da alel e4 povišuje tveganje za srčno-žilne bolezni. Alel e4 naj bi določal obliko delcev LDL, in sicer zmanjšuje velikosti velikih delcev LDL ter povečuje velikost in plazemsko koncentracijo majhnih delcev LDL. Velikost LDL delcev pa je dejavnik, ki vpliva na razvoj koronarno-srčnih bolezni (Skoglund-Andersson s sod., 2003). V Evropi najdemo višjo frekvenco alela e4 na severu, kjer so srčno-žilne bolezni pogostejše, nižjo frekvenco pa na jugu, kjer je pogostost teh bolezni manjša. Pri tem dejstvu gre najbrž za vpliv, ki ga ima genotip *ApoE* na koncentracije lipidov v plazmi, predvsem pa za vpliv prehrane. Epidemiološke študije so pokazale, da obstaja povezava med pogostostjo alela e4 v populacijah in obolenjem za srčno-žilnimi boleznimi. Ugotovili so, da je alel e4 dejavnik tveganja za koronarno aterosklerozo pri moških v srednjih letih, ne pa tudi pri starejših moških, kar lahko pomeni, da z naraščajočo starostjo prihajajo do izraza drugi dejavniki tveganja za srčno-žilne bolezni. Frekvenca alela e4 je prav tako višja pri osebah z koronarno boleznijo in aterosklerozo (Siest s sod., 2000). Vloga alela e2 pri srčno-žilnih boleznih ni povsem znana. Nekateri avtorji predvidevajo, da naj bi imel alel e2 zaščitni učinek na razvoj koronarne ateroskleroze (Siest s sod., 2000).

Kljub verjetnemu vplivu polimorfizmov *ApoE* na koncentracije LDL holesterola in s tem posredno na razvoj koronarne arterijske bolezni v raziskavi Letonja s sodelavci ni ugotovili povezave med določenimi genotipi *ApoE* in večjo verjetnostjo za razvoj koronarno-arterijske bolezni pri ženskah, mlajših od 65 let. Zastopanost genotipov in alelov *ApoE* se med ženskami v zgodnji fazi koronarno arterijske bolezni in kontrolno zdravo skupino žensk ni statistično značilno razlikovala (Letonja s sod., 2004).

• genotip *ApoE* in Alzheimerjeva bolezen

Alel e4 se je v številnih študijah izkazal kot najpomembnejši genetski dejavnik, ki določa Alzheimerjevo bolezen. Zanimivo je, da je v Evropi Alzheimerjeva bolezen pogostejša na severu in redkejša na jugu, podobno kot najdemo višje frekvence alela e4 na severu, nižje pa na jugu Evrope. Možno je, da genotip *ApoE* vpliva na Alzheimerjevo bolezen posredno, prek učinka, ki ga ima na lipidni metabolizem (Siest s sod., 2000).

• **genotip *ApoE* in osteoporoza**

Ugotovili so, da so zlomi kosti pri nosilkah alelov e4 pogostejši, kar razlagajo z manjšim privzemom vitamina K v osteoblaste. Vitamin K se v plazmi prenaša v hilomikronih in prehaja v celice z endocitozo; ligand za celične receptorje je ApoE (Siest s sod., 2000).

• **genotip *ApoE* in sladkorna bolezen tipa II**

Ameriška raziskava, ki je vključevala potomce španskih priseljencev, sladkorne bolnike in kontrolno skupino, je pokazala, da imajo sladkorni bolniki statistično značilno višje frekvence alela e4 in statistično značilno nižje frekvence alela e3 glede na kontrolno skupino. Med ameriški belci, ki nimajo prednikov med španskimi priseljenci, pa med sladkornimi bolniki in kontrolno skupino zdravih oseb niso opazili statistično značilnih razlik med frekvencami genotipov in alelov *ApoE*. Vendar obstajajo tudi razlike v pogostosti genotipov in alelov med populacijama pri sladkornih bolnikih: ameriški Španci imajo statistično značilno nižje frekvence genotipov e3/e2 in e4/e2 in alela e2 v primerjavi s skupino belcev, ki nimajo španskih prednikov (Kamboh s sod., 1995).

4.6. Vpliv genotipa *ApoE* na farmakokinetiko nekaterih zdravil

Za zdravljenje hiperholesterolemije se največkrat uporabljajo statini, fibrati, za ženske v menopavzi pa hormoni. Študije zadnjih let nakazujejo, da polimorfizem *ApoE* lahko vpliva na odziv na ta zdravila, vendar so rezultati teh študij različni. Po vsej verjetnosti so v odgovor na zdravila proti hiperholesterolemiji vpleteni še polimorfizmi mnogih drugih proteinov. Zdi se, da ima nadomestna hormonska terapija pri ženskah v menopavzi najboljše učinke pri nosilkah alelov e2. Tem se dokazano najhitreje normalizirajo koncentracije holesterola, vendar se jim obenem nevarno dvignejo koncentracije plazemskih trigliceridov. Večina raziskav nakazuje smernice, da se osebe brez alelov e4 bolje odzivajo na zdravila, ki pomagajo pri Alzheimerjevi bolezni. Ta učinek je močnejši pri ženskah. Pred kratkim so poročali, da je zdravljenje Alzheimerjeve bolezni z estrogenskimi hormoni uspešno le v primeru, ko ženska ni nosilka enega ali dveh alelov e4 (Siest s sod., 2000).

4.7. Vpliv genotipa *ApoE* na zdravljenje z varfarinom

4.7.1 Varfarin

Varfarin je zdravilo, ki preprečuje aktivacijo od vitamina K odvisnih faktorjev strjevanja krvi. Zdravilo je namenjeno zdravljenju in preprečevanju zamašitve ven, srčnih in pljučnih arterij s krvnimi strdki ter preprečevanju nastajanja krvnih strdkov in zapletov zaradi zapor žil s strdki pri bolnikih z boleznimi srca, hibo zaklopke, umetno srčno zaklopko in nekaterimi motnjami srčnega ritma (Antolič s sod., 1999). Varfarin jemljejo bolniki z atrijsko fibrilacijo, umetnimi srčnimi zaklopkami, pljučnim embolizmom, globoko vensko trombozo, predpišejo pa ga tudi vsem osebam, ki so preživele infarkt (Kohnke s sod., 2005a). Je najpogosteje predpisan peroralni antikoagulant v Evropi in Severni Ameriki; na Švedskem naj bi ga uživalo kar 1 % celotne populacije (Kohnke s sod., 2005a). Predpisovanje varfarina po svetu zaradi naraščajočega števila srčno-žilnih bolezni še vedno narašča (Herman s sod., 2006). Zdravilo bolniki jemlje peroralno, ponavadi v enem odmerku na dan. Po krvi se varfarin prenaša vezan na albumine (Lee s sod., 2005).

Varfarin ima ozko terapevtsko širino in veliko interindividualno variabilnost v višini odmerka. Višine odmerkov pri pacientih se zato lahko razlikujejo tudi do dvajsetkrat. Pri določanju optimalnega odmerka posamezni osebi velikokrat nastajajo težave. Neprilagojen odmerek lahko vodi k resnim krvavitvam, če je odmerek previsok, ali pa k nezadostnemu preprečevanju nastajanja strdkov, če je odmerek prenizek (Kohnke s sod., 2005a). Zaradi ozke terapevtske širine in velikih interindividualnih razlik glede odmerka varfarina je bilo opravljenih mnogo raziskav, ki so skušale ovrednotiti vpliv posameznih dejavnikov na odmerek in s tem omogočiti varnejšo in učinkovitejšo uporabo zdravila v terapevtske namene. V raziskavah se vse bolj uveljavlja farmakogenetika, ki ugotavlja vpliv genetskih dejavnikov na delovanje zdravila. Pričakujejo, da bodo izsledki farmakogenetike pomagali zmanjšati tveganja za krvavitev, zgodaj identificirati osebe z visokim tveganjem, skrajšati uvajalni čas zdravila ter natančno oceniti odmerek že v začetku terapije in s tem pripomogli k učinkovitejšemu in bolj individualiziranemu zdravljenju z varfarinom (Voora s sod., 2005).

Znano je, da na višino odmerka varfarina vplivajo številni negenetski in genetski dejavniki, vendar nam variabilnosti vsi doslej znani dejavniki ne pojasnijo popolnoma. Med najpomembnejšimi negenetskimi dejavniki, ki vplivajo na višino odmerka varfarina so starost, indeks telesne mase, prehrana in razvade, indikacije za zdravljenje, spremljajoče bolezni ter sočasno zdravljenje nekaterih bolezni z zdravili, ki pospešujejo metabolizem varfarina. Od genetskih dejavnikov pa so pomembni zlasti tisti polimorfizmi, ki vplivajo na farmakokinetiko (absorbcijo, porazdelitev, presnovo in izločanje) in farmakodinamiko zdravila (Wadelius s sod., 2006).

Obstajajo dozirni algoritmi, ki skušajo določiti najprimernejši odmerek za posameznika, vendar algoritmi ne upoštevajo genetskih dejavnikov in največkrat niso učinkoviti (Voora s sod., 2005). Ocenjujejo, da na leto krvavitve prizadenejo 10 do 17 pacientov od stotih, ki se zdravijo z varfarinom, tveganje za resne krvavitve pa se giblje med 2 % do 5 % letno (Kohnke s sod., 2005a) oziroma se letno na sto bolnikov primerita dve večji krvavitvi in osem manjših (Voora s sod., 2005). Znaki prevelikega odmerjanja so podkožne krvavitve, krvavitve v očesno veznico, krvavitve v sklepe, krvav izpljunek, bruhanje krvi, črno blato, rdeče obarvan seč ali pa notranje krvavitve (Antolič s sod., 1999). Odmerki se zato vedno prilagajajo vrednostim ustreznih laboratorijskih preiskav. Zlasti na začetku zdravljenja - v obdobju ugotavljanja najprimernejšega odmerka - so potrebne redne zdravniške kontrole in laboratorijske kontrole strjevanja krvi. Vrednost, ki pove, kako hitro se kri strjuje, je protrombinski čas, ki je določen z mednarodno umerjenim razmerjem (INR) in se ga določi glede na razmerje med koagulacijskim časom pri posamezni osebi in standardnim koagulacijskim časom. Optimalni protrombinski čas zajema ozek interval in je prilagojen posamezniku glede na indikacijo za zdravljenje, in glede na zdravila, ki jih jemlje sočasno z antikoagulantami. Ciljni INR je med 2,0 in 3,0; pri bolnikih z umetnimi srčnimi zaklopkami pa med 2,5 in 3,5 (Lee s sod., 2005). Če so vrednosti INR več kot 4,5, tveganje za krvavitev močno naraste (Visser s sod., 2005). Krvavenje ob jemanju varfarina pa ni vedno povezano s prevelikimi odmerki. Vzroki za krvavitve so lahko kronične bolezni ledvic, maligne tvorbe, alkoholizem, kap, fizično ali nevrološko nazadovanje ... (Voora s sod., 2005).

4.7.1.1. Farmakokinetika varfarina

Varfarin je racematna mešanica dveh izomer, (S)-varfarina in (R)-varfarina v razmerju 1:1 (Herman s sod., 2006). Obe enantiomeri varfarina se v jetrih inaktivirata s citokromi P450. Vendar ju hidroksilirajo različni encimi, različna pa so tudi mesta, ki se hidroksilirajo (Herman s sod., 2005). Razpolovni čas (S)-varfarina je 32 ur, (R)-varfarina pa 43 ur (Voora s sod., 2005).

(S)-varfarin skoraj v celoti metabolizira encim CYP2C9. Nastaneta dva neaktivna metabolita, 6-hidroksi in 7-hidroksi varfarin, njuno približno razmerje je 1 : 3 (Voora s sod., 2005). (R)-varfarin se metabolizira z encimi CYP1A1, CYP1A2 in CYP3A4. Nastanejo neaktivni metaboliti, na primer 6-hidroksi, 8-hidroksi in 10-hidroksi varfarin, ki se izločijo z urinom (Voora s sod., 2005). Pri metaboliziranju (R)-varfarina lahko sodelujejo tudi encimi CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19 in CYP3A5 (Kohnke s sod., 2005a).

Znano je, da na presnovo (S)-varfarina pomembno vplivajo naslednji dejavniki: prisotnost enega ali dveh alelov *CYP2C9*2*, prisotnost enega ali dveh alelov *CYP2C9*3*, uživanje zdravil, ki pospešujejo metabolizem varfarina, uživanje zdravil, ki zavirajo metabolizem varfarina, ter indeks telesne mase. Teh pet dejavnikov lahko razloži 42 % variabilnosti v hitrosti presnove varfarina. Isti dejavniki skupaj s starostjo lahko razložijo 37 % interindividualne variabilnosti v višini dnevnega odmerka varfarina (Herman s sod., 2005).

4.7.1.2. Farmakodinamika varfarina

Glavni organ, na katerega varfarin deluje, so jetra (Kohnke s sod., 2005a).

Varfarin inhibira podenoto 1 encima VKOR (VKORC1). To je multikomponenten lipidno-proteinski encimski sistem v endoplazemskem retikulumu. Varfarin z inhibicijo VKORC1 prepreči nastajanje reduciranega vitamina K iz oksidirane oblike, reduciran vitamin K pa je nujno potreben kofaktor encima gama glutamil karboksilaze (GGCX), ki karboksilira glutaminsko kislino na faktorjih strjevanja krvi FII, FVII, FIX, FX in antikoagulacijskih

proteinih C, S in Z. S posttranslacijsko karboksilacijo se prej navedeni proteini pretvorijo v aktivno obliko, ki je potrebna za udeležbo v nadaljnjih procesih strjevanja krvi. Neaktivni faktorji pri strjevanju krvi ne morejo sodelovati (Voora s sod., 2005).

(S)-varfarin 3 do 5-krat učinkoviteje inhibira encim VKORC1 kot (R)-varfarin, zato lahko (S)-varfarinu pripišemo 70 % antikoagulacijskega učinka (Herman s sod., 2006).

Veliko študij je v zadnjem času pokazalo, da na farmakodinamiko vafarina močno vplivajo polimorfizmi genov *VKORC1* in *GGCX* (Scordo s sod., 2002, D'Andrea s sod., 2005, Herman s sod., 2006).

4.7.2. Vpliv genotipa *ApoE* na privzem vitamina K1 v jetra

Vitamin K je v maščobah topen vitamin. Glavna oblika vitamina K je vitamin K1, filokinon, ki se absorbira iz tankega črevesa skupaj z maščobami iz hrane (Kohnke s sod., 2005a). Vitamin K1 je nujno potreben pri karboksilaciji faktorjev FII, FVII, FIX, FX ter ostalih proteinov, ki vežejo kalcij in sodelujejo v kaskadi strjevanja krvi (Visser s sod., 2005).

Vitamin K1 prehaja v jetrne celice iz plazme s pomočjo hilomokronov; kot ligand za lipoproteinske celične receptorje služi ApoE, ki gradi hilomikrone (Kohnke s sod., 2005a). Visok privzem vitamina K1 v jetrne celice lahko zavira antikoagulacijski odgovor na varfarin. Hitrost receptorskega privzema vitamina K1 v celice naj bi bila odvisna od alelov *ApoE*, in sicer naj bi naraščala v vrstnem redu $e2 < e3 < e4$ (Wadelius s sod., 2007).

Čeprav bi visok vnos vitamina K v jetrne celice lahko zaviral antikoagulacijski učinek varfarina, pa raziskava Sconcejeve ni privedla do sklepov o statistično značilni povezanosti genotipov *ApoE* s koncentracijo vitamina K v plazmi. Zdi se, da je glavni dejavnik, ki določa plazemske koncentracije vitamina K, količina zaužitega vitamina K s prehrano. Ker pa se vitamin K v celicah neprestano reciklira, se zelo redko zgodi, da bi ga v celicah primanjkovalo (Sconce s sod., 2006).

4.7.3. Vpliv genotipa *ApoE* na odmerek varfarina

Raziskave vpliva polimorfizma *ApoE* na odmerek varfarina so prinesle nasprotujoče si rezultate.

Kohnke je preučeval vplive genetskih in demografskih dejavnikov na odmerke varfarina pri švedskih bolnikih in prišel do ugotovitev, da ima na odmerek zdravila statistično značilen vpliv tudi genotip *ApoE*. Dokazal je, da imajo homozigoti za alel e4 v skupini bolnikov z genotipom *CYP2C9*1/1* statistično značilno višje vzdrževalne odmerke varfarina glede na ostale genotipe. V tej raziskavi je genotip *ApoE* razložil 6 % variacij v odmerku varfarina pri bolnikih z genotipom *CYP2C9*1/1* (Kohnke s sod., 2005a).

Podobno študijo je Kohnke kasneje izvedel na populaciji 145 italijanskih bolnikov, za katere je znano, da imajo eno najnižjih frekvenc alela e4 na svetu, manj kot 10 %. Med bolniki ni bilo homozigotov za alel e4. Rezultati kljub razdelitvi bolnikov glede na genotip *CYP2C9* niso pokazali statistično značilne povezanosti med genotipi *ApoE* in višino odmerka varfarina (Kohnke s sod., 2005b).

Raziskava na britanskih bolnikih je dala drugačne rezultate. Osebe, ki so bile nosilke genotipa e3/e4, so za doseg terapevtskega antikoagulacijskega učinka potrebovale statistično značilno nižje odmerke varfarina v primerjavi z osebami z genotipom e3/3. Osebe z genotipom e4/e4 in e2/e2 pa glede na osebe z genotipom e3/e3 niso imele statistično značilnih razlik v odmerkih varfarina. Multipla logistična regresija je pokazala, da je vpliv alela e4 na višino odmerka varfarina majhen in znaša le 2 % (Sconce s sod., 2006).

Obsežna raziskava, ki je bila narejena na nizozemskih bolnikih, zdravljenih z acenokumarolom, kumarinskim antikoagulantom, pa je razkrila, da potrebujejo osebe z genotipom e3/e4 in e4/e4 statistično značilno nižje odmerke tega zdravila kot osebe z genotipom e3/e3. Homozigoti za alel e2 pa so potrebovali statistično značilno višje odmerke zdravila od oseb z genotipom e3/3. Po sočasni analizi genotipov *CYP2C9* in *ApoE* se je pokazalo, da najvišji odmerek potrebujejo osebe s haplotipom *CYP2C9*1/1* in

brez alelov e4, najnižji odmerek pa osebe s polimorfnimi aleli *CYP2C9* in z vsaj enim alelom e4. Analiza haplotipov je pokazala, da se učinki polimorfizmov pri določanju odmerka acenokumarola v tem primeru seštevajo (Visser s sod., 2005).

5. MATERIAL IN METODE

5.1. Preiskovanci

V raziskavo je bilo vključenih 200 bolnikov iz Slovenije, ki so jemali varfarin najmanj šest mesecev, na zadnjih dveh kontrolnih pregledih pred odvzajem krvi pa so imeli stabilne vrednosti INR. Te so za bolnike z umetnimi srčnimi zaklopkami med 2,5 in 3,5, za vse ostale indikacije pa med 2,0 in 3,0. Bolniki z rakom ter bolniki z ledvičnimi in jetrnimi boleznimi niso bili vključeni v raziskavo. Preiskovanci so bili predhodno genotipizirani za polimorfizme genov *CYP2C9*, *VKORC1* in *GGCX*. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije; bolniki so svoje sodelovanje v raziskavi potrdili pisno (Herman s sod., 2006).

Podatki o preiskovanih osebah so bili pridobljeni iz medicinske dokumentacije. Podatek o spolu je bil dostopen za 197 oseb, med njimi je bilo 97 žensk (49,24 %) in 100 moških (50,76 %). Večina preiskovancev je bila starostnikov, saj je bila povprečna starost preiskovanih oseb 71,01 leta. Najmlajša oseba v raziskavi je bila stara 26 let, najstarejša pa 94 let, mediana starost pa je bila podobna povprečni (73 let). Preiskovanci so imeli povprečno vrednost indeksa telesne mase (ITM) 28,15, mediano vrednost pa 27,78. Najnižji ITM je bil 16,71, najvišji pa 57,36. Podatki o indikacijah so bili dostopni pri 195 preiskovancih. Največ oseb, kar 160 (82,05 %), je jemalo varfarin zaradi atrijske fibrilacije (kronične ali paroksizmalne). Petnajst oseb (7,69 %) ga je jemalo zaradi srčno-žilnih bolezni (npr. ateroskleroze), štirinajst oseb (7,18 %) zaradi venske tromboze, šest oseb (3,08 %) pa je imelo umetne srčne zaklopke. Povprečni čas jemanja varfarina je pri bolnikih znašal 3,58 leta. Osebe so jemale varfarin v razponu enega do petnajstih let, mediana vrednost trajanja jemanja je bila dve leti. 81 bolnikov je poleg varfarina uživalo še zdravila, ki vplivajo na presnovo varfarina, 111 bolnikov pa takih zdravil ni jemalo (Herman s sod., 2005).

5.2. Odvzem krvi

Odvzem krvi za genotipizacijo je bil opravljen v Dispanzerju za trombične bolezni na ljubljanski Polikliniki. Preiskovancem so iz komolčne vene odvzeli 16 ml krvi v epruvete, ki so vsebovale antikoagulant natrijev citrat.

5.3. Izolacija DNA

DNA je bila izolirana na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani po metodi izsoljevanja iz jeder levkocitov (Miller s sod., 1988). Koncentracija DNA v izoliranih vzorcih je bila izračunana iz absorbance pri 260 nm. Pri tem smo upoštevali podatek, da je pri absorbanci 1 koncentracija DNA v raztopini 50 µg/ml.

5.4. Meritve koncentracij ApoE in lipidov v plazmi

Meritve koncentracij ApoE in lipidov iz plazme preiskovancev so bile izvedene na Kliniki za žilne bolezni Kliničnega centra v Ljubljani.

5.5. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

5.5.1. Princip

Pri tej metodi gre za časovno hitro pomnoževanje DNA v laboratoriju, s katero lahko iz enega fragmenta DNA, ki služi za matrico, dobimo veliko število njegovih kopij. Na začetku reakcije temperaturo povišamo do vrednosti, pri kateri dvojna vijačnica denaturira. Temperaturo nato znižamo, da se na razklenjeno DNA vežeta dva začetna oligonukleotida, komplementarna delom zaporedja, kjer hočemo začeti pomnoževanje. Sledi stopnja, ko se temperatura dvigne do temperaturnega optimuma za delovanje termostabilne DNA-polimeraze (okrog 72°C). Takrat začne DNA-polimeraza dodajati nove nukleotide in nastajajo novi fragmenti DNA. Nato temperaturo ponovno zvišamo in postopek ponavljamo, dokler ne dobimo želene količine pomnožene DNA.

Pomembno je, da so pogoji (temperatura, trajanje) ter reagenti za vsako stopnjo reakcije PCR natančno določeni in specifični.

5.5.2. Reagenti

Mešanica za PCR gena *ApoE* je vsebovala naslednje reagente:

- sterilno destilirano vodo,
- pufer za PCR (Applied Biosystems),
- dva začetna oligonukleotida (začetni oligonukleotid F, začetni oligonukleotid R, 10 mM, Sigma - Proligo), katerih nukleotidni zaporedji sta prikazani v tabeli 3,
- MgCl₂ (25 mM),
- zmes vseh štirih dNTP-jev (vsak 2,5 mM, Applied Biosystems),
- termostabilno DNA-polimerazo - AmpliTaq Gold (Applied Biosystems),
- DMSO,
- genomsko DNA (100 ng/μl).

Tabela 3: Zaporedja začetnih oligonukleotidov ApoE F in ApoE R.

začetni oligonukleotid	nukleotidno zaporedje
ApoE F	5' - GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGC - 3'
ApoE R	5' - GGCCTCGCGGATGGCGCTGAG - 3'

5.5.3. Postopek

Z reakcijo PCR smo pomnoževali del 4. eksona gena *ApoE*. Reakcijska mešanica za PCR, ki smo jo pripravili, je vsebovala 10,3 μl sterilne destilirane vode, 2 μl pufera za PCR, 2 μl DMSO, 1,6 μl zmesi, ki je vsebovala vse štiri dNTP-je, 1,2 μl MgCl₂, 0,4 μl začetnega oligonukleotida F, 0,4 μl začetnega oligonukleotida R, 0,1 μl termostabilne polimeraze AmpliTaq Gold in 2 μl genomske DNA. Končni volumen mešanice je bil 20 μl. Za negativno kontrolo v mešanico PCR nismo dodali genomske DNA, vsi ostali reagenti pa so bili zastopani v enakih količinah, kot so navedene zgoraj. Pomnoževanje vzorcev je potekalo v aparatu PCR Gene Amp 9600, Perkin Elmer. Začetno segrevanje je potekalo 10

minut pri 94°C. Sledilo je 35 ciklov s 30 sekund dolgo denaturacijo pri 94°C, 40 sekund dolgo vezavo začetnih oligonukleotidov pri 65°C in 40 sekund dolgim dodajanjem nukleotidov pri 72°C. Končno podaljševanje nastalih fragmentov je trajalo 10 minut pri 72°C.

5.6. Preverjanje produktov reakcije PCR z elektroforezo na agaroznem gelu

5.6.1. Princip

Z elektroforezo na agaroznem gelu lahko ločujemo produkte reakcije PCR, velike med 100 in 50 000 baznih parov. Agarozo raztopimo v pufru TBE in glede na količino agaroze in pufra pripravljamo različno koncentrirane gele. Za detekcijo molekul DNA agaroznemu gelu dodamo etidijev bromid, ki se vgradi v molekule DNA in pod UV svetlobo fluorescira. Na agarozni gel nato naneseimo produkte reakcije PCR, negativno kontrolo in dolžinski standard. Na hitrost potovanja fragmentov DNA na gelu vplivajo: velikost, oblika in naboj fragmentov DNA, lastnosti nosilca, napetost električnega polja, interkalirajoča barvila ...

5.6.2. Reagenti

Uporabili smo:

- agarozo (Sigma),
- pufer 1 x TBE (0,098 M Tris-HCl, 0,089 M borova kislina, 0,002 M EDTA),
- etidijev bromid (10 mg/mL),
- barvilo za nanos (0,12 % ksilencianol, 0,1 % bromfenol modro, 50 % glicerol),
- dolžinski standard LMW New England BioLabs (velikost fragmentov: 25 bp, 50 bp, 75 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 350 bp, 500 bp, 766 bp).

5.6.3. Postopek

Za pripravo dveodstotnega agaroznega gela smo v erlenmajerici zatehtali 2 g agaroze in dolili 100 ml pufru 1 x TBE. Agarozo smo raztopili s segrevanjem. Raztopini smo nato dodali etidijev bromid in jo razlili v plastični nosilec. Po približno 40 minutah smo strjen gel na nosilcu prenesli v kadičko za elektroforezo, napolnjeno z 1 x TBE pufrom. V žepke na gelu smo nanegli po 5 μ l produktov reakcije PCR, ki smo jim dodali 2 μ l barvila za nanos. Na gel smo nanegli tudi negativno kontrolo in dolžinski standard, ki je vseboval fragmente DNA znanih dolžin. Elektroforeza je tekla približno 20 minut pri napetosti 120 V. Gel smo nato pogledali pod UV svetlobo in fotografirali. Če se je del gena *ApoE* uspešno pomnožil, je bil viden pod UV svetlobo kot lisa velikosti okrog 250 bp. Negativna kontrola ni smela vsebovati pomnoženih fragmentov.

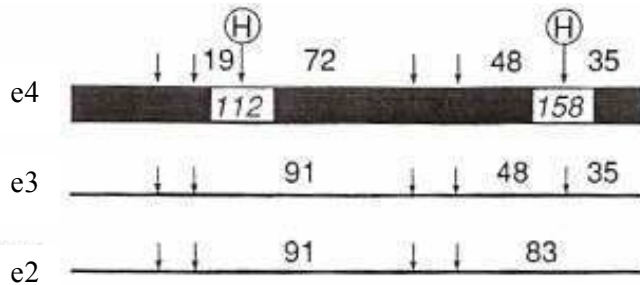
5.7. Cepljenje pomnoženih produktov z encimom *HhaI*

5.7.1. Princip

Restriksijski encimi cepijo verigo DNA. Cepijo jo specifično v ali ob svojem prepoznavnem zaporedju. Cepitvena mesta teh encimov so največkrat dolga od 4 do 6 baznih parov in so povečini palindromska. Za uspešno restrikcijo so potrebni optimalni pogoji za delovanje restriksijskih encimov. Hitrost cepitve je odvisna od koncentracije encima, koncentracije DNA in njene konformacije. Glede na te tri dejavnike se določi tudi čas trajanja reakcije. Temperatura, pri kateri poteka cepitev, je odvisna od temperaturnega optimuma restriksijskega encima. Za določanje genetskih polimorfizmov izberemo restriksijski encim, kjer so genetski polimorfizmi v tarčnih mestih izbranega restriksijskega encima.

Polimorfizmi gena *ApoE* ležijo v cepitvenih mestih restriksijske endonukleaze *HhaI*. Cepitveno mesto (*) encima *HhaI* je 5'...GCG*C...3' (Hixson in Vernier, 1990). Encim *HhaI* največkrat cepi fragment alela e4, in sicer šestkrat. Na fragmentu alela e3 je eno cepitveno mesto za *HhaI* izničeno, zato encim reže petkrat, v alelu e2 pa se izničita dve cepitveni mesti za encim *HhaI*, kar privede do rezanja na štirih delih fragmenta. Posledica

različnih cepitvenih mest za encim *HhaI* pri alelih *ApoE* je nastanek različnega števila različno velikih fragmentov kot kaže slika 1.



Slika 1: Shematski prikaz cepitvenih mest za encim *HhaI* na alelih *ApoE*.

Legenda:

H - encim *HhaI*

19, 35, 48, 72, 83, 91 - velikost fragmentov v bp po cepitvi z encimom *HhaI*

112, 158 - mesta na *ApoE*, ki se med izoformami *ApoE* razlikujejo

puščice - cepitvena mesta encima *HhaI*

5.7.2. Reagenti

- restrikcijska endonukleaza *HhaI* (New England BioLabs)

5.7.3. Postopek

Uspešno pomnoženim vzorcem DNA iz reakcije PCR smo dodali 0,3 μ l restrikcijske endonukleaze *HhaI*. Vzorce z encimom *HhaI* smo inkubirali prek noči v vodni kopeli na 37°C.

5.8. Ločevanje cepljenih produktov z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu

5.8.1. Princip

Poliakrilamidni gel ima veliko ločljivost in se uporablja za ločevanje fragmentov DNA velikosti od 5 do 500 bp. Poliakrilamid, sestavina poliakrilamidnega gela, nastane iz akrilamida, ki se polimerizira s prostimi radikali. Tako nastanejo linearne verige. Vir

prostih radikalov je običajno APS, stabilizira pa jih TEMED. Z metilenbisakrilamidom se doseže prečna povezanost verig in s tem tvorba gela.

5.8.2. Reagenti

Uporabili smo:

- akrilamid (30 : 1),
- destilirano vodo,
- pufer 10 x TBE ,
- 10 % APS,
- TEMED,
- barvilo za nanos (0,12 % ksilencianol, 0,1 % bromfenol modro, 50 % glicerol),
- etidijev bromid (10 mg/ml),
- pufer 1 x TBE,
- dolžinski standard LMW New England BioLabs (25 bp, 50 bp, 75 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 350 bp, 500 bp, 766 bp,).

5.8.3. Postopek

Za pripravo 15-odstotnega poliakrilamidnega gela smo v digestoriju zmešali: 10 ml akrilamida (30:1), 8 ml H₂O, 2 ml pufru 10 x TBE, 140 µl 10 % APS in 20 µl TEMEDA. Gel smo s pipeto vlili med plošči sestavljenega nosilca in počakali približno 45 minut, da se je strdil. Plošči z gelom smo prenesli v posodo za poliakrilamidno elektroforezo, napolnjeno s pufrom 1 x TBE. Pred nanosom na poliakrilamidni gel smo pomnoženim produktom, cepljenim z encimom *HhaI*, dodali 5 µl barvila ter nato v žepke nanесли 20 µl mešanice. Na gel smo nanесли še dolžinski standard in negativno kontrolo, ki jo je predstavljal vzorec pomnoženih produktov iz reakcije PCR brez dodanega encima *HhaI*. Elektroforeza je tekla približno dve uri in pol pri 100 V. Nato smo elektroforezo ustavili, gel pa pobarvali v 100 mL pufru 1 x TBE s 50 µl raztopine etidijevega bromida. Po 20 minutah, ko se je gel pobarval, smo si ga ogledali pod UV svetlobo in slikali.

5.9. Določanje genotipov *ApoE*

Glede na velikost in število fragmentov, nastalih po cepitvi pomnoženih produktov z encimom *HhaI*, smo po elektroforezi na poliakrilamidnem gelu določili genotip *ApoE*, kot je prikazano v tabeli 4 (Hixson in Vernier, 1990).

Tabela 4: Velikost fragmentov pri različnih genotipih *ApoE* po cepitvi z encimom *HhaI*.

genotip <i>ApoE</i>	velikost fragmentov po cepitvi v bp								
e2/e2	91 (2x)	83 (2x)			38 (2x)			18 (2x)	16 (2x)
e3/e3	91 (2x)			48 (2x)	38 (2x)	35 (2x)		18 (2x)	16 (2x)
e4/e4			72 (2x)	48 (2x)	38 (2x)	35 (2x)	19 (2x)	18 (2x)	16 (2x)
e2/e3	91 (1x)	83 (1x)		48 (1x)	38 (2x)	35 (1x)		18 (2x)	16 (2x)
e2/e4	91 (1x)	83 (1x)	72 (1x)	48 (1x)	38 (2x)	35 (1x)	19 (1x)	18 (2x)	16 (2x)
e3/e4	91 (1x)		72 (1x)	48 (2x)	38 (2x)	35 (2x)	19 (1x)	18 (2x)	16 (2x)

Legenda:

1 x – enojno število kopij fragmenta gena *ApoE*

2 x – dvojno število kopij fragmenta gena *ApoE*

5.10. Statistična analiza

5.10.1. Analiza variance

Varianco med genotipi *ApoE* v izbranih dejavnikih smo analizirali s testom ANOVA. To je test, ki primerja vrednosti varianc v izbranem dejavniku v več skupinah. Z analizo razlik v izbranem dejavniku smo ugotavljali, ali so razlike med genotipi *ApoE* statistično značilne. Izbrali smo si ničelno hipotezo, ki pravi, da so povprečne vrednosti dejavnikov, ki jih testiramo, med genotipi *ApoE* enake, kar smo trdili s 95-odstotno verjetnostjo. Če smo

dobili vrednost $p < 0,05$, smo ničelno hipotezo zavrnilo in zavzeli stališče, da so vrednosti, ki jih opazujemo, različne (statistično značilne), če pa je bila vrednost $p \geq 0,05$, smo sprejeli sklep, da sta opazovani vrednosti enaki (statistično neznačilni).

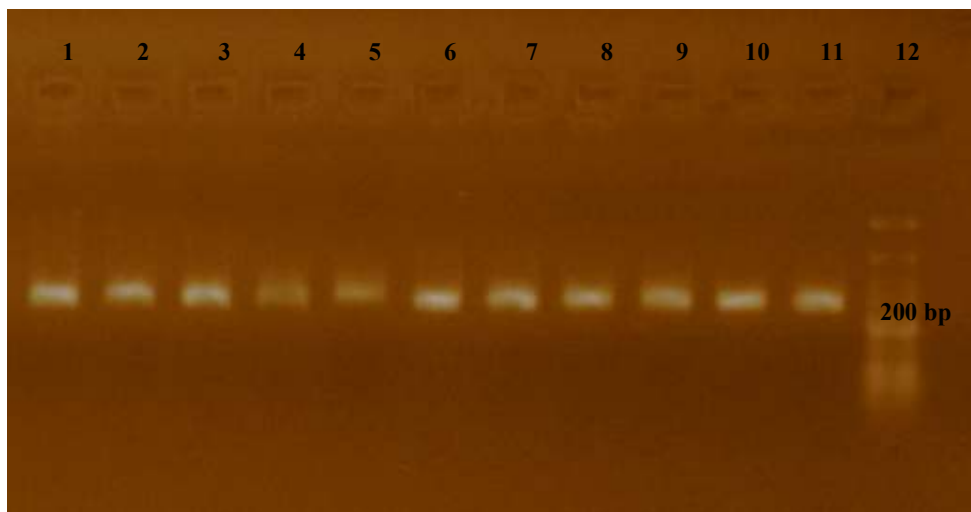
5.10.2. Linearna regresija

Je analizna metoda, kjer skušamo določiti krivuljo med spremenljivkami, ki se najbolj prilega podatkom o povezanosti spremenljivk na korelacijskem diagramu (Adamič, 1980). V model smo vnesli izbrane neodvisne spremenljivke in ugotavljali njihov celokupni vpliv na preučevan dejavnik. Tudi pri metodi linearne regresije smo izbrali 95-odstotni interval zaupanja.

6. REZULTATI

6.1. Določanje genotipov *ApoE*

Del gena *ApoE* smo pomnožili z reakcijo PCR in z elektroforezo na agaroznem gelu preverili uspešnost in specifičnost pomnoževanja. Na sliki 2 je prikazana fotografija agaroznega gela po končani elektroforezi. Svetle lise so uspešno pomnoženi deli gena *ApoE* dolžine 246 bp. Če so se vzorci neuspešno ali slabo pomnožili, smo postopek pomnoževanja z reakcijo PCR ponovili. Negativno kontrolo je predstavljala sterilna destilirana voda.



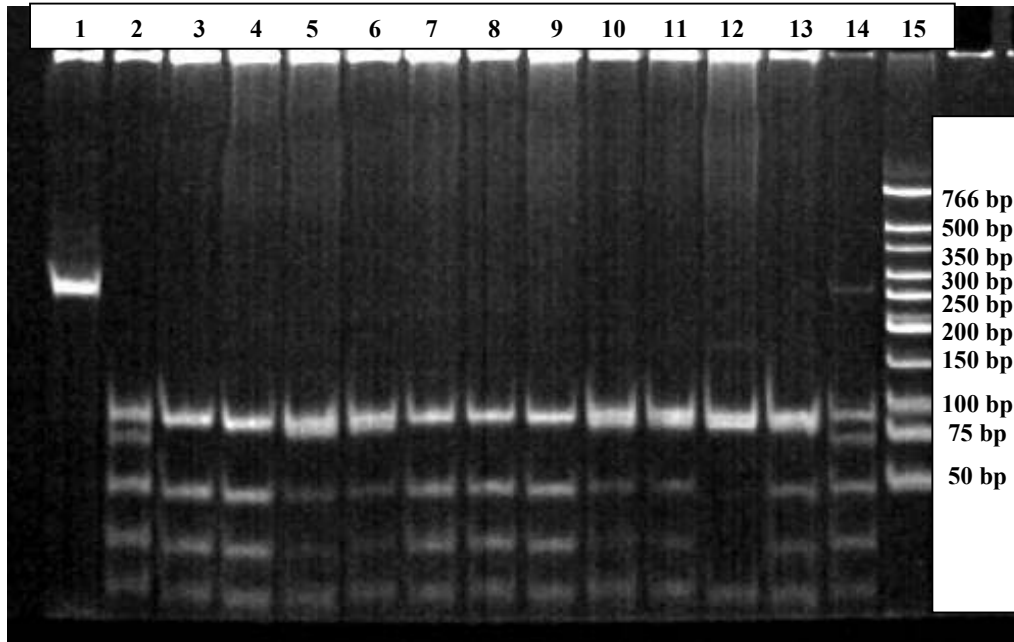
Slika 2: Preverjanje produktov reakcije PCR pomnoženega dela gena *ApoE* po elektroforezi na agaroznem gelu.

Legenda:

1 do 11 - pomnoženi produkti dolžine 246 bp dela gena *ApoE* v posameznih vzorcih

12 - dolžinski standard LMW (New England BioLabs): 766 bp, 500 bp, 350 bp, 300 bp, 250 bp, **200 bp**, 150 bp, 100 bp, 75 bp, 50 bp, 25 bp

Uspešno pomnožene dele gena *ApoE* smo izpostavili delovanju restriktivne endonukleaze *HhaI*. Ker polimorfizem gena *ApoE* spremeni cepitveno mesto za *HhaI*, dobimo pri alelu e2 pet različno velikih fragmentov, pri alelu e3 šest različno velikih fragmentov, pri alelu e4 pa sedem različno velikih fragmentov. Število in velikost cepljenih fragmentov smo preverili z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu, kot je prikazano na sliki 3.



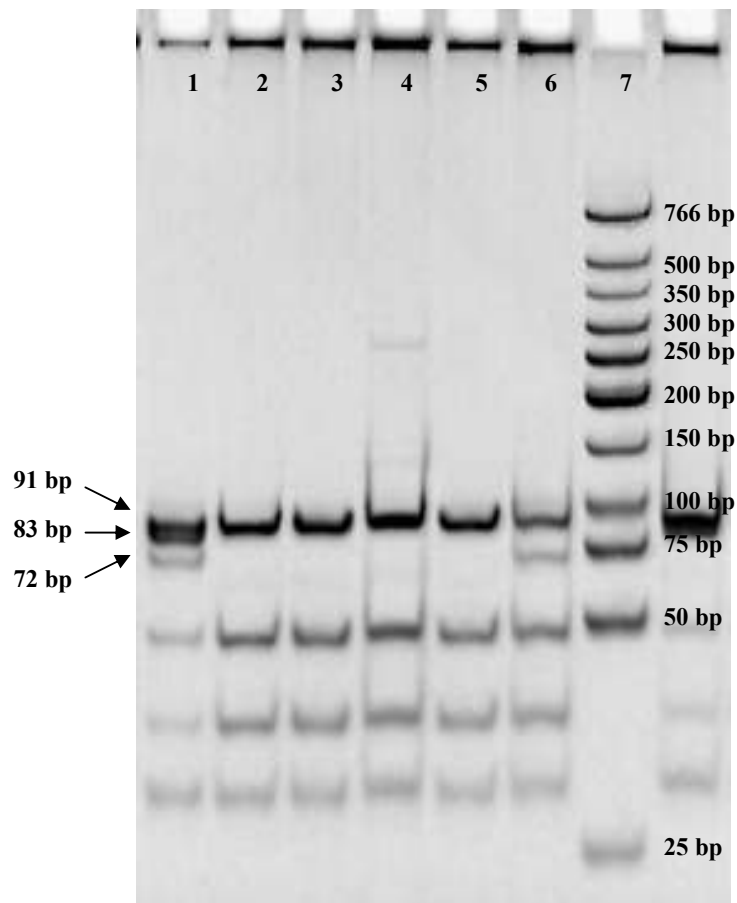
Slika 3: Analiza pomnoženih produktov dela gena *ApoE*, cepljenih z encimom *HhaI*, po elektroforezi na poliakrilamidnem gelu.

Elektroforeza je tekla 120 minut ob napetosti 100 V.

Legenda:

- 1 - necepljeni vzorec pomnoženih produktov iz reakcije PCR
- 2, 14 - genotip e3/e4
- 3, 4, 7, 8, 9 - genotip e3/e3
- 5, 6, 10, 11, 13 - genotip e2/e3
- 12 - genotip e2/e2
- 15 - dolžinski standard LMW (New England BioLabs)

Kot je razvidno iz slike 3, se po dveh urah elektroforeze fragmenta, velika 91 bp in 83 bp, še nista ločila, zato smo čas trajanja elektroforeze na poliakrilamidnem gelu podaljšali. Iz slike 4 je razvidno, da sta se po dveh urah in pol elektroforeze na poliakrilamidnem gelu fragmenta lepo ločila (vzorec 1).



Slika 4: Analiza pomnoženih produktov dela gena *ApoE*, cepljenih z encimom *HhaI*, po elektroforezi na poliakrilamidnem gelu.

Elektroforeza je tekla 150 minut ob napetosti 100 V.

Legenda:

1 - genotip e2/e4

2, 3, 4, 5 - genotip e3/e3

6 - genotip e3/e4

7 - dolžinski standard LMW (New England BioLabs)

6.2. Pogostost genotipov in alelov *ApoE*

V tabeli 5 je prikazana pogostost genotipov *ApoE* pri preiskovancih. Najpogostejši je bil genotip e3/e3, ki ga je imelo 68 % bolnikov. Precej manj pogosto sta bila zastopana genotipa e3/e4 (16,5 %) in e2/e3 (13 %). Genotipi, ki niso vsebovali alela e3, so bili še redkejši, in sicer je imel genotip e2/e4 frekvenco 2 % ter genotip e2/e2 frekvenco 0,5 %. Nihče med preiskovanci ni imel genotipa e4/e4.

Tabela 5: Pogostost genotipov *ApoE* v preiskovanem vzorcu.

genotip	število oseb	delež oseb
e2/e2	1	0,5 %
e2/e3	26	13 %
e2/e4	4	2 %
e3/e3	136	68 %
e3/e4	33	16,5 %
e4/e4	0	0 %

Iz pogostosti genotipov smo izračunali pogostost alelov *ApoE*. Kot je prikazano v tabeli 6, je bil v preiskovanem vzorcu najpogostejši alel e3 z deležem 82,75 %. Nižje frekvence v populaciji sta imela alela e4 (9,25 %) in e2 (8 %).

Tabela 6: Pogostost alelov *ApoE* v preiskovanem vzorcu.

alel	število alelov	delež alelov
e2	32	8 %
e3	331	82,75 %
e4	37	9,25 %

V tabeli 7 je prikazana pogostost genotipov *ApoE*, v tabeli 8 pa pogostost alelov *ApoE* v nekaterih evropskih populacijah (Sconce s sod., 2006, Lehtimäki s sod., 1990, Visser s sod., 2005, Kohnke s sod., 2005a, Kohnke s sod., 2005b, Sheehan s sod., 2000, Letonja s sod., 2004).

Tabela 7: Pogostost genotipov *ApoE* v različnih populacijah.

genotip <i>ApoE</i>	Velika Britanija n=246 VAR	Finska n=1577 ZDR	Nizozem- ska n=1637 KUM	Italija n=145 VAR	Slovenija n=147 CAD	Slovenija n=114 ZDR	*Slove- nija n=200 VAR
e2/e2	2 %	0,3 %	1,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,5 %
e2/e3	18 %	5,4 %	12,2 %	13,8 %	9,5 %	8,8 %	13 %
e2/e4	5 %	1,8 %	3,0 %	0,7 %	0,7 %	2,6 %	2 %
e3/e3	51 %	58,7 %	57,6 %	72,4 %	71,4 %	69,3 %	68 %
e3/e4	20 %	30,6 %	24,3 %	13,1 %	18,4 %	19,3 %	16,5 %
e4/e4	4 %	3,2 %	2,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %

Legenda:

n - število oseb

ZDR - v raziskavi so sodelovale zdrave osebe

KUM - v raziskavi so sodelovale osebe, ki jemljejo kumarinske antikoagulate, vendar ne varfarina

VAR - v raziskavi so sodelovale osebe, ki jemljejo varfarin

CAD - v raziskavi so sodelovale osebe v zgodnji fazi koronarno-arterijske bolezni

* - podatki iz diplomskega dela

Tabela 8: Pogostost alelov *ApoE* v različnih populacijah.

alel <i>ApoE</i>	Irška n=100 ZDR	Velika Britanija n=246 VAR	Švedska n=183 VAR	Finska n=1577 ZDR	Nizo- zemska n=1637 KUM	Italija n=145 VAR	*Slove- nija n=200 VAR
e2	12 %	13,8 %	6 %	3,9 %	8,6 %	7,2 %	8 %
e3	66 %	70,1 %	74,9 %	76,7 %	75,8 %	85,9 %	82,75 %
e4	22 %	16,1 %	19,1 %	19,4 %	15,6 %	6,9 %	9,25 %

Legenda:

n - število oseb

ZDR - v raziskavi so sodelovale zdrave osebe

KUM - v raziskavi so sodelovale osebe, ki jemljejo kumarinske antikoagulate, vendar ne varfarina

VAR - v raziskavi so sodelovale osebe, ki jemljejo varfarin

* - podatki iz diplomskega dela

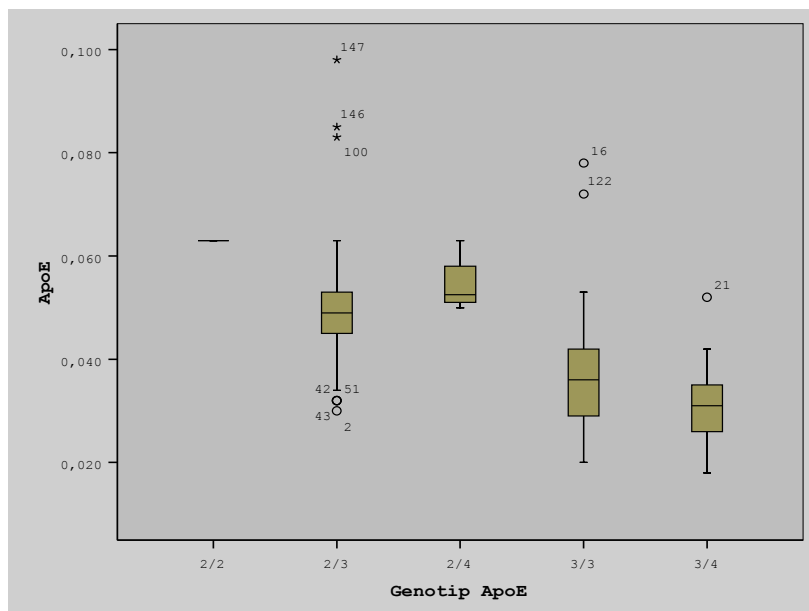
Tabela 8 potrjuje, da je najbolj razširjen alel *ApoE* v populacijah e3, vendar je pogostost vseh treh alelov med populacijami precej različna. Opazen je frekvenčni gradient alela e4 med severnimi in južnimi evropskimi državami.

6.3. Genotip *ApoE* in koncentracija ApoE v plazmi

Tabela 9 in slika 5 nam kažeta srednje vrednosti koncentracije ApoE v plazmi pri različnih genotipih *ApoE*.

Tabela 9: Koncentracija ApoE v plazmi glede na genotip *ApoE*.

genotip <i>ApoE</i>	število oseb (odstotek)	povprečna koncentracija ApoE ± standardna deviacija [g/L]	mediana koncentracija ApoE [g/L]	25. kvartil – 75. kvartil [g/L]
e2/e2	1 (0,61 %)	0,063 ± 0,000	0,063	0,063 - 0,063
e2/e3	25 (15,15 %)	0,051 ± 0,017	0,049	0,041 - 0,055
e2/e4	4 (2,42 %)	0,055 ± 0,006	0,053	0,051 - 0,061
e3/e3	111 (67,27 %)	0,036 ± 0,009	0,036	0,029 - 0,042
e3/e4	24 (14,55 %)	0,032 ± 0,007	0,031	0,026 - 0,035



Slika 5: Koncentracija ApoE v plazmi glede na genotip *ApoE*.

Legenda:

vodoravna črta - mediana

pravokotniki - koncentracije ApoE v rangu od 25. do 75. kvartila

krogci, zvezdice - osamelci

navpične črte - vse koncentracije razen osamelcev

S testom ANOVA smo ugotavljali odnos med genotipi *ApoE* in plazemskimi koncentracijami ApoE. Da smo dobili normalno porazdelitev, smo koncentracije ApoE transformirali z desetiškim logaritmom. Ker je imela le ena oseba genotip e2/e2, tega genotipa v testu nismo upoštevali. Rezultati so pokazali, da obstajajo statistično značilne razlike v plazemskih koncentracijah ApoE med petimi kombinacijami genotipov, in sicer med osebami z genotipom e2/e3 in e3/e3 ($p < 0,001$), med osebami z genotipom e2/e3 in e3/e4 ($p < 0,001$), med osebami z genotipom e2/e4 in e3/e3 ($p = 0,001$), med osebami z genotipom e2/e4 in e3/e4 ($p < 0,001$) ter med osebami z genotipom e3/e3 in e3/e4 ($p = 0,016$). Izkazalo se je, da imajo osebe z genotipom e2/e3 in e2/e4 statistično značilne višje koncentracije ApoE v plazmi v primerjavi z osebami, ki imajo genotip e3/e3 in e3/e4. Statistično značilna razlika v koncentracijah plazemskega ApoE se je pokazala tudi med osebami z genotipom e3/e3 in e3/e4, saj imajo osebe z genotipom e3/e4 statistično značilno nižje koncentracije ApoE v plazmi kot nosilci genotipa e3/e3.

Vpliv genotipov *ApoE* na koncentracijo ApoE v plazmi smo preverili tudi z metodo linearne regresije, pri čemer smo v statistični model vnesli tudi neodvisne spremenljivke, kot so spol, starost in indeks telesne mase bolnikov. Za referenčni genotip *ApoE* smo vzeli genotip e3/e3. Ugotovili smo, da imajo bolniki z genotipom e2/e3 ($p < 0,001$) in e2/e4 ($p < 0,001$) statistično značilno višje koncentracije ApoE v plazmi kot osebe z genotipom e3/e3, medtem ko imajo osebe z genotipom e3/e4 statistično značilno nižje koncentracije ApoE v plazmi kot osebe z genotipom e3/e3 ($p = 0,015$).

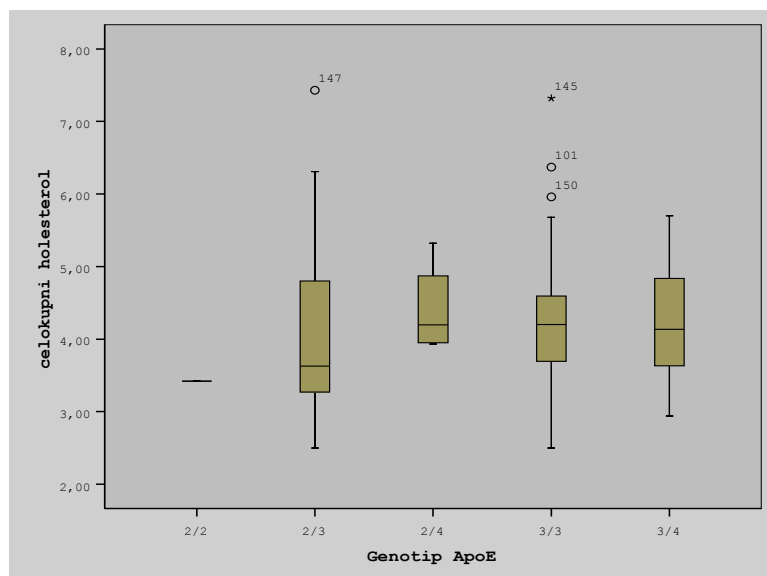
6.4. Genotip *ApoE* in koncentracija lipidov v plazmi

6.4.1. Genotip *ApoE* in koncentracija celokupnega holesterola v plazmi

Tabela 10 in slika 6 nam kažeta srednje vrednosti koncentracije celokupnega holesterola v plazmi pri različnih genotipih *ApoE*.

Tabela 10: Koncentracija celokupnega holesterola v plazmi glede na genotip *ApoE*.

genotip <i>ApoE</i>	število oseb (odstotek)	povprečna koncentracija celokupnega holesterola ± standardna deviacija [mmol/L]	mediana koncentracija celokupnega holesterola [mmol/L]	25. kvartil – 75. kvartil [mmol/L]
e2/e2	1 (0,61 %)	3,42 ± 0,00	3,42	3,42 - 3,42
e2/e3	25 (15,15 %)	4,08 ± 1,18	3,63	3,24 - 4,86
e2/e4	4 (2,42 %)	4,41 ± 0,65	4,20	3,94 - 5,10
e3/e3	111 (67,27 %)	4,19 ± 0,79	4,20	3,66 - 4,60
e3/e4	24 (14,55 %)	4,18 ± 0,77	4,14	3,63 - 4,87



Slika 6: Koncentracija celokupnega holesterola v plazmi glede na genotip *ApoE*.

Legenda:

vodoravna črta - mediana

pravokotniki - koncentracije celokupnega holesterola v rangi od 25. do 75. kvartila

krogci, zvezdice - osamelci

navpične črte - vse koncentracije razen osamelcev

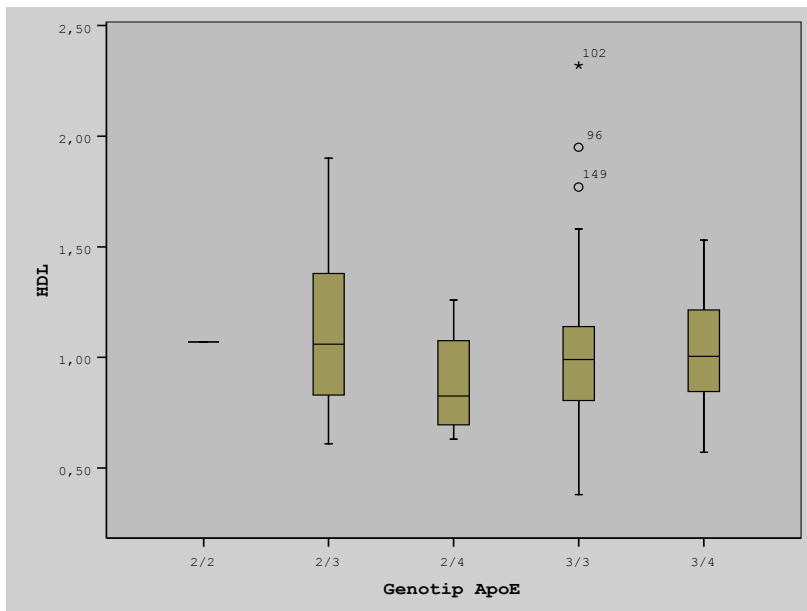
S testom ANOVA smo preverili, ali se plazemske koncentracije celokupnega holesterola razlikujejo med genotipi *ApoE*. Da smo dobili normalno porazdelitev, smo koncentracijo celokupnega holesterola transformirali z naravnim logaritmom. Ker je imela le ena oseba genotip e2/e2, tega genotipa v testu nismo upoštevali. Ugotovili smo, da se vrednosti koncentracije celokupnega holesterola v plazmi statistično značilno ne razlikujejo med genotipi *ApoE* in da genotipi *ApoE* ne vplivajo na koncentracijo celokupnega holesterola v plazmi.

6.4.2. Genotip *ApoE* in koncentracija HDL holesterola v plazmi

Tabela 11 in slika 7 nam kažeta srednje vrednosti koncentracije HDL holesterola v plazmi pri različnih genotipih *ApoE*.

Tabela 11: Koncentracija HDL holesterola v plazmi glede na genotip *ApoE*.

genotip <i>ApoE</i>	število oseb (odstotek)	povprečna koncentracija HDL holesterola ± standardna deviacija [mmol/L]	mediana koncentracija HDL holesterola [mmol/L]	25. kvartil – 75. kvartil [mmol/L]
e2/e2	1 (0,61 %)	1,07 ± 0,00	1,07	1,07 - 1,07
e2/e3	25 (15,15 %)	1,11 ± 0,36	1,06	0,82 - 1,43
e2/e4	4 (2,42 %)	0,89 ± 0,27	0,83	0,66 - 1,17
e3/e3	111 (67,27 %)	1,00 ± 0,30	0,99	0,80 - 1,14
e3/e4	24 (14,55 %)	1,02 ± 0,28	1,01	0,84 - 1,22



Slika 7: Koncentracija HDL holesterola v plazmi glede na genotip *ApoE*.

Legenda:

vodoravna črta - mediana

pravokotniki - koncentracije HDL holesterola v rangu od 25. do 75. kvartila

krogci, zvezdice - osamelci

navpične črte - vse koncentracije razen osamelcev

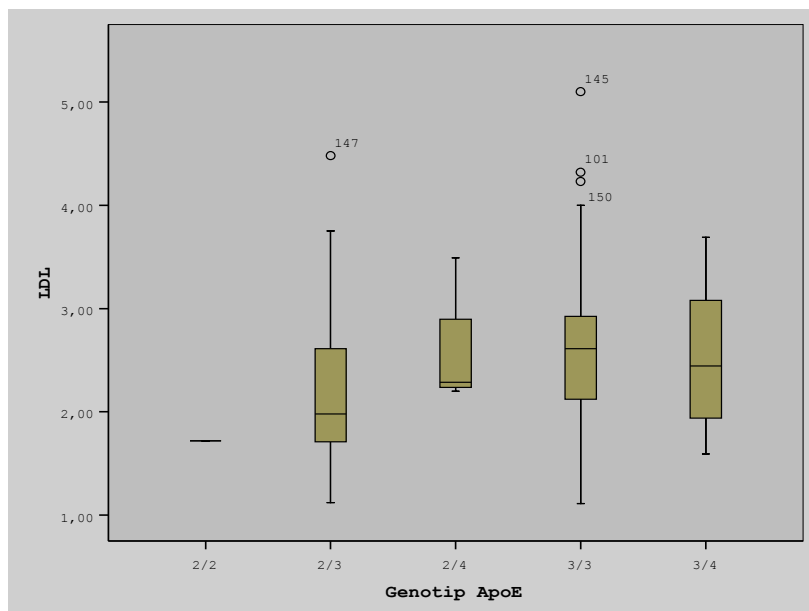
Želeli smo preveriti, če se koncentracije plazemskega HDL holesterola razlikujejo med genotipi *ApoE*; da smo dobili normalno porazdelitev, smo koncentracije plazemskega HDL holesterola transformirali z naravnim logaritmom. Genotip *e2/e2* v testu ni bil upoštevan ($n=1$). Rezultati testa ANOVA so pokazali, da se koncentracije HDL holesterola v plazmi statistično značilno ne razlikujejo med genotipi *ApoE*. Genotip *ApoE* ni vplival na koncentracijo HDL holesterola v plazmi.

6.4.3. Genotip *ApoE* in koncentracija LDL holesterola v plazmi

Tabela 12 in slika 8 nam prikazujeta srednje vrednosti koncentracije LDL holesterola v plazmi pri različnih genotipih *ApoE*.

Tabela 12: Koncentracija LDL holesterola v plazmi glede na genotip *ApoE*.

genotip <i>ApoE</i>	število oseb (odstotek)	povprečna koncentracija LDL holesterola \pm standardna deviacija [mmol/L]	mediana koncentracija LDL holesterola [mmol/L]	25. kvartil – 75. kvartil [mmol/L]
e2/e2	1 (0,61 %)	1,72 \pm 0,00	1,72	1,72 - 1,72
e2/e3	25 (15,15 %)	2,23 \pm 0,91	1,98	1,64 - 2,91
e2/e4	4 (2,42 %)	2,57 \pm 0,62	2,29	2,22 - 3,19
e3/e3	111 (67,27 %)	2,57 \pm 0,67	2,61	2,11 - 2,93
e3/e4	24 (14,55 %)	2,53 \pm 0,64	2,45	1,93 - 3,10



Slika 8: Koncentracija LDL holesterola v plazmi glede na genotip *ApoE*.

Legenda:

vodoravna črta - mediana

pravokotniki - koncentracije LDL holesterola v rangu od 25. do 75. kvartila

krogci, zvezdice - osamelci

navpične črte - vse koncentracije razen osamelcev

S testom ANOVA smo ugotovljali, ali med genotipi *ApoE* obstajajo statistično značilne razlike v plazemskih koncentracijah LDL holesterola. Normalno porazdelitev koncentracij smo dobili z naravnimi logaritmiranjem koncentracij plazemskega LDL holesterola. Ker je imela le ena oseba genotip e2/e2, tega genotipa test ni upošteval. Ugotovili smo, da obstajata dve statistično značilni razliki v koncentracijah plazemskega LDL holesterola, in sicer med osebami z genotipom e2/e3 in e3/e3 ($p=0,005$) ter med osebami z genotipom e2/e3 in e3/e4 ($p=0,044$). Osebe z genotipom e2/e3 so imele statistično značilno nižje koncentracije plazemskega LDL holesterola v primerjavi z osebami, ki so imele genotip e3/e3 in e3/e4.

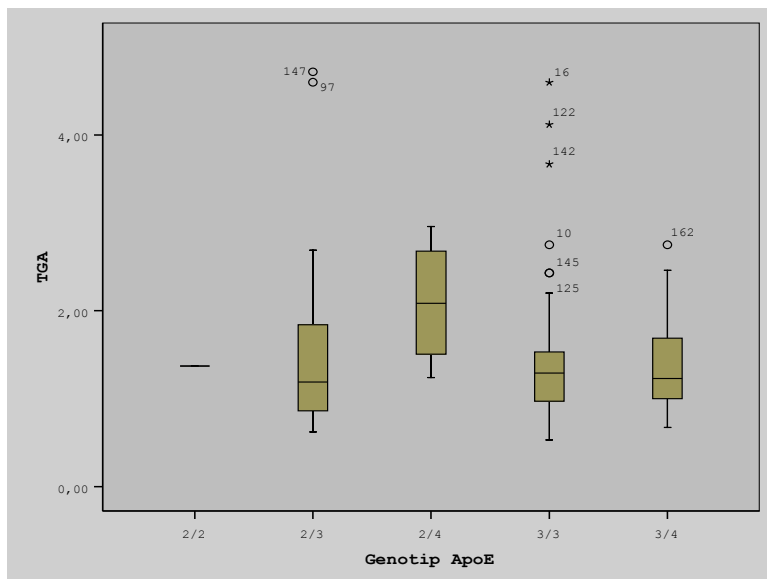
Vpliv genotipov *ApoE* na koncentracijo LDL holesterola v plazmi smo preverili tudi z metodo linearne regresije, pri čemer smo v statistični model vnesli tudi neodvisne spremenljivke, kot so spol, starost in indeks telesne mase bolnikov. Za referenčni genotip smo izbrali genotip e3/e3. Ugotovili smo, da imajo osebe z genotipom e2/e3 v plazmi statistično značilno nižje koncentracije LDL holesterola v primerjavi z nosilci genotipa e3/e3 ($p=0,003$), medtem ko se osebe z genotipom e3/e4 in e2/e4 niso statistično značilno razlikovale v koncentracijah plazemskega LDL holesterola od oseb z genotipom e3/e3.

6.4.4. Genotip *ApoE* in koncentracija trigliceridov v plazmi

Tabela 13 in slika 9 nam kažeta srednje vrednosti koncentracije trigliceridov v plazmi pri različnih genotipih *ApoE*.

Tabela 13: Koncentracija trigliceridov v plazmi glede na genotip *ApoE*.

genotip <i>ApoE</i>	število oseb (odstotek)	povprečna koncentracija trigliceridov \pm standardna deviacija [mmol/L]	mediana koncentracija trigliceridov [mmol/L]	25. kvartil – 75. kvartil [mmol/L]
e2/e2	1 (0,61 %)	1,37 \pm 0,00	1,37	1,37 - 1,37
e2/e3	25 (15,15 %)	1,62 \pm 1,08	1,19	0,86 - 1,97
e2/e4	4 (2,42 %)	2,09 \pm 0,75	2,09	1,37 - 2,82
e3/e3	111 (67,27 %)	1,35 \pm 0,62	1,29	0,97 - 1,54
e3/e4	24 (14,55 %)	1,40 \pm 0,55	1,23	1,00 - 1,73



Slika 9: Koncentracija trigliceridov v plazmi glede na genotip *ApoE*.

Legenda:

vodoravna črta - mediana

pravokotniki - koncentracije trigliceridov v rangu od 25. do 75. kvartila

krogci, zvezdice - osamelci

navpične črte - vse koncentracije razen osamelcev

Želeli smo ugotoviti, ali se koncentracije plazemskih trigliceridov med genotipi *ApoE* statistično značilno razlikujejo. Normalno porazdelitev smo dosegli z desetiškimi logaritmiranjem koncentracije plazemskih trigliceridov. Ker je imela le ena oseba genotip $e2/e2$, tega genotipa v testu nismo upoštevali. Test ANOVA je pokazal, da se koncentracija trigliceridov v plazmi med genotipi *ApoE* statistično značilno razlikuje, in sicer med osebami z genotipom $e2/e4$ in $e3/e3$ ($p=0,027$). Osebe z genotipom $e2/e4$ so imele statistično značilno višje koncentracije trigliceridov v plazmi v primerjavi z osebami, ki so imele genotip $e3/e3$ ($p=0,027$).

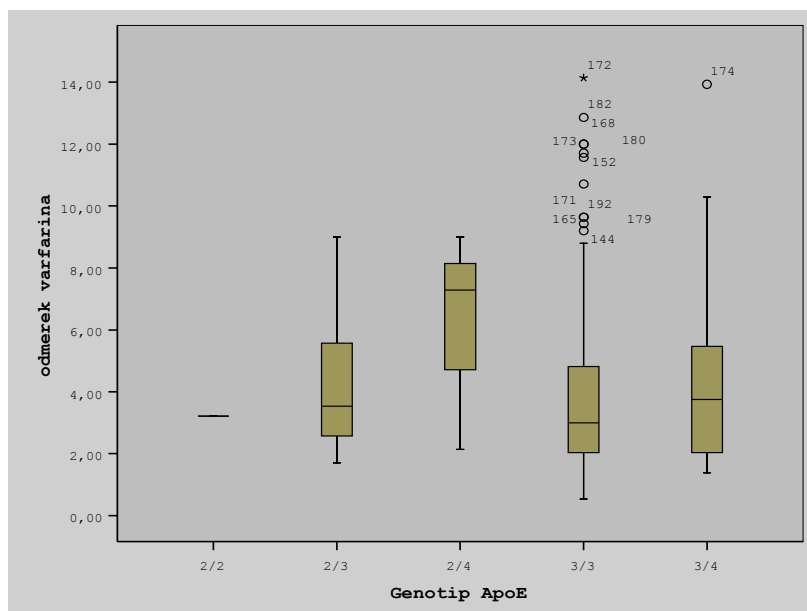
Z modelom linearne regresije smo po vključitvi več dejavnikov, kot so spol, starost in indeks telesne mase bolnikov, potrdili, da genotip *ApoE* vpliva na koncentracije trigliceridov v plazmi, saj so imele osebe z genotipom $e2/e4$ statistično značilno višje koncentracije trigliceridov v plazmi od oseb z genotipom $e3/e3$ ($p=0,012$). Ostali genotipi *ApoE* se v plazemskih koncentracijah trigliceridov od referenčnega genotipa ($e3/e3$) niso statistično značilno razlikovali.

6.5. Genotip *ApoE* in višina dnevnega odmerka varfarina

Tabela 14 in slika 10 nam prikazujeta srednje vrednosti dnevnega odmerka varfarina pri različnih genotipih *ApoE*.

Tabela 14: Višina dnevnega odmerka varfarina glede na genotip *ApoE*.

genotip <i>ApoE</i>	število oseb (odstotek)	povprečni odmerek		25. kvartil – 75. kvartil [mg/dan]
		varfarina ± standardna deviacija [mg/dan]	mediana odmerka varfarina [mg/dan]	
e2/e2	1 (0,52 %)	3,21 ± 0,00	3,21	3,21 - 3,21
e2/e3	26 (13,4 %)	4,27 ± 2,28	3,54	2,46 - 5,79
e2/e4	4 (2,06 %)	6,43 ± 2,97	7,29	3,43 - 8,57
e3/e3	131 (67,53 %)	3,98 ± 2,85	3,00	1,93 - 4,93
e3/e4	32 (16,49 %)	4,42 ± 2,97	3,75	1,98 - 5,52



Slika 10: Višina dnevnega odmerka varfarina glede na genotip *ApoE*.

Legenda:

vodoravna črta - mediana

pravokotniki - odmerki varfarina v rangu od 25. do 75. kvartila

krogci, zvezdice - osamelci

navpične črte - vsi odmerki razen osamelcev

Zanimalo nas je, ali genotipi *ApoE* statistično značilno vplivajo na višino dnevnega odmerka varfarina. Da smo dobili normalno porazdelitev spremenljivke, smo dnevni odmerki varfarina transformirali z desetiškim logaritmom. Genotip e2/e2 v testu ni bil upoštevan. Test ANOVA nam je razkril, da razlika v višinah odmerkov varfarina med genotipi *ApoE* ni statistično značilna. Odnos, ki se je najbolj približal statistično značilni razliki, je bil med nosilci genotipa e2/e4 in e3/e3 ($p=0,081$).

Ker je znano, da na višino odmerka varfarina vplivajo nekateri genetski dejavniki (polimorfizmi v genih *CYP2C9*, *VKORC*, *GGCX*), pa tudi negenetski dejavniki (starost, indeks telesne mase, uživanje zelenjave, interakcije med zdravili), smo želeli ovrednotiti sočasen vpliv genotipa *ApoE* in prej omenjenih dejavnikov na višino dnevnega odmerka varfarina. V statistični model linearne regresije smo vnesli omenjene spremenljivke (Herman s sod., 2006) in ugotavljali njihov celokupen vpliv na višino dnevnega odmerka varfarina; za referenčni genotip smo izbrali genotip e3/e3. Rezultate nam predstavlja tabela 15.

Tabela 15: Vpliv spremenljivk na višino dnevnega odmerka varfarina.

spremenljivka	vrednost p
<i>CYP2C9</i>	<0,001
<i>VKORC1</i> 6484	<0,001
starost	<0,001
<i>ApoE</i> e2/e4	0,005
spol	0,031
ITM	0,036
<i>ApoE</i> e2/e3	0,078
<i>VKORC1</i> 9041	0,132
interakcije z zdravili	0,292
<i>ApoE</i> e3/e4	0,404
uživanje zelenjave	0,629
<i>GGCX</i>	0,749

Ugotovili smo, da ob upoštevanju prej omenjenih dejavnikov, postane tudi vpliv genotipa *ApoE* na višino dnevnega odmerka varfarina statistično značilen, in sicer so bolniki z genotipom e2/e4 potrebovali statistično značilno višje dnevne odmerke varfarina v primerjavi z bolniki z genotipom e3/e3 ($p=0,005$).

7. RAZPRAVA IN SKLEPI

7.1. Razprava

Z analizo polimorfizmov gena *ApoE* pri 200 bolnikih, zdravljenih z varfarinom, smo želeli preveriti hipotezo, da različni genotipi *ApoE* vplivajo na izbrane dejavnike: na plazemske koncentracije ApoE, celokupnega holesterola, LDL holesterola, HDL holesterola in trigliceridov ter višino dnevnega odmerka varfarina.

7.1.1. Določanje genotipov *ApoE*

Za določanje genotipov *ApoE* preiskovancem smo uporabili standardni postopek genotipizacije. Ustrezni predel gena *ApoE* smo najprej pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) ter prisotnost in specifičnost produktov iz reakcije PCR preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Specifično pomnožene produkte smo nato cepili z restrikcijским encimom *HhaI* in produkte cepljenja analizirali z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu. Po začetnem iskanju optimalnih pogojev za elektroforezo na poliakrilamidnem gelu, so se za najprimernejše izkazali: 15-odstotna koncentracija poliakrilamidnega gela, čas trajanja elektroforeze 150 minut in napetost 100 V. Genotipe *ApoE* smo določili po končani elektroforezi glede na število in velikost fragmentov na poliakrilamidnem gelu. Vsem 200 bolnikom smo uspešno določili genotip *ApoE*.

7.1.2. Pogostost genotipov in alelov *ApoE*

Pri naših preiskovancih je bil najbolj pogost genotip e3/e3 z 68 %, kar je najpogostejši genotip tudi pri ostalih populacijah po svetu, s tem, da so bile frekvence genotipa e3/e3 v raziskavah, opravljenih na britanski, finski in nizozemski populaciji pod 60 %. Ostali genotipi so imeli nižje frekvence (genotip e3/e4 16,5 %, genotip e2/e3 13 %, genotip e2/e4 2 % in genotip e2/e2 0,5 %). Homozigotov za alel e4 v našem vzorcu ni bilo, medtem ko so v britanski, finski in nizozemski populaciji homozigoti za alel e4 bili prisotni (frekvence genotipa e4/e4 so bile v teh populacijah med 2 % in 4 %) (Sconce s sod., 2006, Lehtimäki s sod., 1990, Visser s sod., 2005).

Gradient frekvence alela e4, ki je visok na severu Evrope (Irska 22 %, Finska 19,4 %, Švedska 19,1 %, Velika Britanija 16,1 %) (Sheehan s sod., 2006, Lehtimäki s sod., 1990, Kohnke s sod., 2005a, Sconce s sod., 2006) in se niža proti jugu Evrope (Italija 6,9 %) (Kohnke s sod., 2005b), potrjujejo tudi rezultati diplomskega dela, saj je bila frekvenca alela e4 v našem vzorcu 9,25 %. Frekvenca alela e3 je bila pri preiskovancih pričakovano najvišja (82,75 %), najmanj pogost alel med osebami pa je bil alel e2 (8 %).

Če primerjamo zastopanost genotipov in alelov v slovenskem vzorcu z rezultati genotipizacij, opravljenih na nekaterih evropskih populacijah, opazimo, da imajo slovenski bolniki pogostosti genotipov in alelov *ApoE* najbolj podobne italijanski populaciji.

7.1.3. Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo ApoE v plazmi

Gen *ApoE* ima zapis za ApoE, 299 aminokislin dolg protein, ki ga najpogosteje najdemo v plazmi. Genetski polimorfizem *ApoE* določa tri alele e2, e3 in e4, ki imajo za posledico sintezo treh izoform ApoE E2, E3 in E4; izoformi E2 in E4 se med seboj razlikujeta v dveh aminokislinah, izoforma E3 pa se od ostalih dveh loči v eni aminokislini (Siest s sod., 2000).

Na splošno velja, da imajo homozigoti za alel e2 najvišje, homozigoti za alel e3 srednje, homozigoti za alel e4 pa najnižje vrednosti ApoE v plazmi. Podobno kot pri frekvenci alela e4 je tudi za koncentracijo ApoE viden gradient v smeri sever - jug; najvišje koncentracije ApoE imajo prebivalci na jugu Evrope, kjer je najmanj pogost alel e4, najnižje koncentracije pa prebivalci na severu Evrope, kjer je frekvenca alela e4 najvišja (Siest s sod., 2000).

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je koncentracija ApoE v plazmi statistično značilno višja pri osebah z genotipom e2/e3 in e2/e4 v primerjavi z osebami, ki imajo genotip e3/e3 in e3/e4. Poleg tega se koncentracija ApoE v plazmi statistično razlikuje tudi med osebami z genotipom e3/e3 in e3/e4; slednji imajo statistično značilno nižje

koncentracije ApoE v plazmi kot osebe z genotipom e3/e3. Iz dobljenih rezultatov lahko razberemo, da koncentracije ApoE v plazmi statistično značilno padajo v naslednjem zaporedju genotipov *ApoE*: $e2/e3 = e2/e4 > e3/e3 > e3/e4$.

Naši rezultati se ujemajo z rezultati predhodnih raziskav, ki kažejo, da so koncentracije ApoE v prisotnosti alela e2 višje (Siest s sod., 2000). Heterozigoti e2/e3 in e2/e4 so imeli najvišje koncentracije ApoE v plazmi. Čeprav naj bi imeli nosilci alela e4 nižje koncentracije ApoE, pa naši rezultati to ugotovitev potrjujejo le delno, saj so imeli heterozigoti e3/e4 nižje koncentracije ApoE v plazmi, heterozigoti e2/e4 pa višje koncentracije ApoE v plazmi od oseb z genotipom e3/e3.

Višje vrednosti koncentracij ApoE v plazmi ob prisotnosti alela e2 bi lahko pojasnili s spremenjeno afiniteto izoforme E2 do celičnih receptorjev, saj nekateri raziskovalci trdijo, da je mesto 158 na ApoE odgovorno za vezavo na celične receptorje. To mesto pa v izoformi E2 gradi druga aminokislina kot pri izoformah E3 in E4 (Siest s sod., 2000). Izoforma E2 naj bi imela zaradi svoje zgradbe zmanjšano afiniteto do celičnih receptorjev, medtem ko naj bi imeli izoformi E3 in E4 višjo afiniteto do celičnih receptorjev (Sing s sod., 1985). Možno je tudi, da se v prisotnosti alela e2 sintetizira največ ApoE, v prisotnosti alela e4 pa najmanj. Ta razlaga bi tudi pojasnila statistično značilno razliko v koncentracijah ApoE med genotipoma e3/e3 in e3/e4, saj se izoformi ApoE, ki nastaneta pri nosilcih omenjenih genotipov, med seboj ne razlikujeta po mestu, odgovornem za vezavo na celične receptorje.

Pri razlagi razlik v plazemskih koncentracijah ApoE med genotipi *ApoE*, bi bilo smiselno upoštevati tudi polimorfizme v promotorski regiji gena *ApoE*.

7.1.4. Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo lipidov v plazmi

Polimorfizmi v genu *ApoE* določajo proteinsko izoformo ApoE, ki prenaša lipidne delce po krvi. Poleg tega se ApoE veže tudi z nekaterimi lipoproteinskimi receptorji na celični površini in tako ureja prehajanje lipidov v celično notranjost (Siest s sod., 2000).

7.1.4.1. Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo celokupnega holesterola v plazmi

Koncentracija celokupnega holesterola v plazmi je seštevek koncentracij različnih plazemskih holesterolnih delcev, in sicer: HDL, IDL, LDL in VLDL holesterola. Holesterol v plazmi prenašajo različni apolipoproteini, med njimi tudi ApoE (Boyer, 2005).

Rezultati naše raziskave so pokazali, da se pri različnih genotipih *ApoE* povprečne koncentracije celokupnega holesterola med seboj niso statistično značilno razlikovale.

Dobljeni rezultati so v nasprotju z raziskavo Kamboha, ki je v populaciji zdravih Američanov nešpanskega porekla ugotovil, da imajo osebe z genotipom e3/e4 statistično značilno višje koncentracije celokupnega holesterola v primerjavi z osebami z genotipom e3/e3, osebe z genotipom e2/e3 pa so imele statistično značilno nižje koncentracije celokupnega holesterola glede na osebe z genotipom e3/e3 (Kamboh s sod., 1995).

Raziskava, izvedena na finski populaciji, pa je pokazala, da imajo nosilci genotipa e4/e4 in e3/e4 statistično značilno višje koncentracije celokupnega holesterola, nosilci genotipa e3/e2 pa statistično značilno nižje koncentracije celokupnega holesterola glede na osebe z referenčnim genotipom e3/e3 (Lehtimäki s sod., 1990).

Prav tako je prisotnost alela e4 pri zdravih Ircih pokazala zvišane koncentracije celokupnega holesterola v primerjavi z osebami, ki so imele alel e3. Prisotnost alela e2 pa je imela za posledico nižje koncentracije celokupnega holesterola (Sheehan s sod., 2000).

Rezultate diplomskega dela potrjuje raziskava Letonje, ki je bila opravljena na slovenskih bolnicah z zgodnjo obliko koronarne arterijske bolezni in kontrolni skupini zdravih žensk. Genotipi *ApoE*, podobno kot v diplomskem delu, niso statistično značilno vplivali na koncentracijo celokupnega holesterola (Letonja s sod., 2004).

Možno je, da rezultati ne izkazujejo statistično značilnih razlik zaradi različnih lipoproteinskih delcev, ki sestavljajo celokupni holesterol (HDL, IDL, LDL, VLDL). Lipoproteine namreč gradijo različni apolipoproteini. Znano je, da delce LDL skoraj v celoti gradi apolipoprotein B-100, pa tudi delež ApoE v delcih HDL ni visok. Na koncentracijo celokupnega holesterola v plazmi bi lahko vplivali genski polimorfizmi za ostale apolipoproteine in lipoproteinske receptorje, pa tudi količina zaužitih maščob.

7.1.4.2. Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo HDL holesterola v plazmi

Genotip *ApoE* določa izoformo ApoE, enega izmed proteinov, ki gradi delce HDL. Delci HDL imajo med vsemi lipoproteini največjo gostoto in največjo vsebnost proteinov (55 %) (Boyer, 2005).

Rezultati, ki smo jih dobili, so pokazali, da se povprečne koncentracije HDL holesterola v plazmi med osebami z različnimi genotipi *ApoE* ne razlikujejo statistično značilno.

Prav tako ni bil statistično značilen odnos med genotipi *ApoE* v koncentracijah HDL holesterola v irski in finski populaciji zdravih preiskovancev (Lehtimäki s sod., 1990, Sheehan s sod., 2000). Študija Kamboha pa je pokazala, da pri zdravih osebah, nosilcih različnih genotipov *ApoE*, ni statistično značilnih razlik v plazemskih koncentracijah HDL holesterola, opazil pa je razlike med moškimi, sladkornimi bolniki nešpanskega porekla, kjer imajo nosilci genotipa e3/e4 statistično značilno nižje koncentracije HDL holesterola v plazmi v primerjavi z nosilci genotipov e3/e3 ali e2/e3 (Kamboh s sod., 1995).

Kot kaže, genotip *ApoE* ni dejavnik s katerim bi lahko pojasnili razlike v plazemskih koncentracijah HDL holesterola. ApoE je le eden izmed apolipoproteinov, ki gradijo delce HDL. Najbrž imajo na količino HDL holesterola pomembnejše vplive nekateri negenetski dejavniki, na primer količina zaužitih maščob, in genetski dejavniki, kamor bi lahko sodili polimorfizmi ostalih apolipoproteinov in celičnih receptorjev, odgovornih za vnos lipidov v celice.

7.1.4.3. Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo LDL holesterola v plazmi

Delci LDL, v katerih je LDL holesterol, vsebujejo okrog 25 % proteinov, gradijo pa jih skoraj izključno apolipoproteini B-100 (Boyer, 2005). Izoforme ApoE, določene z genotipom *ApoE*, so v delcih LDL zastopane zelo redko.

V naši študiji so imele osebe z genotipom e2/e3 statistično značilno nižje koncentracije LDL holesterola v primerjavi z osebami z genotipom e3/e3 in e3/e4. Razlika v koncentraciji LDL holesterola je bila višja med osebami z genotipom e3/e3 in e2/e3 ($p=0,005$), kot med osebami z genotipom e3/e4 in e2/e3 ($p=0,044$).

Naše ugotovitve potrjujejo ugotovitve finske raziskave pri otrocih in adolescentih. Ta je pri osebah z genotipoma e4/e4 in e3/e4 dobila statistično značilne višje koncentracije LDL holesterola v primerjavi z osebami, ki so imele genotip e3/e3, osebe z genotipom e2/e4, e2/e3 in e2/e2 pa so imele statistično značilno nižje koncentracije LDL holesterola kot osebe z genotipom e3/e3. Alel e4 je bil pogostejši pri osebah z višjimi, alel e2 pa pri osebah z nižjimi koncentracijami LDL holesterola. Heterozigoti e2/e4 so imeli srednje vrednosti koncentracij LDL holesterola (Lehtimäki s sod., 1990).

Finske izsledke potrjuje tudi Kambohova študija. Tako so Američani nešpanskega porekla obeh spolov in Američanke španskega porekla z genotipom e3/e4 imeli statistično značilno višje koncentracije LDL holesterola, osebe z genotipom e2/e3 pa statistično značilno nižje koncentracije LDL holesterola glede na osebe z genotipom e3/e3 (Kamboh s sod., 1995).

Tudi irska raziskava je dala podobne rezultate: nosilci alela e4 so imeli statistično značilno višje koncentracije LDL holesterola od nosilcev alelov e2 in e3 (Sheehan s sod., 2000).

Rezultati naše raziskave kažejo, da na višino koncentracije LDL holesterola v plazmi vpliva polimorfizem gena *ApoE* kljub temu, da ApoE ni glavni protein, ki sestavlja obravnavane lipoproteinske delce. Ugotovitve o koncentracijah ApoE pri posameznih genotipih *ApoE* nakazujejo, da bi pri osebah z genotipom e2/e3 in e2/e4 pričakovali višje vrednosti LDL holesterola, saj imajo več ApoE v plazmi. Vendar rezultati tega

nepotrjujejo. Kot kaže, določata genotipa e3/e3 in e3/e4 izoformi E3 in E4, ki imata višjo afiniteto do LDL holesterola, medtem ko ima izoforma E2 nižjo afiniteto do LDL holesterola. Naši rezultati bi lahko potrdili ugotovitve raziskav o zaščitni funkciji izoforme E2 v plazmi (Siest s sod., 2000). Višje koncentracije LDL holesterola v plazmi pri osebah z genotipom e3/e3 in e3/e4 bi lahko bile tudi posledica nižjih afinitet izoform E3 in E4 do lipoproteinskih celičnih receptorjev, čeprav večina študij kaže, da ima izoforma E2 nižjo afiniteto do celičnih receptorjev in s tem počasnejše prehajanje lipidov v celice. Te možnosti ne potrjujejo tudi višje koncentracije ApoE v plazmi pri nosilcih genotipa e2/e3 in e2/e4.

7.1.4.4. Vpliv genotipa *ApoE* na koncentracijo trigliceridov v plazmi

Trigliceride vsebujejo različni lipoproteinski delci, njihov delež pa je največji (85 %) v hilomikronih. Večinski proteinski gradnik hilomikronov je ApoE. Trigliceridi v manjšem deležu sestavljajo delce VLDL (50 %), manj pa jih je delcih LDL (10 %) in delcih HDL (4 %) (Boyer, 2005).

Naši rezultati so pokazali, da imajo osebe z genotipom e2/e4 statistično značilno višje koncentracije trigliceridov v plazmi v primerjavi z osebami, ki imajo genotip e3/e3 ($p=0,027$). Statistično značilni razliki se približa tudi razlika v koncentracijah trigliceridov med genotipoma e2/e4 in e3/e4 ($p=0,058$).

Siest trdi, da je prisotnost alelov e2 in e4 povezana z višjimi koncentracijami plazemskih trigliceridov. Pri osebah z genotipom e3/e3 naj bi bile koncentracije trigliceridov v plazmi najnižje, pri osebah z genotipi e2/e2, e4/e4 in e2/e4 pa najvišje (Siest s sod., 2000). Te trditve potrjujejo tudi rezultati diplomskega dela, pa vendar je razlika v koncentracijah trigliceridov med genotipoma, ki vsebujeta alel e4 (e2/e4 in e3/e4), skoraj statistično značilna. To nakazuje, da je bil alel e4 povezan z višjimi koncentracijami trigliceridov le pri heterozigotih e2/e4.

Če primerjamo naše rezultate z ostalimi opravljenimi raziskavami, se ugotovitvam še najbolj približa raziskava Letonje. Iz nje izhaja, da so imele nosilke genotipa e2/e3 statistično značilno višje koncentracije trigliceridov v primerjavi z nosilkami genotipa e3/e3, s tem, da je v analizi Letonja upošteval le tri genotipe: e2/e3, e3/e3 in e3/e4 (Letonja s sod., 2004).

Ugotovitve Letonje je potrdila študija Chuna, saj imajo tudi Korejci z genotipom e2/e3 višje, Korejci z genotipom e3/e4 pa nižje koncentracije trigliceridov v plazmi glede na osebe z genotipom e3/e3 (Chun s sod., 2001).

Rezultati obsežne finske raziskave se ne ujemajo z našimi ugotovitvami, saj se pri Fincih razlike v koncentracijah trigliceridov med posameznimi genotipi *ApoE* niso pokazale za statistično značilne (Lehtimäki s sod., 1990).

Tudi Kamboh je ugotovil statistično značilne razlike v koncentracijah plazemskih trigliceridov le pri ameriških sladkornih bolnikih španskega porekla. Ti so imeli povišane koncentracije trigliceridov v primeru genotipa e3/e4 (Kamboh s sod., 1995).

Iz naših rezultatov lahko sklenemo, da imajo heterozigoti e2/e4 višje koncentracije trigliceridov v plazmi od homozigotov e3/e3. Verjetno so rezultati posledica višje afinitete izoforme E2 in nižje afinitete izoforme E3 do trigliceridov. Lahko pa so rezultati posledica zmanjšanja afinitete izoforme E2 do celičnih receptorjev, kar ima za posledico višje koncentracije krožečih plazemskih trigliceridov v primeru genotipa e2/e4. Višje koncentracije trigliceridov v plazmi pri osebah z genotipom e2/e4 bi lahko pripisali tudi višjimi koncentracijam plazemskega ApoE, ki smo jih zasledili pri osebah s tem genotipom. ApoE je namreč glavni protein, ki gradi hilomikrone, ti pa so glavni prenašalci trigliceridov v plazmi. Nižje koncentracije trigliceridov v plazmi pri genotipu e3/e3 pa lahko pojasnimo z zmanjšano afiniteto izoforme E3 do celičnih lipoproteinskih receptorjev ali pa z nižjimi koncentracijami ApoE v plazmi, ugotovljenimi pri osebah z genotipom e3/e3.

7.1.5. Vpliv genotipa *ApoE* na višino dnevnega odmerka varfarina

Izoforme ApoE, določene z genotipom *ApoE*, gradijo hilomikrone, ki v plazmi poleg lipidov prenašajo tudi vitamin K. ApoE v hilomikronih je ligand za nekatere celične receptorje, ki uravnavajo privzem vitamina K v celice. Količina privzetega vitamina K v celicah lahko vpliva na višino dnevnega odmerka varfarina, zdravila, ki preprečuje aktivacijo od vitamina K odvisnih faktorjev strjevanja krvi. Povečan privzem vitamina K bi lahko zmanjšal antikoagulacijski učinek varfarina in s tem povečal odmerek varfarina (Kohnke s sod., 2005a), čeprav nekatere študije tega ne potrjujejo (Sconce s sod., 2006).

V preučevani populaciji 200 bolnikov, ki so bili na dolgotrajnem zdravljenju z varfarinom, nismo opazili statistično značilnih razlik v odmerkih varfarina med genotipi *ApoE*. Povprečna višina odmerka varfarina med genotipi *ApoE* je statistično neznačilno padala v naslednjem zaporedju: $e2/e4 > e3/e4 > e2/e3 > e3/e3$. Največja razlika med odmerki varfarina je bila med genotipom $e2/e4$ in $e3/e3$, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p=0,081$). Model linearne regresije pa je pokazal, da ob upoštevanju nekaterih spremenljivk, za katere je znano, da vplivajo na višino odmerka, postane tudi vpliv genotipa *ApoE* na višino odmerka varfarina statistično značilen. Rezultati so pokazali, da potrebujejo osebe z genotipom $e2/e4$ statistično značilno višje odmerke varfarina v primerjavi z osebami, ki imajo genotip $e3/e3$ ($p=0,005$). Model je tudi pokazal, da se statistično značilni razliki približajo odmerki varfarina med nosilci genotipa $e2/e3$ in $e3/e3$ ($p=0,078$).

Iz prikazanih rezultatov lahko sklepamo, da je pri določanju najprimernejšega odmerka varfarina poleg genetskih (*CYP2C9* in *VKORCI*) in negenetskih dejavnikov (starost, indeks telesne teže), za katere je znano, da vplivajo na odmerek zdravila, priporočljivo upoštevati tudi bolnikov genotip *ApoE*.

Primerjava rezultatov slovenskega vzorca z rezultati raziskave Sconcejeve razkrije, da se izsledki obeh raziskav ujemajo le delno, in sicer v višanju odmerka pri nosilcih alela $e2$. V britanski raziskavi so namreč osebe z genotipom $e3/e4$ potrebovale statistično značilno nižje odmerke varfarina od oseb z genotipom $e3/e3$. V tej raziskavi so po izključitvi oseb z

genotipom e2/e4, imeli nosilci alela e4 statistično značilno nižje odmerke varfarina ($p=0,03$), nosilci alela e2 pa - vendar ne statistično značilno ($p=0,07$) - višje glede na nosilce alela e3. Medtem ko so naši bolniki z genotipom e2/e4 potrebovali statistično značilno višje odmerke varfarina kot bolniki z genotipom e3/e3 ($p=0,005$), so v raziskavi Sconcejeve bolniki z genotipom e2/e4 potrebovali neznačilno nižje odmerke varfarina kot bolniki z genotipom e3/e3 ($p=0,3$) (Sconce s sod., 2006).

Tudi primerjava rezultatov z nizozemsko študijo je pokazala različne odnose med genotipi *ApoE* in višino odmerka antikoagulantov med slovenskimi in nizozemskimi preiskovanci. Izkazalo se je, da nizozemski bolniki, homozigoti za alel e2, potrebujejo statistično značilno višje odmerke, homozigoti za alel e4 pa statistično značilno nižje odmerke acenokumarola kot bolniki z genotipom e3/e3. Nizozemski bolniki z alelom e4 so potrebovali statistično značilno nižje odmerke acenokumarola, česar pri slovenskih bolnikih, zdravljenih z varfarinom, nismo opazili. Razlika v odmerku acenokumarola med osebami z genotipom e2/e4 in e3/e3 ni bila statistično značilna ($p=0,18$), povprečna višina odmerka acenokumarola pri bolnikih z genotipom e2/e4 pa je bila nižja kot pri genotipu e3/e3 (Visser s sod., 2005), kar se ne sklada z našimi ugotovitvami.

Razhajanja so opazna tudi v primerjavi s Kohnkejevo študijo, saj je Kohnke po analizi odnosa med povprečnimi vrednostmi odmerka varfarina pri genotipih *ApoE* ugotovil, da v izbrani skupini bolnikov z genotipom CYP2C9*1/1, potrebujejo homozigoti za alel e4 statistično značilno višje odmerke varfarina od oseb z drugimi genotipi *ApoE* v tej skupini. Vendar je bolnike statistično analiziral le glede na število alelov e4 (0, 1, 2), ne pa po posameznih genotipih (Kohnke s sod., 2005a).

Tudi študija, opravljena na italijanskih bolnikih, ni pokazala podobnosti z našo raziskavo. Odmerki varfarina se med različnimi genotipi niso izkazali za statistično značilne prav v nobeni kombinaciji alelov *ApoE* - mogoče sta vzrok odsotnost homozigotov za alel e4 in ločevanje bolnikov le glede na število alelov e4 (Kohnke s sod., 2005b).

Ker večina študij določa izoformo E2 kot izoformo z najmanjšo afiniteto do celičnih receptorjev, bi lahko sklepali, da genotip, ki vsebuje alel e2, določa najnižje odmerke

varfarina zaradi najpočasnejšega privzema vitamina K v celice. Vendar pa so naši preiskovanci z genotipom e2/e4 (in delno tudi z genotipom e2/e3) potrebovali najvišje odmerke varfarina. Zanimivo je, da so bili rezultati vpliva genotipa *ApoE* na dnevni odmerek varfarina zelo podobni rezultatom vpliva genotipa *ApoE* na koncentracijo trigliceridov v plazmi.

Rezultate, ki smo jih dobili, lahko razložimo s tem, da višja koncentracija ApoE v plazmi določa tudi višje odmerke varfarina, saj lahko večja koncentracija proteina prenaša več vitamina K1 v plazmi, ki posledično prehaja v celice v večjih količinah. To bi pomenilo, da osebe z višjimi koncentracijami ApoE potrebujejo višje odmerke varfarina. V naši raziskavi to drži le delno, saj imajo osebe z genotipom e2/e4 res statistično značilno višje koncentracije ApoE in odmerke varfarina v primerjavi z osebami z genotipom e3/e3, vendar to ne velja za osebe z genotipom e2/e3, ki imajo prav tako visoke koncentracije ApoE, vendar njihovi odmerki varfarina niso statistično značilno višji od oseb z genotipom e3/e3.

Možno je, da višje koncentracije trigliceridov v plazmi (v našem vzorcu imajo najvišje koncentracije trigliceridov osebe z genotipom e2/e4, ki imajo tudi najvišje odmerke varfarina), ki jih prenaša ApoE v hilomikronih, pomenijo tudi več prenešenega vitamina K1 v celice. To bi lahko pomenilo, da potrebujejo bolniki z višjimi koncentracijami trigliceridov v plazmi, višje odmerke varfarina v primerjavi z bolniki, ki imajo nižje koncentracije trigliceridov v plazmi. To potrjujejo tudi rezultati naše raziskave: osebe z genotipom e3/e3 imajo najnižje koncentracije trigliceridov v plazmi, obenem pa osebe s tem genotipom potrebujejo tudi najnižje odmerke varfarina.

7.2. Sklepi

Opravljen genotipizacija *ApoE* je pokazala:

- Pri slovenskih preiskovancih (n=200) na dolgotrajnem antikoagulacijskem zdravljenju z varfarinom je bil najpogostejši alel e3 (82,75 %), manj pogosta sta bila alela e4 (9,25 %) in e2 (8 %). Največkrat zastopan genotip je bil e3/e3 (68 %), manjkrat pa genotipa e3/e4 (16,5 %) in e2/e3 (13 %). Genotip e2/e4 je bil prisoten pri 4 %, genotip e2/e2 pa pri 0,5 % preiskovancev. Genotipa e4/e4 v preiskovanem vzorcu ni imel nihče izmed preiskovancev.

Analiza vpliva različnih genotipov *ApoE* (e2/e3, e2/e4, e3/e3 in e3/e4) na plazemske koncentracije ApoE ter nekaterih lipidov, in sicer celokupnega holesterola, LDL holesterola, HDL holesterola in trigliceridov je podala naslednje ugotovitve:

- Koncentracija ApoE v plazmi je bila statistično značilno višja pri osebah z genotipom e2/e3 v primerjavi z osebami, ki so imele genotip e3/e3 (p<0,001) ali genotip e3/e4 (p<0,001). Tudi osebe z genotipom e2/e4 so imele statistično značilno višje koncentracije ApoE v plazmi v primerjavi z osebami, ki so imele genotip e3/e3 (p=0,001) ali genotip e3/e4 (p<0,001). Prav tako se je za statistično značilno pokazala razlika v plazemskih koncentracijah ApoE med osebami z genotipom e3/e3 in e3/e4; slednji so imeli statistično značilne nižje koncentracije ApoE v plazmi (p=0,016).
- Genotip *ApoE* ni statistično značilno vplival na koncentracije celokupnega holesterola v plazmi.
- Genotip *ApoE* ni statistično značilno vplival na koncentracije HDL holesterola v plazmi.

- Osebe z genotipom e2/e3 so imele statistično značilno nižje koncentracije LDL holesterola v plazmi v primerjavi z osebami, ki so imele genotip e3/e3 ($p=0,005$) ali genotip e3/e4 ($p=0,044$). Ostali genotipi se niso statistično značilno razlikovali v koncentracijah plazemskega LDL holesterola.
- Osebe z genotipom e2/e4 so imele statistično značilno višje koncentracije trigliceridov v plazmi v primerjavi z osebami, ki so nosilke genotipa e3/e3 ($p=0,027$). Ostali genotipi se niso statistično značilno razlikovali v koncentracijah plazemskih trigliceridov.

Analiza vpliva različnih genotipov *ApoE* (e2/e3, e2/e4, e3/e3 in e3/e4) na višino dnevnega odmerka varfarina je pokazala naslednje ugotovitve:

- Genotip *ApoE* ni statistično značilno vplival na višino dnevnega odmerka varfarina preiskovancev. Ob upoštevanju drugih genetskih (*CYP2C9*, *VKORC1*, *GGCX*) in negenetskih dejavnikov (starost, spol, indeks telesne mase, uživanje zelenjave, interakcije z zdravili), za katere je znano, da vplivajo na dnevni odmerek varfarina, pa smo zasledili statistično značilno razliko v višini dnevnega odmerka varfarina med genotipoma e2/e4 in e3/e3, in sicer so nosilci genotipa e2/e4 potrebovali statistično značilno višje dnevne odmerke varfarina v primerjavi z osebami, ki so imele genotip e3/e3 ($p=0,005$).

Pri bolnikih na dolgotrajnem antikoagulacijskem zdravljenju, vključenih v našo raziskavo, je genotip *ApoE* vplival na koncentracije plazemskega ApoE, LDL holesterola in trigliceridov. Prav tako je genotip *ApoE* ob upoštevanju genetskih in negenetskih dejavnikov, za katere je znano, da vplivajo na višino odmerka varfarina, vplival tudi na višino dnevnega odmerka varfarina. Delovno hipotezo smo za omenjene dejavnike sprejeli, za koncentracije plazemskega celokupnega in HDL holesterola, kjer se statistično značilna povezava med genotipi *ApoE* in omenjenima dejavnikoma ni pokazala, pa ovrgli.

8. POVZETEK

Gen *ApoE* je polimorfen in določa tri alele: e2, e3 in e4. Najpogostejši alel v populacijah je e3, ostala dva, ki se od njega razlikujeta v eni točkasti mutaciji na četrtem eksonu gena *ApoE*, pa sta manj pogosta. Posledica polimorfizmov v genu *ApoE* so tri izoforme ApoE: E2, E3 in E4. Izoforma E2 ima na 112. in 158. mestu aminokislini cistein, izoforma E3 ima na 112. mestu cistein in na 158. mestu arginin, izoforma E4 pa ima na mestih 112 in 158 aminokislini arginin.

ApoE ima številne funkcije, še zlasti pomemben pa je za transport lipidov po krvnem obtoku. Gradi večino lipoproteinov, in sicer hilomikrone in hilomikronske ostanke, delce VLDL, IDL ter HDL, v manjših koncentracijah pa tudi delce LDL. ApoE se veže na nekatere celične lipoproteinske receptorje in s tem omogoči vnos lipoproteinov v celično notranjost.

Plazemski ApoE prenaša v hilomikronskih delcih tudi v maščobah topen vitamin K1. Reducirana oblika vitamina K1 je v jetrnih celicah kofaktor encima gama glutamil karboksilaze (GGCX). Ta encim pretvarja od vitamina K odvisne faktorje strjevanja krvi v aktivno obliko. Znano je, da antikoagulacijsko zdravilo varfarin v jetrih zavira delovanje encima vitamin K1 1,2-epoksid reduktaze (VKORC), ki pretvarja oksidirano obliko vitamina K v reducirano obliko. Možno je, da količina privzetega vitamina K1 v celice iz hilomikronov, ki jih gradi ApoE, vpliva na višino dnevnega odmerka varfarina.

V diplomskem delu smo na vzorcu 200 bolnikov na dolgotrajnem antikoagulacijskem zdravljenju z varfarinom, ugotavljali, ali genotip *ApoE* vpliva na plazemske koncentracije ApoE. Prav tako nas je zanimalo, ali so plazemske koncentracije celokupnega holesterola, HDL holesterola, LDL holesterola in trigliceridov odvisne od genotipa *ApoE*. Raziskovali smo tudi, ali genotip *ApoE* vpliva na višino dnevnega odmerka varfarina pri preiskovancih.

Genotip *ApoE* smo določili tako, da smo najprej z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pomnožili odsek genomske DNA, na katerem leži predel gena za *ApoE* s preučevanimi polimorfizmi. Z elektroforezo na agaroznem gelu smo preverili prisotnost in specifičnost

produktov PCR. Specifične produkte smo cepili z restrikcijskim encimom *HhaI* in produkte cepljenja analizirali z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu. Genotipe *ApoE* smo določili glede na število in velikost fragmentov, prisotnih na poliakrilamidnem gelu po končani elektroforezi. S testom ANOVA smo ugotavljali, ali se vrednosti plazemskih koncentracij ApoE, celokupnega holesterola, HDL holesterola, LDL holesterola, trigliceridov in višine dnevnega odmerka varfarina med različnimi genotipi *ApoE* statistično značilno razlikujejo. Rezultate smo preverili še z metodo linearne regresije, kamor smo vključili nekaj neodvisnih spremenljivk, za referenčni genotip pa smo vzeli genotip e3/e3.

Rezultati genotipizacije *ApoE* so pokazali, da je bil v izbranem vzorcu bolnikov najpogosteje zastopan alel e3 (82,75 %), manj pa alela e4 (9,25 %) in e2 (8 %). Najpogostejši genotip *ApoE*, ki smo ga našli med preiskovanci, je bil genotip e3/e3 (68%). Manj pogosti so bili genotipi e3/e4 (16,5 %), e2/e3 (13 %) in e2/e4 (2 %). Nihče od preiskovancev ni imel genotipa e4/e4, le ena oseba pa je imela genotip e2/e2 (0,5 %).

Zaradi prenizkega števila oseb z genotipom e2/e2 (n=1) in odsotnosti genotipa e4/e4 v preiskovanem vzorcu, smo v statističnih analizah upoštevali le štiri genotipe *ApoE*: e2/e4, e2/e3, e3/e3 in e3/e4.

Analiza rezultatov je pokazala, da imajo osebe z genotipom e2/e4 in e2/e3 statistično značilno višje koncentracije ApoE v plazmi kot osebe z genotipom e3/e3 in e3/e4. Osebe z genotipom e3/e3 pa so imele statistično značilne višje plazemske koncentracije ApoE od oseb z genotipom e3/e4.

Pri preučevanju vpliva polimorfizmov *ApoE* na lipide v plazmi smo ugotovili, da genotip *ApoE* ne vpliva statistično značilno na koncentracije celokupnega holesterola in HDL holesterola v plazmi. Ugotovili pa smo, da so imele osebe z genotipom e2/e3 statistično značilno nižje koncentracije LDL holesterola v plazmi kot osebe z genotipom e3/e3 in e3/e4. Osebe z genotipom e2/e4 pa so imele v plazmi statistično značilno višje koncentracije trigliceridov v primerjavi z osebami z genotipom e3/e3.

Z multiplo logistično regresijo smo ob upoštevanju drugih genetskih in negenetskih dejavnikov, za katere je znano, da vplivajo na odmerek varfarina, ugotovili, da potrebujejo osebe z genotipom e2/e4 statistično značilno višje dnevne odmerke varfarina v primerjavi z osebami, ki imajo genotip e3/e3 ($p=0,005$).

9. VIRI

1. Adamič Š. 1980. Temelji biostatistike. Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani: 115 - 116 str.
2. Antolič G., Grad A., Horvat M., Keber I., Kozjek F., Koželj M., Krevs N., Lejko-Zupanc T., Medvešček M., Pavlin R., Peternel P., Poredoš P., Pust B., Rakovec P., Ružič-Medvešček N., Žemva A. 1999. Zdravila za srce in ožilje. 145 - 147 str.
3. Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 515 - 517 str.
4. Chun S., Min W.K., Kim J.W., Park H., Jang S., Yang S.E., Kim J.Q. 2001. Apolipoprotein E polymorphism and serum lipoprotein(a) concentrations in a Korean male population. *Annals of Clinical Biochemistry*, 38: 129 - 134.
5. D'Andrea G., D'Ambrosio R.L., Di Perna P., Chetta M., Santacroce R., Brancaccio V., Grandone E., Margaglione M. 2005. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticogulant effect of warfarin. *Blood*, 105: 645 - 649.
6. Herman D., Locatelli I., Grabnar I., Peternel P., Stegnar M., Mrhar A., Breskvar K., Dolzan V. 2005. Influence of CYP2C9 polymorphisms, demographic factors and concomitant drug therapy on warfarin metabolism and maintenance dose. *The Pharmacogenomics Journal*, 5: 193 - 202.
7. Herman D., Peternel P., Stegnar M., Breskvar K., Dolzan V. 2006. The influence of sequence variations in factor VII, γ -glutamyl carboxylase and vitamin K epoksid reductase complex genes on warfarin dose requirement. *Thrombosis and Haemostasis*, 95: 782 - 787.

8. Hixson J.E., Vernier D.T. 1990. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha*I. *Journal of Lipid Research*, Volume 31: 545 - 548.

9. <http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/studenti/Teze/Membrane/3Trnlip/LPSest.pdf>
(22.maj 2007)

10. Kamboh M.I., Aston C.E., Hamman R.F. 1995. The relationship of APOE polymorphism and cholesterol levels in normoglycemic and diabetic subjects in a biethnic population from the San Luis Valley, Colorado. *Atherosclerosis*, 112: 145 - 159.

11. Kohnke H., Scordo M.G., Pengo V., Padriani R., Wadelius M. 2005b. Apolipoprotein E (*APOE*) and warfarin dosing in an Italian population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 61: 781 - 783.

12. Kohnke H., Sörlin K., Granath G., Wadelius M. 2005a. Warfarin dose related to apolipoprotein E (*APOE*) genotype. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 61: 381 - 388.

13. Lee V.W.Y., You J.H.S., Lee K.K.C., Chau T.S., Waye M.M.Y., Cheng G. 2005. Factors Affecting the Maintenance Stable Warfarin Dosage in Hong Kong Chinese Patients. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 20: 33 - 38.

14. Lehtimäki T., Moilanen T., Viikari J., Åkerblom H.K., Ehnholm C., Rönönnemaa T., Marniemi J., Dahlen G., Nikkari T. 1990. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *Journal of Lipid Research*, Volume 31: 487 - 495.

15. Letonja M., Guzič-Salobir B., Peterlin B., Petrovič D. 2004. Apolipoprotein E gene polymorphism effects triglycerides but not CAD risk in Caucasian women younger than 65 years. *Annales de Génétique*, 47: 147 - 153.

16. Lin S.K., Kao J.T., Tsai L.Y., Lin M.N., Lai C.J., Zhong W.L. 2004. Association of apolipoprotein E genotypes with serum lipid profiles in a healthy population of Taiwan. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 34: 443 - 448.
17. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.
18. Salah D., Bohnet K., Gueguen r., Siest G., Visvikis S. 1997. Combined effects of lipoprotein lipase and apolipoprotein E polymorphisms on lipid and lipoprotein levels in the Stanislas cohort. *Journal of Lipid Research*, 38: 904 - 912.
19. Sconce E.A., Daly A.K., Khan T.I., Wynne H.A., Kamali F. 2006. *APOE* genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements. *Pharmacogenetics and Genomics*, 16: 609 - 611.
20. Scordo M.G., Pengo V., Spina E., Dahl M.L., Gusella M., Padrini R. 2002. Influence of cytochrome P450 CYP2C9 and 2C19 genetic polymorphism on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 72: 702 - 710.
21. Sheehan D., Bennett T., Cashman K. 2000. Apolipoprotein E gene polymorphisms and serum cholesterol in healthy Irish adults: a proposed genetic marker for coronary artery disease risk. *Irish Journal of Medical Science*, 169: 50 - 54.
22. Siest G., Bertrand P., Herbeth B., Vincent-Viry M., Schiele F., Sass C., Visvikis S. 2000. Apolipoprotein E Polymorphisms and Concentration in Chronic Diseases and Drug Responses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38: 841 - 852.
23. Sing C.F., Davignon J. 1985. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *American Journal of Human Genetics*, 37: 268 - 285.

24. Skoglund-Andersson C., Ehrenborg E., Fisher R.M., Olivecrona G., Hamsten A., Karpe F. 2003. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. *Atherosclerosis*, 167: 311 - 317.
25. Stankovic S., Glisic S., Alavanatic D. 2000. The effect of a gender difference in the apolipoprotein E gene DNA polymorphism on serum lipid levels in a Serbian healthy population. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38: 539 - 544.
26. Visser L.E., Trienekens P.H., De Smet P.A.G.M, Vulto A.G., Hofman A., van Duijn C.M., Stricker B.H.Ch. 2005. Patients with an ApoE ϵ 4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenetics and Genomics*, 15: 69 - 74.
27. Voora D., McLeod H.L., Eby C., Gage B.F., 2005. The pharmacogenetics of coumarin therapy. *Pharmacogenomics*, 6: 503 - 513.
28. Wadelius M., Chen L.Y., Eriksson N., Bumpstead S., Ghori J., Wadelius C., Bentley D., McGinnis R., Deloukas P. 2007. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Human Genetics*, 121: 23 - 34.