

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRENA BRUNSKOLE

**POVEZANOST POLIMORFIZMA -1397_-1396insGGA V PROMOTORJU GENA
ZA SKLEROSTIN Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO TER BIOKEMIJSKIMI
KAZALCI KOSTNE REMODELACIJE**

**ASSOCIATION OF -1397_-1396insGGA PROMOTER POLYMORPHISM OF
SCLEROSTIN GENE WITH BONE MINERAL DENSITY AND BIOCHEMICAL
MARKERS OF BONE TURNOVER**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za klinično biokemijo. Meritve mineralne gostote kosti so opravili na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Kliničnega centra v Ljubljani, v Splošni bolnišnici Celje in v Zdravilišču Dolenjske toplice, meritve koncentracije biokemijskih kazalcev kostne remodelacije pa na Kliniki za nuklearno medicino Kliničnega centra v Ljubljani. Sekvenčno analizo so opravili pri MWG Biotech, Ebersberg, Nemčija.

Zahvaljujem se mentorici, izr. prof. dr. Janji Marc, mag. farm. ter mladima raziskovalkama Simoni Jurkovič, mag. farm. in Simoni Mencej, mag. farm. za številne strokovne nasvete in pomoč pri izvedbi diplomske naloge. Za koristne namige in praktične nasvete gre zahvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.

Nenazadnje se zahvaljujem družini in prijateljem za podporo v času študija.

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc.

Ljubljana, marec 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar

Članica diplomske komisije: doc. dr. Saša Baumgartner

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	i
POVZETEK / ABSTRACT	iii
SEZNAM OKRAJŠAV	iv
SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC	v
1 UVOD	1
1.1 OSTEOPOROZA	1
1.2 KOSTNINA	2
1.2.1 Kostne celice.....	3
1.2.2 Kostna remodelacija.....	4
1.2.3 Biokemijski kazalci kostne remodelacije.....	5
1.3 SIGNALNA POT WNT/β-KATENIN	6
1.3.1 Potek signaliziranja pri signalni poti Wnt/ β -katenin.....	7
1.3.2 Regulacija signalne poti Wnt/ β -katenin.....	8
1.3.3 Vloga signalne poti Wnt/ β -katenin pri tvorbi kostnine.....	9
1.4 SKLEROSTIN IN NJEGOVA VLOGA V SIGNALNI POTI Wnt/β-KATENIN	9
1.4.1 Gen za sklerostin – gen SOST.....	10
1.4.2 Karakteristike proteina sklerostina.....	11
1.4.3 Potencialna vloga sklerostina pri terapiji osteoporoze.....	12
1.4.4 Raziskani polimorfizmi gena SOST.....	13
1.5 GENETIKA PRI OSTEOPOROZI	14
1.5.1 Identifikacija kandidatnih genov pri osteoporozi.....	14
1.5.2 Raziskani kandidatni geni pri osteoporozi.....	15
1.5.3 Pomen poznavanja genetskih različic posameznika.....	16
1.6 PRESEJALNE METODE ZA ANALIZO MUTACIJ IN POLIMORFIZMOV	17
2 NAMEN DELA	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 OPIS PREISKOVANCEV TER MERITEV, KI SO BILE OPRAVLJENE PREDHODNO	20
3.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR REAKCIJA)	21
3.2.1 Priprava reakcijske zmesi.....	22
3.2.2 Potek PCR reakcije.....	24
3.2.3 Preverjanje uspešnosti PCR reakcije z agarozno gelsko elektroforezo.....	25
3.3 DENATURACIJSKA VISOKOLOČLJIVOSTNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (DHPLC)	27
3.3.1 Priprava mikrotitrne ploščice za analizo.....	28
3.3.2 Priprava aparature DHPLC za analizo.....	29

3.3.3	Potek analize DHPLC.....	29
3.4	SEKVENČNA ANALIZA	31
3.4.1	Priprava vzorcev za sekvenčno analizo	31
3.4.2	Izvedba sekvenčne analize	32
3.5	STATISTIČNE METODE.....	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1	OPTIMIZACIJA POGOJEV PCR REAKCIJE.....	33
4.2	OPTIMIZACIJA POGOJEV IN REZULTATI DHPLC ANALIZE.....	36
4.2.1	Določitev genotipa vzorcev	38
4.2.2	Analiza oblike kromatografskih vrhov	40
4.2.3	Spremljanje tlaka v separacijski koloni	42
4.2.4	Problem ponovljivosti DHPLC analize	43
4.3	REZULTAT SEKVENČNE ANALIZE.....	43
4.4	KLINIČNI POMEN POLIMORFIZMA -1397_-1396insGGA.....	44
4.4.1	Pogostost polimorfizma -1397_-1396insGGA	45
4.4.2	Vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na mineralno gostoto kosti	47
4.4.3	Vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije, DKK, OPG in RANKL	50
4.4.4	Vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na uspešnost zdravljenja z alendronatom ter raloksifenom.....	52
5	SKLEP	54
6	LITERATURA.....	55
7	PRILOGE	58
7.1	PRILOGA 1: REZULTATI GENOTIPIZACIJE.....	58
7.2	PRILOGA 2: KLINIČNI PODATKI PREISKOVANCEV PO GENOTIPSKIH SKUPINAH.....	61

POVZETEK / ABSTRACT

POVEZANOST POLIMORFIZMA -1397_-1396insGGA V PROMOTORJU GENA ZA SKLEROSTIN Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO TER BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE REMODELACIJE

Protein sklerostin ima v procesu kostne remodelacije vlogo inhibitorja tvorbe kostnine. Izguba funkcije sklerostina, ki je posledica mutacij v genu za sklerostin (genu SOST), vodi v bolezen sklerosteozo, za katero je značilno ekstremno povišanje kostne mase. Z vplivom na ekspresijo gena SOST bi lahko zmanjšali sintezo sklerostina, kar bi imelo ugoden, anabolni učinek pri osebah z osteoporozo. Ekspresija gena SOST je regulirana s promotorjem, v katerem so bili identificirani polimorfizmi s potencialnim vplivom na ekspresijo. V okviru diplomske naloge smo določili pogostost in ocenili klinični pomen polimorfizma -1397_-1396insGGA v promotorju gena SOST pri pojavnosti osteoporoze v slovenski populaciji 601 preiskovanke ter 117 preiskovancev. Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnožili željeni odsek promotorja. Za genotipizacijo smo uporabili denaturacijsko visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (DHPLC), in sicer nam je uspelo empirično določiti pogoje za ločevanje molekul DNA, ki se razlikujejo za 3 bazne pare po dolžini. Določili smo sledečo pogostost genotipov: ins -/- : ins +/- : ins +/+ = 42 % : 46 % : 12 %. Statistična analiza ni pokazala značilnega vpliva polimorfizma na mineralno gostoto kosti pri pomenopavnih ženskah, nasprotno pa je bil vpliv na znižanje MGK v področju celotnega kolka pri moških preiskovancih značilen ($p = 0,031$), in sicer je razlika v vrednosti MGK med homozigotnima genotipoma dosegla 14 %. Vpliva polimorfizma na koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije ter na koncentracijo proteinov Dickkopf, OPG in RANKL nismo dokazali. Polimorfizem nima statistično značilnega vpliva na uspešnost enoletnega zdravljenja pomenopavnih osteoporoznih preiskovank z alendronatom in raloksifenom. Majhen dokazan vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na pojavnost osteoporoze pri slovenski populaciji bi bilo smiselno ovrednotiti skupaj z dognanji ostalih raziskovalnih skupin v okviru metaanalize, saj lahko le v večji populaciji majhen vpliv določenega polimorfizma nedvoumno potrdimo.

ASSOCIATION OF -1397_-1396insGGA PROMOTER POLYMORPHISM OF SCLEROSTIN GENE WITH BONE MINERAL DENSITY AND BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE TURNOVER

In a process of bone remodeling protein sclerostin inhibits bone formation. Loss-of-function mutations in sclerostin gene (SOST gene) cause sclerosteosis, a disease associated with extreme increase in bone mass. Influencing the expression of SOST gene we could reduce sclerostin synthesis, which would have a favourable, anabolic effect in patients with osteoporosis. SOST gene expression is regulated by its promoter, in which several polymorphisms with potential influence on expression have been identified. In our research we determined frequency of -1397_-1396insGGA polymorphism in SOST promoter region in a Slovenian population of 601 women and 117 men. We also assessed its clinical importance for osteoporosis. We amplified polymorphism-containing region with polymerase chain reaction (PCR) and determined genotype using denaturation high performance liquid chromatography (DHPLC). We empirically established conditions under which we were able to distinguish between DNA molecules with 3 base pairs difference in length. The frequency of genotypes is: ins -/- : ins +/- : ins +/+ = 42 % : 46 % : 12 %. The results of statistical analysis showed no significant association of polymorphism -1397_-1396insGGA with the bone mineral density (BMD) in postmenopausal women, but we did find evidence of significant influence on decreased total hip BMD in men ($p = 0.031$). The difference in value of total hip BMD between homozygous genotypes in men reached 14 %. We did not find any association of polymorphism with the concentration of biochemical markers of bone turnover and with proteins Dickkopf, OPG and RANKL. Polymorphism does not significantly influence one-year therapy of postmenopausal women with osteoporosis with alendronate and raloxifene. Our study demonstrates a very small effect of -1397_-1396insGGA polymorphism on osteoporosis in Slovenian population. It would be reasonable to perform a meta-analysis on the basis of our findings and findings of other research groups because we can unambiguously confirm the small effect of certain polymorphism only in a large population.

SEZNAM OKRAJŠAV

AK	aminokislina
ALP	alkalna fosfataza
ANCOVA	analiza kovariance
ANOVA	analiza variance
BALP	kostna alkalna fosfataza
CTx	C-terminalni telopeptid kolagena
DHPLC	denaturacijska visokoločljivostna tekočinska kromatografija
DKK	Dickkopf
Dpd	deoksipiridinolin
EtBr	etidijev bromid
ITM	indeks telesne mase
LRP5/6	LDL-receptorju soroden protein 5 ali 6
MGK	mineralna gostota kosti
MGK_cel	mineralna gostota kosti v predelu celotnega kolka
MGK_lv	mineralna gostota kosti v predelu ledvenih vretenc
MGK_vs	mineralna gostota kosti v predelu vratu stegenice
OC	osteokalcin
OPG	osteoprotegrin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PTH	parathormon
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B
SD	standardna deviacija
SERM	selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev
SOST	gen, ki kodira za protein sklerostin
Sost	protein sklerostin
TEAA	trietilamonijev acetat
t _R	retencijski čas

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

Slike

- Slika 1:** Prenos signala po signalni poti Wnt/ β -katenin.
Slika 2: Ekstracelularna inhibicija signalne poti Wnt/ β -katenin preko sklerostina in Dickkopf.
Slika 3: Regulacija tvorbe kostnine preko signalne poti Wnt/ β -katenin.
Slika 4: Genomska struktura gena SOST.
Slika 5: Strategije pri identifikaciji genetskih variant z vlogo pri osteoporozi in ostalih kompleksnih boleznih.
Slika 6: Nastanek in elucijski diagram heterodupleksov in homodupleksov.
Slika 7: Zaporedje nukleotidov v delu promotorja gena za sklerostin, ki vsebuje preučevani polimorfizem.
Slika 8: Princip vezave molekule DNA na stacionarno fazo sistema WAVE[®].
Slika 9: Shematski prikaz komponent sistema WAVE[®].
Slika 10: Rezultat prve PCR reakcije.
Slika 11: Rezultat PCR reakcije po končani optimizaciji.
Slika 12: Kromatogrami treh vzorcev z različnimi genotipi ter 102 bp dolgega odseka DNA Sizing standarda.
Slika 13: Primer kromatograma analize DHPLC.
Slika 14: Kromatogram DNA Sizing standarda.
Slika 15: Kromatogram vzorca s heterozigotnim genotipom -/+.

Preglednice

- Preglednica I:** Opredelitev osteoporoze po merilih Svetovne zdravstvene organizacije.
Preglednica II: Sestava kostnine.
Preglednica III: Dednost fenotipov z vlogo pri osteoporozi.
Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi PCR za en vzorec.
Preglednica V: Program PCR reakcije.
Preglednica VI: Potek analize DHPLC.
Preglednica VII: Potek analize DHPLC na začetku procesa optimizacije.
Preglednica VIII: Spremembe pogojev analize DHPLC med optimizacijo.
Preglednica IX: Pogostost genotipov pri posameznih skupinah preiskovancev.
Preglednica X: Vpliv polimorfizma na MGK pri preiskovankah.
Preglednica XI: Vpliv polimorfizma na MGK pri moških preiskovancih.
Preglednica XII: Vrednosti p testov ANOVA in Kruskal-Wallis po posameznih skupinah za biokemijske kazalce ter DKK, OPG in RANKL.
Preglednica XIII: Vpliv polimorfizma na zdravljenje z alendronatom in raloksifenom.
Preglednica XIV: Rezultati genotipizacije preiskovank.
Preglednica XV: Rezultati genotipizacije preiskovancev.
Preglednica XVI: Klinični podatki za vse preiskovanke po genotipskih skupinah.
Preglednica XVII: Klinični podatki za premenopavzne preiskovanke po genotipskih skupinah.
Preglednica XVIII: Klinični podatki za zdrave pomenopavzne preiskovanke po genotipskih skupinah.
Preglednica XIX: Klinični podatki za pomenopavzne osteoporozne preiskovanke po genotipskih skupinah.
Preglednica XX: Klinični podatki za moške preiskovance po genotipskih skupinah.
Preglednica XXI: Klinični podatki za preiskovanke, zdravljene z alendronatom, po genotipskih skupinah.
Preglednica XXII: Klinični podatki za preiskovanke, zdravljene z raloksifenom, po genotipskih skupinah.
Preglednica XXIII: Referenčne vrednosti biokemijskih kazalcev kostne remodelacije.

1 UVOD

1.1 OSTEOPOROZA

Osteoporozo je definirana kot sistemska skeletna bolezen, ki jo označujeta zmanjšana količina kostne mase in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva, kar posledično vodi do povečane lomljivosti kosti. Svetovna zdravstvena organizacija opredeljuje osteoporozo kot zmanjšanje mineralne gostote kosti (MGK) za več kot 2,5 standardne deviacije od največje gostote kosti v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso (preglednica I) (1).

Preglednica I: Opredelitev osteoporoze po merilih Svetovne zdravstvene organizacije (2).

definicija	mineralna gostota kosti
normalna kost	$SD > - 1$
osteopenija	$- 2,5 < SD < - 1$
osteoporozo	$SD < - 2,5$
napredovana osteoporozo	$SD < - 2,5$ in en ali več zlomov

* *SD: standardna deviacija od normale za mlade, zdrave osebe.*

Osteoporozo kot najpogostejša metabolna bolezen kosti predstavlja enega od glavnih zdravstvenih problemov razvitih družb, saj ima po ocenah do 80. leta starosti vsaka tretja ženska in vsak šesti moški osteoporozo. Glavna nevarnost osteoporoze, osteoporotični zlom (najpogostejši so zlomi zapestja, vretenc ali kolka), vodi v izgubo samostojnosti starejših oseb ali pa povzroči zaplete (pljučnica) s smrtnim izidom (1).

Izgubljanje kostne mase, ki se pojavi s staranjem, je pomemben faktor pri nastanku osteoporoze pri moških in ženskah (3). V dobi odraščanja se več kosti izgradi kot razgradi in do 30. leta starosti je dosežena največja kostna masa. Od 30. do 40. leta sta procesa izgradnje in razgradnje uravnovežena, potem pa se začne doživljenjsko zniževanje kostne mase (1). Moški izgubljajo približno 0,5 % kostne mase letno (1). V povprečju se pri njih pojavi osteoporozo okoli 70. leta starosti, za razvoj pa je verjetno pomembno postopno zmanjševanje sekrecije androgenov iz testisov in nadledvičnih žlez (1, 3). Pri ženskah je zaradi menopavze izguba kostne mase med 50. in 70. letom bistveno večja kot pri moških – kar 3 % letno 3 do 5 let po menopavzi. Razlog za tako hitro izgubljanje kostne mase je predvsem pomanjkanje estrogenov, ki so močni zaviralci razgradnje kosti (1).

Pri postavitvi diagnoze je obvezna določitev MGK, ki je signifikantno povezana s tveganjem za nastanek osteoporotičnega zloma. MGK ponavadi merimo na lumbalnih vretencih ali na kolku s pomočjo aparatur, ki delujejo na osnovi absorpciometrije dveh energijsko različnih rentgenskih žarkov (ang. Dual Energy X-Ray Absorptiometry, DEXA). Prednost metode je minimalno sevanje, dobra ponovljivost ter hitra in neboleča izvedba. V pomoč pri oceni tveganja za zlom je tudi kvantitativna ultrazvočna preiskava kosti (2).

Poznamo dve skupini zdravil za zdravljenje osteoporoze, in sicer pospeševalce tvorbe kosti ter zaviralce razgradnje kosti. Kot pospeševalec tvorbe kosti se v terapiji uporablja parathormon (PTH) v nizkih odmerkih. Najpogosteje uporabljeni zaviralci razgradnje kosti pa so bifosfonati, estrogeni, selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM) in kalcitonin ob sočasnem dodajanju kalcija in vitamina D. Bifosfonati (alendronat, risedronat) so analogi pirofosfatov, ki se slabo resorbirajo iz črevesa in se vgradijo v kostni matriks. Resorpcijo kosti zmanjšajo z zmanjšanjem števila in inhibicijo delovanja osteoklastov. Z estrogeni lahko preprečimo nastanek pomenopavzalne osteoporoze, saj zvečajo kostno maso. SERM (raloksifen) delujejo na kost in lipide podobno ugodno kot estrogeni, v drugih tkivih pa nimajo neželenih učinkov estrogenov (prsi, maternica). Kalcitonin zavira resorpcijo kosti z inhibicijo delovanja osteoklastov (1).

Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze so tako endokrini (prezgodnja menopavza, daljša obdobja amenoreje) kot tudi pogojeni z načinom življenja (premalo telesne aktivnosti, premalo kalcija v prehrani, pitje alkohola, kajenje). V skupino z visoko stopnjo tveganja spadajo tudi osebe z nizko telesno težo, s kronično boleznijo jeter, ledvic, hipertirozo ter osebe, ki se zdravijo s heparinom, prednisolonom in antiepileptiki. Pomembno vlogo pri razvoju osteoporoze imajo genetski dejavniki. Izpostavljene so predvsem ženske bele ali azijske rase ter osebe, katerih najožji sorodniki so imeli zlome ob manjših poškodbah (1).

1.2 KOSTNINA

Kostnina je dinamično povezovalno tkivo, ki nudi telesu oporo, omogoča gibanje ter ščiti notranje organe. Vključena je tudi v presnovne poti, povezane z mineralno homeostazo in je primarno mesto hematopoeze (1, 3).

Kosti so sestavljene iz kortikalnega in trabekularnega dela (preglednica II) (1).

Preglednica II: Sestava kostnine (1, 8).

	kortikalni (kompaktni) del	trabekularni (spongiozni) del
lokacija	diafize dolgih kosti, subperisotalno	epifize dolgih kosti, ploščate kosti, vretenca
funkcija	zagotavljanje mehanske moči	prevladuje metabolična funkcija
% kostne mase	70	30
% kostne površine	33	67

Biokemično pa je kost sestavljena iz organskega in anorganskega dela. Anorganski del kostnine predstavlja približno 60 % kostne mase, 8 do 10 % je vode, ostalo pa je organski del (3). V anorganskem delu je shranjenega 99 % vsega kalcija v telesu. Ta se v kosti nahaja v dveh oblikah: kot amorfni kalcijev fosfat (kalcij je vezan labilno in se izmenjuje s kalcijem v telesnih tekočinah) ter kot kalcijev hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, stabilno vezan kalcij). V manjšem deležu predstavljajo anorganski del kosti tudi natrij, magnezij, fluorida, citrati ter nekateri drugi ioni (1). Organski del kosti pa so proteini (98 % mase organskega dela) in kostne celice (2 % mase). Glavni predstavnik proteinov je kolagen tipa I (90% vseh beljakovin), katerega vlakna tvorijo lamele. Pomembna proteina sta še osteokalcin (OC) in osteonektin, ki sodelujeta pri mineralizaciji osteoida (1, 3).

1.2.1 Kostne celice

V kostnini so prisotne tri vrste celic: osteoblasti, osteociti ter osteoklasti (1).

Osteoblasti so odgovorni za tvorbo kosti. So enojedrne celice in se razvijejo iz mezenhimskih celic strome kostnega mozga. Tvorijo osteoid z nalaganjem kolagena, izločajo osteokalcin in lokalne faktorje. Aktivnost osteoblastov je regulirana preko številnih receptorjev za lokalne faktorje, PTH, kalcitriol, estrogene, prostaglandine ... Vsebujejo večje količine alkalne fosfataze. Preko sinteze lokalnih faktorjev, ki vplivajo na delovanje osteoklastov, pa osteoblasti posredno regulirajo tudi resorpcijo kosti (1, 4).

Osteociti se diferencirajo iz osteoblastov, ki so ujeti med novonastali kostni matriks (4). Enako kot osteoblasti imajo osteociti receptorje za citokine, PTH, kalcitriol in estrogene, vendar je njihova metabolična aktivnost manjša (1, 4). Osteociti so preko izrastkov povezani s površino kosti in med seboj ter omogočajo hitro sproščanje kalcija iz kosti (1).

Osteoklasti so odgovorni za resorpcijo kosti. So velike mnogojedrne celice, ki izvirajo iz hematopoetičnih celic makrofagno-monocitne vrste. V izvencelični prostor izločajo lizosomske encime, ki lokalno znižajo pH in poskrbijo za razgradnjo kalcijevega

hidroksiapatita ter kolagena. Njihovo delovanje je regulirano s pomočjo lokalnih in sistemskih faktorjev. Kalcitonin in estrogeni zavirajo delovanje osteoklastov (1, 4).

1.2.2 Kostna remodelacija

Kostna remodelacija je dinamičen proces razgradnje stare in tvorbe nove kostnine (1). Proces sta pri odraslem človeku usklajena in ne povzročita spremembe kostne mase (3). Pri starejših ljudeh pa je prav neravnotežje med razgradnjo in izgradnjo kostnine, ki vodi v izgubo kostne mase, vzrok za pojav osteoporoze (5). Cilj remodelacije je prilagoditev arhitekture kosti na trenutne mehanske obremenitve ter popravilo mikropoškodb v kosteh, pomembna pa je tudi pri vzdrževanju homeostaze kalcija v plazmi (4).

Potek kostne remodelacije lahko razdelimo na več faz (1, 2, 3):

1. Faza aktivacije: Neaktivni osteoblasti se razmaknejo in razkrijejo kostno površino.
2. Faza pridobivanja osteoklastov: Razgaljena kost privabi osteoklaste.
3. Faza resorpcije: Osteoklasti izdolbejo na površini kosti votlinico. Traja 4 do 12 dni.
4. Faza preobrata: Je čas med koncem resorpcije ter začetkom tvorbe nove kostnine. Osteoklasti izginejo, na njihovo mesto pridejo mononuklearni fagociti, ki votlino očistijo ter jo obložijo s plastjo cementne substance. Normalno traja 1 do 2 tedna.
5. Faza pridobivanja osteoblastov in tvorbe osteoida: Tvorba kosti se začne s kemotaktičnim privabljanjem osteoblastov na površino izdolbene votlinice. Osteoblasti tvorijo osteoid, ki ga tvori v lamele razporejen kolagen. Količina nastale nemineralizirane kosti je odvisna od aktivnosti in števila osteoblastov.
6. Faza mineralizacije: Začne se nekaj dni po nastanku osteoida. Pri mineralizaciji sodelujeta alkalna fosfataza ter osteokalcin, ki ju osteoblasti izločajo v ekstracelularni prostor. Osteoblasti se med procesom mineralizacije sploščijo. Celoten proces tvorbe kosti traja 3 mesece.
7. Faza mirovanja: Površino novonastale kosti ploščato prekrijejo neaktivni osteoblasti.

Regulacija remodelacije je tako sistemska kot lokalna ter uravnava delovanje tako osteoblastov kot osteoklastov. Sistemski regulatorji so različni hormoni (PTH, kalcitriol, rastni hormoni, kortikosteroidi, ščitnični hormoni in spolni hormoni). Pri lokalni regulaciji

pa so udeleženi številni citokini ter rastni faktorji, nekateri odkriti šele pred kratkim (ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANKL), osteoprotegrin (OPG) ...). Lokalni faktorji omogočajo tesno sklopitev procesa resorpcije in formacije kostnine (1, 4).

1.2.3 Biokemijski kazalci kostne remodelacije

Biokemijski kazalci kostne remodelacije so encimi in proteini, izločeni iz kostnih celic ali pa razgradni produkti kolagena tipa I in hidroksiapatita v procesu kostne remodelacije. Prikazujejo trenutno intenzivnost remodelacije in so pomembni predvsem pri zgodjem potrjevanju uspešnosti terapije (uspešnost lahko potrdimo že po 3 mesecih, s pomočjo merjenja MGK pa šele po enem letu). V laboratorijih se še ne uporabljajo rutinsko, saj je za njih značilna velika intraindividualna variabilnost ter velika nespecifičnost (prisotnost tudi v drugih tkivih), uporaba v kliničnih študijah pa je pogostejša (6).

Označevalci kostne gradnje:

Serumska alkalna fosfataza (ALP) odraža delovanje vsaj dveh izoencimov, jetrnega in kostnega. V otroštvu zaradi rasti skeleta prevladuje kostni izoencim, v odrasli dobi pa prispevata vsak približno 50 % k celotni aktivnosti ALP. V starosti, še posebej pri ženskah po menopavzi, pa aktivnost obeh izoencimov naraste, tako da je aktivnost celotne ALP za 20 do 40 % višja kot v odrasli dobi (1). Ostali izoencimi ALP so še črevesni, ledvični, placentarni, vranični ter izoencimi, ki jih proizvajajo nekateri tumorji (7).

Kostna alkalna fosfataza (BALP) je sekrecijski produkt osteoblastov in je merilo njihove aktivnosti, zato ima veliko večjo diagnostično uporabnost (1). Sodeluje pri tvorbi osteoida in je glavni regulator kostne mineralizacije (1,7). Merjenje BALP je iz klinične perspektive boljše kot merjenje serumske ALP, ker bolj specifično odraža dogajanje v kosteh (7).

Osteokalcin (OC) je protein, ki ga izločajo skoraj izključno osteoblasti, zato je specifičen kazalec tvorbe kosti (1). Vgradi se v ekstracelularni kostni matriks ter predstavlja približno 15 % nekolagenske proteinske frakcije v kosteh (7). Visoke vrednosti OC nakazujejo pospešeno, nizke pa zavirano delovanje osteoblastov (1).

Propeptidi kolagena tipa I (PICP, PINP) odražajo intenzivnost sinteze kolagena tipa I (1). Kolagen v kosteh sintetizirajo osteoblasti in ga izločijo v obliki pre-kolagena. Po sekreciji se od pre-kolagena odcepijo propeptidi (PICP, PINP), ki preidejo v cirkulacijo (7).

Označevalci kostne razgradnje:

Hidroksiprolin (OHP) je aminokislina, ki se sprošča ob razgradnji kolagena v kosteh in tudi v koži. Presnova v kosti je večja kot v koži, tako da količina OHP v seču predstavlja predvsem razgradnjo kolagena v kosti (1).

Piridinolin (Pyr) in deokspiridinolin (Dpd) sta prečna povezovalca, ki stabilizirata kolagenske verige ter povezujeta molekule kolagena v fibrile (1). Med kostno resorpcijo se prečne povezave s pomočjo proteolitičnih encimov prekinejo. Pyr ter Dpd se sprostita v krvni obtok (7). V telesu se ne presnavljata, izločata se z urinom, kjer tudi merimo njuno koncentracijo (1,7). Piridinolin je prisoten v kostnem in hrustančnem matriksu, medtem ko deokspiridinolin najdemo skoraj izključno v kostnem kolagenu (1). Trenutno veljata Pyr in Dpd za najboljša kazalca kostne resorpcije (7).

Prečna povezovalca N in C telopeptidov kolagena tipa I (C-terminalni telopeptid kolagena (CTx) ter N-terminalni telopeptid kolagena (NTx)) se sproščata med resorpcijo kosti iz specifičnih regij kolagena tipa I (1). S pomočjo večih imunokemičnih metod lahko prepoznamo amino- ali karboksikončne skupine telopeptidov. CTx in NTx določamo v urinu ali v serumu (7).

Tartrat-rezistentna kislina fosfataza (TRAP) se sprošča iz osteoklastov v kri pri razgradnji kostnega matriksa. Ta lizosomski encim ima najmanj 5 izooblik. Izooblika TRAP5b je značilna za osteoklaste (7).

1.3 SIGNALNA POT WNT/ β -KATENIN

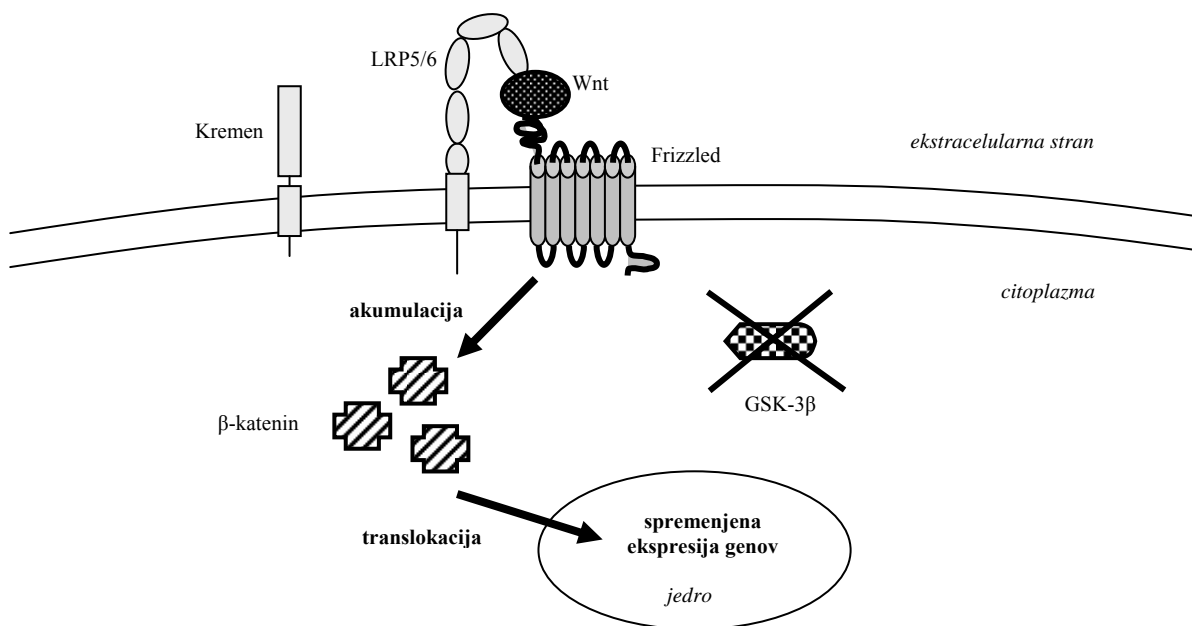
Pred kratkim je bila ugotovljena povezava med kostno maso pri človeku in mutacijami pri Wnt koreceptorju LRP5 (LDL-receptorju soroden protein 5), ki povzročijo okrepitev (fenotip z visoko kostno maso) ali izgubo delovanja LRP5 (za sindrom osteoporosis pseudoglioma je značilna izredno nizka kostna masa). Odkrita je bila tudi povezava kostne mase z mutacijami pri Wnt antagonistu sklerostinu (bolezen sklerosteoza, sindrom van Buchem). Odkritje pomembnosti Wnt signalne poti pri biologiji kosti je pritegnilo pozornost znanosti in industrije (5).

Wnt signalne poti sodelujejo pri razvoju in ohranjanju številnih organov in tkiv, vključno s kostnino. Wnt proteini regulirajo preko različnih signalnih poti celično rast, diferenciacijo,

funkcijo in smrt. Ena od teh signalnih poti, Wnt/ β -katenin ali kanonična signalna pot, pa ima pomembno vlogo v biologiji kosti (8).

1.3.1 Potek signaliziranja pri signalni poti Wnt/ β -katenin

Kaskada Wnt/ β -katenin se začne z vezavo Wnt proteinov na ekstracelularno stran koreceptorskega kompleksa, sestavljenega iz Frizzled in LRP5 ali LRP6 (slika 1). Signal se preko aktiviranega koreceptorskega kompleksa prenese na intracelularno stran (5). Na intracelularni strani pride posredno do inhibicije aktivnosti GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β), kar prepreči fosforilacijo njegovega substrata, β -katenina (5, 8). β -katenin je tako stabiliziran in se akumulira v citoplazmi (8). Ko je dosežena določena koncentracija β -katenina v citoplazmi, pride do njegove translokacije v jedro, kjer kot koaktivator transkripcije vpliva na Tcf/Lef družino transkripcijskih faktorjev (5, 8). Tako pride do stimulacije ekspresije številnih genov. Opisana signalna pot pa lahko povzroči tudi represijo ekspresije določenih genov, vendar je ta mehanizem manj poznan (9).



Slika 1: Prenos signala po signalni poti Wnt/ β -katenin.

Ob odsotnosti Wnt proteinov ali kadar je njihova vezava na koreceptorski kompleks inhibirana, pride do razgradnje β -katenina (8). GSK-3 β ter nekatere druge kinaze

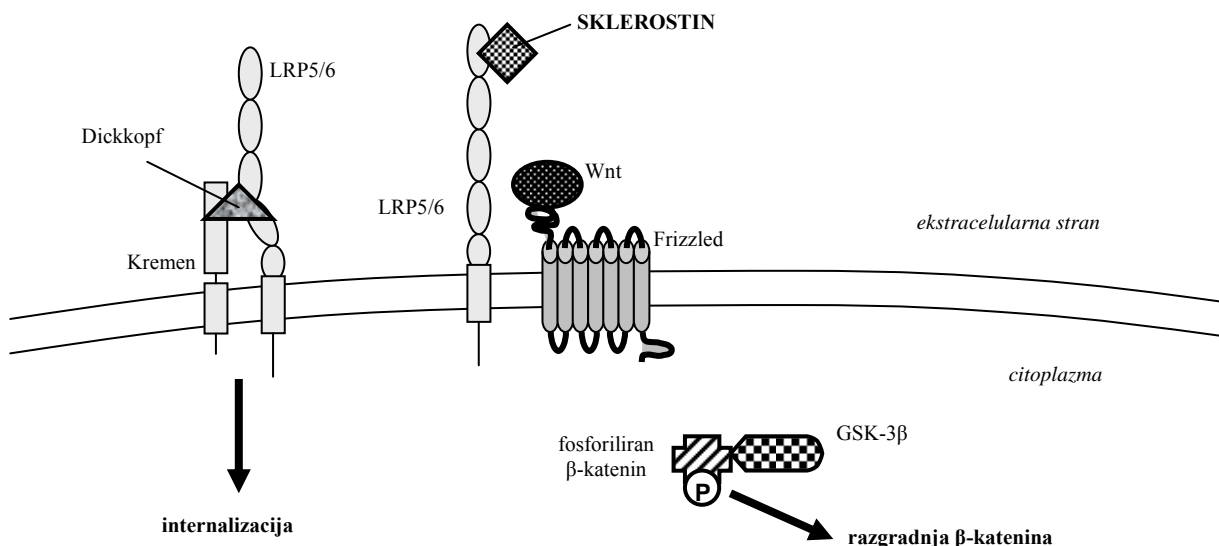
fosforilirajo β -katenin, kar vodi do njegove razgradnje v proteosomih (5). Ta mehanizem omogoča vzdrževanje nizke koncentracije β -katenina, kadar Wnt proteini niso prisotni (9).

1.3.2 Regulacija signalne poti Wnt/ β -katenin

Wnt/ β -katenin signalna pot ima velik pomen pri kontroli številnih celičnih funkcij, zato so se tudi razvili številni sistemi, ki regulirajo delovanje le-te tako ekstracelularno kot tudi v citoplazmi in v jedru (5).

Ekstracelularni inhibitorji:

- sfrp (secreted Fz-related-proteins) nevtralizirajo Wnt proteine (delujejo kot topni lažni Wnt receptorji, kamor se Wnt proteini vežejo ter s tem preprečijo vezavo na pravi transmembranski receptor Frizzled),
- sklerostin (Sost) inaktivira signaliziranje z vezavo na LRP5/6 receptorje (slika 2),
- Dickkopf (DKK) zmanjša vezavo Wnt proteinov na koreceptor LRP5/6; tvori se kompleks med Dickkopf, LRP5/6 ter Kremen, pride do internalizacije in razgradnje kompleksa, s tem pa je zmanjšano število LRP5/6 koreceptorjev v membrani (slika 2) (5, 8, 9).



Slika 2: Ekstracelularna inhibicija signalne poti Wnt/ β -katenin preko sklerostina in Dickkopf.

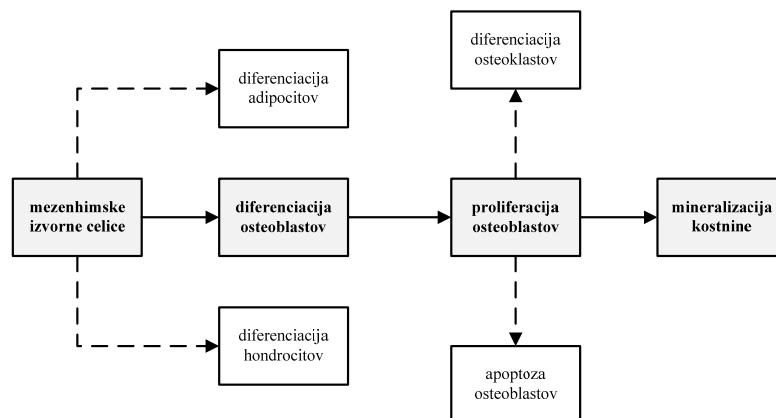
Inhibitorji v citoplazmi (npr. GSK-3 β) so vključeni v že opisano fosforilacijo β -katenina (5). Regulatorji v jedru pa so različni transkripcijski represorji (npr. Groucho), inhibitorji, ki

preprečijo interakcijo β -katenina s Tcf/Lef ter inhibitorji, ki preprečijo od β -katenina odvisno transkripcijo (5, 9).

Številni ekstracelularni agonisti in antagonisti ter intracelularni encimski regulatorji ponujajo številne možnosti za terapevtsko regulacijo signalne poti Wnt/ β -katenin (5).

1.3.3 Vloga signalne poti Wnt/ β -katenin pri tvorbi kostnine

Signalna pot Wnt/ β -katenin regulira osteogenezo (tvorbo kosti) s številnimi mehanizmi. Proteini Wnt inhibirajo diferenciacijo mezenhimske izvorne celice v adipocite in hondroците, spodbujajo pa diferenciacijo in proliferacijo osteoblastov ter mineralizacijo kostnine. Poleg tega pa Wnt proteini zavirajo apoptozo osteoblastov ter diferenciacijo osteoklastov (slika 3). Tako stimulacija Wnt/ β -katenin signalne poti vodi v povečano tvorbo kostnine, hkrati pa indirektno zavira tudi razgradnjo kostnine z inhibicijo diferenciacije osteoklastov (8).



Slika 3: Regulacija tvorbe kostnine preko signalne poti Wnt/ β -katenin; neprekinjena puščica predstavlja stimulatorno delovanje Wnt proteinov, prekinjena puščica pa inhibitorno delovanje (8).

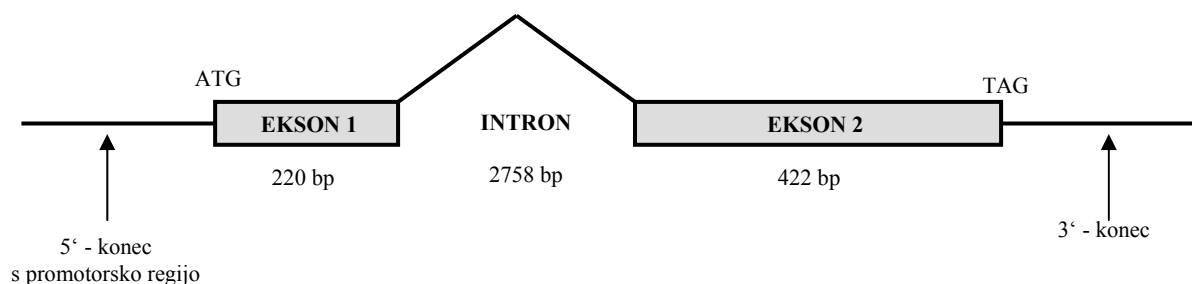
1.4 SKLEROSTIN IN NJEGOVA VLOGA V SIGNALNI POTI Wnt/ β -KATENIN

Protein sklerostin so prvič identificirali Balemans in sodelaci leta 2001 pri raziskovanju genetskih vzrokov dveh izredno redkih boleznih kosti s podobnim fenotipom: sklerosteozo in sindroma van Buchem (10). Za sklerosteozo je značilna generalizirana prekomerna rast skeleta, predvsem lobanje, kar vodi v ujetje možganskih živcev. Bolniki so zato naglušni ali

gluhi, imajo paraliziran obraz ter povečan intrakranialni pritisk, ki lahko povzroči nenadno smrt zaradi kapi (10, 11). Kostni so debele in goste, pogosto je prisotna tudi zaraščenost dveh ali več prstov skupaj ter odsotnost nohtov (11). MGK je lahko pri prizadetih osebah tudi do dvakrat višja kot normalno (12). Za sindrom van Buchem je prav tako značilna prekomerna rast kosti in ima podobno klinično sliko kot sklerosteoz, vendar je bolezen manj nevarna (3, 10). Balemans in sodelavci so ugotovili, da mutacije v genu za sklerostin (genu SOST) povzročijo izgubo funkcije proteina sklerostina, kar vodi v povečano kostno maso pri bolnikih s sklerosteozo. Sklerostinu so pripisali vlogo zaviralca tvorbe kosti (10).

1.4.1 Gen za sklerostin – gen SOST

Gen SOST je v človeškem genomu lociran na 17. kromosomu, točneje na kromosomski regiji 17q12-q21 (GenBank, Accession Number AF326736) (3, 13). V genu SOST sta prisotna dva eksona ter en intron med njima (slika 4) (13).



Slika 4: Genomska struktura gena SOST (9).

Tako pri sklerosteoz kot tudi pri sindromu van Buchem je za pojav bolezni odgovorna sprememba genskega zapisa gena SOST. Obe bolezni se dedujeta na avtosomno recisiven način (14). Pri osebah s sklerosteozo so do sedaj odkrili 5 različnih mutacij v genu SOST, ki povzročijo izgubo funkcije sklerostina (3). Tudi heterozigotni nosilci SOST mutacij imajo bistveno povišano MGK, a pri njih niso prisotni sindromi kostne disfunkcije (11, 14). Pri heterozigotnih nosilcih zaradi visoke MGK zlomi niso prisotni (11). Tako je sklerosteoz primer genske bolezni, pri kateri imajo heterozigoti od spremenjenega genskega zapisa celo korist, pri homozigotnih nosilcih pa se pojavi resna bolezen (11).

Pri sindromu van Buchem pa vzrok bolezni ni mutacija, ampak delecija 52000 baznih parov dolgega DNA odseka, ki se nahaja 32000 baznih parov navzdol od gena SOST. Izkazalo se

je, da je ta izbrisana sekvenca pomembna za regulacijo ekspresije gena SOST v kostnini (14). Zaradi spremembe pride do zmanjšanja ekspresije gena SOST (5).

1.4.2 Karakteristike proteina sklerostina

Gen SOST nosi informacijo za sintezo 213 aminokislin (AK) dolgega propeptida z molekularno maso 24 kDa. Prvih 23 AK je signalni peptid, pomemben za sekrecijo, ostale AK pa tvorijo sam protein sklerostin. Sklerostin vsebuje cisteinski vozle, ki ga tvorijo 9 ohranjenih AK (8 cisteinov in 1 glicin), katerega značilnost je sodelovanje pri dimerizaciji in vezavi na receptorje (10).

Pri raziskavah na miših so ugotovili, da sklerostin deluje kot negativni regulator tvorbe kosti. Čeprav je na začetku veljalo prepričanje, da se sklerostin veže na kostne morfogenezne proteine in deluje kot njihov endogeni antagonist, so kasnejše raziskave pokazale, da deluje preko signalne poti Wnt/ β -katenin (3). Kot topen antagonist se na ekstracelularni strani veže na receptor LRP5/6 ter s tem prepreči vezavo Wnt proteina. Sklerostin tako blokira signalno pot Wnt/ β -katenin in posledično inhibira osteoblastogenezo ter tvorbo kosti (3,15).

Sklerostin skoraj izključno izločajo osteociti (5). Osteociti so ujeti v mineralizirani kostni matriks in so glavni mehanosenzorji v kosti ter tako vključeni v regulacijo kostne remodelacije. Čeprav fiziološka vloga sklerostina v osteocitih ni popolnoma jasna, pa so pred kratkim izvedene študije pokazale, da se ekspresija sklerostina zmanjša ob prisotnosti mehanske obremenitve kosti (5). Obstaja teorija, ki osteocitom pripisuje funkcijo inhibicije matičnih celic preko sklerostina ter s tem zmanjšanje tvorbe kostnine. Pri večjih mehanskih obremenitvah ali poškodbah kosti pride do apoptoze osteocitov. Mrtvi osteociti ne morejo več izločati sklerostina, zato inhibicija tvorbe kosti ni več prisotna. Preosteoblasti se začnejo diferencirati v osteoblaste, ki so odgovorni za popravilo poškodovane in tvorbo nove kostnine. Čeprav natančen mehanizem delovanja ni znan, pa naj bi po tej teoriji imel sklerostin pomembno vlogo pri adaptaciji kostnine na mehanske obremenitve (11).

Sklerostin posredno spodbuja tudi razgradnjo kostnine. Lokalni regulator kostne remodelacije, protein RANKL, ki nastaja v osteoblastih, spodbuja nastanek ter delovanje osteoklastov. Delovanje RANKL zavira OPG, ki prav tako nastaja v osteoblastih. Sklerostin

inhibira produkcijo OPG v osteoblastih, s tem je zmanjšana inhibicija RANKL, kar posledično vodi v večjo razgradnjo kostnine (1, 3).

V regulacijo delovanja sklerostina je vpleten parathormon, in sicer PTH direktno inhibira transkripcijo gena SOST (16). Verjetno je inhibitorno delovanje PTH na gen SOST eden od razlogov za anabolno delovanje PTH v kostnini (3).

1.4.3 Potencialna vloga sklerostina pri terapiji osteoporoze

V zadnjih letih je postal sklerostin zanimiva tarča pri razvoju novih anabolnih učinkovin za zdravljenje osteoporoze. Sklerostin je prva identificirana v kostnini aktivna substanca, ki izvira iz osteocitov. Tako predstavlja prvo tarčo zunaj osteoblast-osteoklast remodelacijskega sistema (3).

Sklerostin je inhibitor tvorbe kostnine. Veže se na receptor LRP5/6 ter tako blokira Wnt signalno pot. Pri raziskovanju vzroka bolezni pri pacientih z nenormalno veliko kostno maso (high bone mass, HBM) so raziskovalci odkrili mutacije v receptorjih LRP5/6. Sprememba v strukturi receptorjev prepreči vezavo sklerostina. Iz tega lahko sklepamo, da je povečana kostna masa pri HBM pacientih posledica zmanjšane inhibicije preko endogenega sklerostina. Učinkovine, ki bi spremenile afiniteto vezave sklerostina na LRP5/6, bi lahko posnemale dogajanje pri HBM fenotipu ter s tem povečale kostno maso pri osteoporoznih pacientih (5).

Vse večje poznavanje sklerostina je vodilo v razvoj anti-sklerostin monoklonskih protiteles (anti-SOST). Anti-SOST protitelesa preprečijo vezavo sklerostina na Wnt koreceptorje ter tako omogočijo prenos signala. Učinkovitost teh protiteles so že ovrednotili na glodalcih ter primatih (15). Pri starostno osteopeničnih podganah anti-SOST protitelesa zvišajo MGK ter biomehansko moč kosti, torej delujejo anabolno. MGK se je povišala izredno hitro, v 5 tednih (3). Pri testiranju anti-SOST na primatih so tudi dokazali anabolno delovanje, poleg tega pa se je tudi farmakokinetični profil anti-SOST protiteles izkazal kot ugoden (5).

Trenutno se pri terapiji osteoporoze uporabljajo skoraj izključno samo zdravila, ki zavirajo kostno resorpcijo. Vse večja je potreba po alternativnih zdravilih z anabolnim delovanjem (do sedaj je edino v terapiji uporabljeno anabolno zdravilo PTH). Eden od načinov, kako zvišati tvorbo kostnine, je vpliv na signalno pot Wnt. Ker pa le-ta sodeluje pri različnih procesih tudi v ostalih tkivih, obstaja nevarnost, da z učinkovinami dosežemo neželjen

sistemski učinek. Temu se izognemo s ciljanim delovanjem na tarče v signalni poti Wnt, ki so kostno specifične. Protein sklerostin izpolnjuje kriterij kostno specifičnega antagonista signalne poti Wnt ter tako predstavlja zanimivo tarčo pri odkrivanju novih anabolnih učinkovin za zdravljenje osteoporoze (5).

1.4.4 Raziskani polimorfizmi gena SOST

Zaradi odkritja mutacij v genu SOST, ki so odgovorne za bolezen sklerosteozo, ter zaradi ugodnih lastnosti proteina sklerostina kot tarče anabolno delujočih učinkovin je gen SOST postal zanimiv kot kandidatni gen, udeležen pri razvoju osteoporoze.

Balemans in sodelavci so identificirali 26 različnih polimorfizmov v genu SOST. Pri 5 izbranih polimorfizmih so nato iskali povezanost polimorfizma z mineralno gostoto kosti. V študiji je sodelovalo 619 žensk, starih med 45 in 55 let, ki so bile izbrane iz populacije 5119 perimenopavzalnih žensk na podlagi MGK. Izbrane ženske so tvorile dve skupini: 326 žensk je tvorilo skupino z visoko MGK (16 % celotne populacije z najvišjo MGK), 293 žensk pa je bilo v skupini z nizko MGK (16 % celotne populacije z najnižjo MGK). Porazdelitev genotipov in alelov za vsakega od 5 polimorfizmov se ni razlikovala med skupinama. Raziskovalci so zaključili, da nobeden od 5 polimorfizmov ne sodeluje statistično značilno pri regulaciji MGK (17).

Uitterlinden in sodelavci so preučevali povezanost 8 polimorfizmov v genu SOST z MGK pri nizozemski belski populaciji. V obširni študiji je bilo genotipiziranih 1939 starejših moških in žensk, starih od 55 do 80 let. Rezultati so pokazali, da je 3 bazne pare dolga insercija v promotorju gena SOST povezana z znižano MGK pri ženskah. Povezava z MGK je bila dokazana tudi pri polimorfizmu SRP9 pri moških (gre za polimorfizem v področju genskega zapisa, kjer pride do delecije pri sindromu van Buchem), in sicer je G varianta povezana z povečano MGK. Pri obeh polimorfizmih je razlika med skrajnimi genotipi dosegla 0,2 SD. Dokazan je bil tudi aditivni efekt na MGK pri pojavu SRP3 polimorfizma skupaj s COLIA Sp1 polimorfizmom (12).

1.5 GENETIKA PRI OSTEOPOROZI

Osteoporoza je multifaktorska (genetski in okoljski dejavniki) ter multigenška bolezen (vpleteni so številni geni) (3). Študije, ki so preučevale način dedovanja pri dvojčkih in družinah, so pokazale, da je dednost fenotipov, ki prispevajo k osteoporozi in tveganju za zlom, visoka (preglednica III) (14). Manj pa je znanega o vlogi posameznih genov pri osteoporozi. Dosedanje raziskave dokazujejo, da številni geni z majhnim individualnim učinkom prispevajo k regulaciji fenotipov ter s tem tudi k pojavnosti osteoporoze (14).

Preglednica III: Dednost fenotipov z vlogo pri osteoporozi (3).

fenotip	dednost (%)
MGK	50 - 80
kostna geometrija	70 - 85
višina	80 - 90
starost ob menopavzi	60
indeks telesne mase (ITM)	60 - 70
tveganje za zlom kolka	3 - 68
tveganje za zlom zapestja	54

1.5.1 Identifikacija kandidatnih genov pri osteoporozi

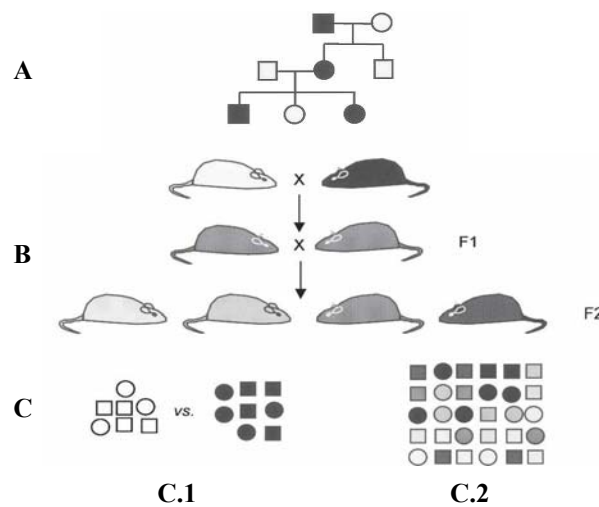
Številni pristopi so uporabljeni pri identifikaciji genov, ki regulirajo nagnjenost k osteoporozi. Najpogosteje uporabljeni pristopi so analize vezanega dedovanja, modelni organizmi ter asociacijske študije (slika 5) (14). Novi pristopi, ki pridobivajo na pomenu, pa so na celoten genom razširjene asociacijske študije (študije več tisoč polimorfizmov hkrati), funkcijska genomika (raziskovanje ekspresije genov) ter analiza interakcij gen-gen ter gen-okolje (18).

Analize vezanega dedovanja v družinah temeljijo na določitvi fenotipa za izbrano lastnost (npr. MGK) pri številnih članih družine, nato pa sledi analiza povezanosti genetskih markerjev z dednostjo teh fenotipov. Sorodstvene analize so imele izreden uspeh pri identifikaciji genov, odgovornih za redke monogenske bolezni kosti (npr. pri sklerosteozii) (14).

Modelni organizmi: Eksperimentalne živali se že dolgo uporabljajo za identifikacijo genov, odgovornih za kompleksne bolezni. Pri paritvi miši z nasprotnimi genotipi (npr. z nizko in

visoko MGK) imajo potomci (1. generacija) srednjo vrednost MGK zaradi dedovanja alela za visoko MGK od enega starša ter alela za nizko MGK od drugega starša. Pri paritvi bratov in sester 1. generacije ima 2. generacija potomcev različne vrednosti MGK. Analiza genoma 2. generacije omogoči lokalizacijo genetskih variant, ki regulirajo MGK. (14)

Asociacijske študije temeljijo na analizi kandidatnih genov pri nesorodnih osebah. Identifikaciji polimorfizma v določenem kandidatnem genu sledi analiza, ki določi povezanost posameznega alela pri tem polimorfizmu z npr. MGK ali tveganjem za zlom. Asociacijske študije lahko primerjajo paciente z osteoporozo z zdravimi osebami, ki predstavljajo kontrolno skupino; študija pa je lahko tudi populacijska in vključuje osebe z različnimi vrednostmi MGK. Osebe so na podlagi rezultatov genotipizacije razdeljene v skupine, nato pa se primerja vrednosti MGK med skupinami. Ponavadi so analizirani kandidatni geni, pri katerih je vpliv na metabolizem kosti dokazan na podlagi poznavanja kostne fiziologije in biologije. Izvedba asociacijskih študij je relativno enostavna in z njimi se lahko identificira tudi gene z majhnim vplivom (14).



Slika 5: Strategije pri identifikaciji genetskih variant z vlogo pri osteoporozni in ostalih kompleksnih boleznih; A – Analize vezanega dedovanja, B – Modelni organizmi (F1 – 1. generacija potomcev, F2 – 2. generacija potomcev), C – Asociacijske študije (C.1 – Primerjava pacientov in kontrolne skupine, C.2 – Populacijska študija) (14).

1.5.2 Raziskani kandidatni geni pri osteoporozni

Številni kandidatni geni so bili identificirani ter preučevani zaradi poznane vloge v kostnem metabolizmu (3). V populacijskih asociacijskih študijah ter študijah vezanega dedovanja je

bil tako ovrednoten pomen polimorfizmov kandidatnih genov, ki kodirajo za vitamin D receptor, estrogen receptor- α , kolegen tipa I α I (COLIA1), interlevkin-6, transformirajoči rastni faktor- β 1, PTH, OC, kalcitonin ... (17). Za številne kandidatne gene so analize pokazale, da ni nobene statistično značilne povezave med polimorfizmom ter MGK oz. ostalimi, z osteoporozo povezanimi fenotipi (14). Pri drugih genih je bila povezava sicer dokazana, ampak je mehanizem, s katerim polimorfizem vpliva na fenotipske lastnosti, neznan ali nejasen (13). Problem je tudi ponovljivost študij: določena študija dokaže korelacijo med polimorfizmom ter MGK, pri drugi študiji pa korelacija ni dokazana (3). Trenutno pridobivajo na pomenu metaanalize, ki še enkrat ovrednotijo rezultate posameznih študij in s tem ocenijo dejanski vpliv določene genetske variante pri izredno veliki populaciji (> 20.000). S pomočjo metaanaliz je bil že dokazan vpliv polimorfizmov v genih za ER, VDR ter COLIA1 na MGK in tveganje za zlom (3).

1.5.3 Pomen poznavanja genetskih različic posameznika

Na podlagi poznavanja genetskih različic pri posamezniku lahko ugotovimo nagnjenost k določeni bolezni, zgodaj diagnosticiramo bolezen, napovemo potek bolezni in izberemo primerno zdravljenje (19).

Raziskave na področju farmakogenomike poskušajo identificirati tiste genetske različice, ki so pomembne za odziv na določeno zdravilo. Tako je možna optimizacija in individualizacija farmakoterapije ter zmanjšanje stranskih učinkov (3, 19). Prvi diagnostični komercialni test, povezan s predpisovanjem določenega zdravila, ja prišel na tržišče leta 1998 (HercepTest™, ki detektira prekomerno izražanje proteina HER2, je postal pomemben del zdravljenja s protitumorsko učinkovino trastuzumab) (19). Tudi na področju osteoporoze bi lahko podobni diagnostični testi, izdelani na podlagi znanja o genetskih dejavnikih tveganja, pripomogli k zgodnjem odkrivanju nagnjenosti k razvoju osteoporoze ter k uspešnosti terapije. Kljub napredku pri raziskovanju genetskih različic pa farmakogenomika izredno počasi pridobiva na pomenu v klinični praksi. Omejevalni dejavniki so predvsem pomanjkanje dokazov o učinkovitosti, majhna sprejemljivost s strani zdravnikov, stroški analiz ter omejena uporabnost določenih testov. Ocenjujejo, da naj bi prišlo do prodora farmakogenomike v prakso šele čez 15 do 20 let (19).

1.6 PRESEJALNE METODE ZA ANALIZO MUTACIJ IN POLIMORFIZMOV

Verižna reakcija s polimerazo (Polymarase Chain Reaction, PCR)

PCR reakcija je *in vitro* metoda sinteze nukleinskih kislin, ki nam omogoči pomnožitev tarčnega odseka DNA, ki ga nato uporabimo pri presejalnih metodah za analizo mutacij in polimorfizmov (20). Mutacije in polimorfizme razlikujemo glede na njihovo frekvenco pojavljanja: mutacija se pojavi pri manj kot 1 % populacije, medtem ko se polimorfizem pojavi pri več kot 1 % populacije (3).

Za izvedbo PCR reakcije morajo biti v reakcijski zmesi prisotni vzorec DNA (matrica), dva oligonukleotidna začetnika, deoksinukleozid-trifosfati (gradniki nove verige DNA), Mg^{2+} ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA polimeraza. Po začetni denaturaciji DNA reakcija poteka ciklično (20 do 40 ciklov), in sicer vsak cikel sestavljajo: denaturacija DNA, nalaganje oligonukleotidnih začetnikov ter izgrajevanje komplementarne verige. Na koncu sledi še faza končnega podaljševanja, ki zagotovi popolno izgradnjo verig DNA (20, 21).

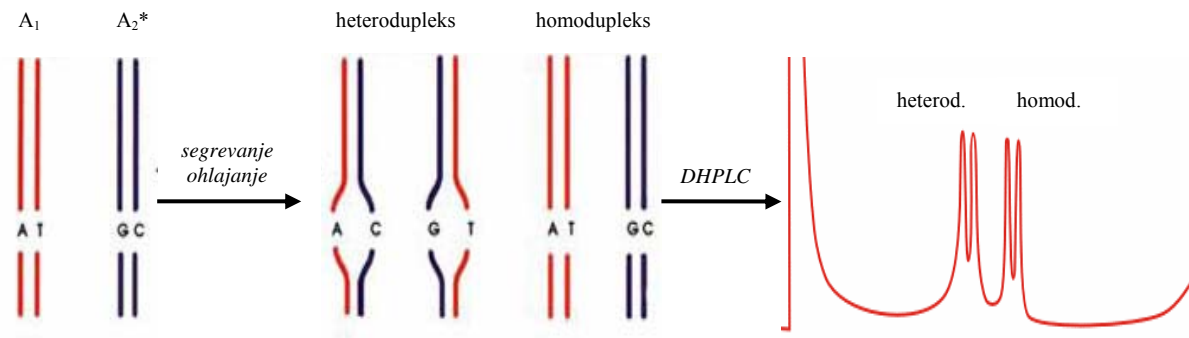
Sekvenčna analiza

Sekvenčna analiza je določitev nukleotidnega zaporedja izbranega segmenta DNA s pomočjo PCR, kjer so v reakcijski zmesi dodatno prisotni še označeni dideoksinukleotidi (ddNTP). Kadar se v verigo vgradi ddNTP, se sinteza verige prekine (ddNTP nima 3'-OH skupine in s tem vezava naslednjega nukleotida ni možna). Produkt reakcije so različno dolgi odseki DNA, ki jih ločimo po velikosti in s pomočjo detektorja določimo nukleotidno zaporedje DNA (20).

Denuracijska visokoločljivostna tekočinska kromatografija (Denaturation High Performance Liquid Chromatography, DHPLC)

Metoda DHPLC se uporablja za iskanje mutacij in polimorfizmov. Metoda je izredno občutljiva in primerljiva s sekvenčno analizo. Detekcija sprememb temelji na ločitvi homoter heterodupleksov s pomočjo reverzno-fazne ionsko-izmenjevalne tekočinske kromatografije pri visokih tlakih (slika 6). Kadar s PCR pomnožimo odsek DNA brez mutacij, bo nastal enak produkt iz obeh kromosomov (referenca). Pri vzorcih s heterozigotno mutacijo pa bosta nastala dva različna PCR produkta. Pri denaturaciji PCR produktov pri 95 °C ter postopni renaturaciji se tvorijo homodupleksi in, če je prisotna

mutacija, tudi heterodupleksi. Nato se pri temperaturi, ki povzroči le delno denaturacijo PCR produktov (med 50 in 75 °C), heterodupleksi hitreje razklenejo kot homodupleksi, kar zmanjša njihovo vezavo na separacijsko kolono ter povzroči hitrejšo elucijo. Homozigotne mutacije detektiramo z mešanjem reference ter analiziranega vzorca pred denaturacijo (22).



Slika 6: Nastanek in elucijski diagram heterodupleksov in homodupleksov; A_1 in A_2^* – alela heterozigotnega vzorca (A_2^* vsebuje mutacijo).

Analizo pa lahko izvedemo tudi pri nedenaturacijskih pogojih (temperatura med 40 in 50 °C), ki omogočajo ločevanje dvovertičnih molekul DNA po dolžini. Krajši odseki se eluirajo hitreje kot daljši (omogočeno je ločevanje DNA odsekov, ki se razlikujejo za 1 % ali več po dolžini). S to metodo je možna analiza mutacij ter polimorfizmov, kjer se pojavi sprememba dolžine DNA (insercije, delecije) (23).

Ostale presejalne metode

Metode, ki se pri analizi mutacij in polimorfizmov veliko uporabljajo, so še analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov DNA (RFLP), analiza konformacijskih polimorfizmov enoverižnih DNA (SSCP), gelska elektroforeza z gradientom denaturanta (DGGE) ter uporaba alelna specifičnih oligonukleotidov (ASO) (24, 25). Tehnologija prihodnosti pa je zagotovo tehnologija mikromrež (Microarray), ki omogoča analizo tudi več tisoč polimorfizmov hkrati (26).

2 NAMEN DELA

Pred nekaj leti odkriti protein sklerostin je inhibitor signalne poti Wnt/ β -katenin, ki je udeležena pri procesu tvorbe kostnine. Izguba funkcije sklerostina zaradi mutacij v genu za sklerostin (genu SOST) vodi v ekstremno povišanje kostne mase pri bolnikih s sklerosteozo, kar je dokaz za to, da sklerostin zavira tvorbo kostnine. Nasprotno kot pri bolnikih s sklerosteozo pa je pri bolnikih z osteoporozo problem zmanjšana tvorba kostnine. Delno zmanjšanje ekspresije gena SOST bi lahko imelo ugoden, anabolni učinek na tvorbo kostnine pri bolnikih z osteoporozo. Zato je bil gen SOST uvrščen med kandidatne gene za osteoporozo.

Do sedaj je bilo identificiranih 26 polimorfizmov v genu SOST. Največji vpliv na ekspresijo gena imajo najpogosteje polimorfizmi v promotorju gena, saj lahko spremenjeno zaporedje nukleotidov v promotorju spremeni vezavna mesta za transkripcijske faktorje. V okviru diplomske naloge bomo raziskali enega od polimorfizmov v promotorju gena SOST, in sicer polimorfizem -1397_-1396insGGA (27). V asociacijski študiji, v katero bo vključena slovenska populacija 718 zdravih preiskovancev ter preiskovancev z osteoporozo, bomo določili pogostost pojavljanja polimorfizma ter ovrednotili njegov klinični pomen.

S tem namenom bomo najprej s pomočjo verižne reakcije s polimerazo pomnožili del promotorja gena za sklerostin (od nukleotida -1468 do nukleotida -1367; GenBank, Acession Number AF326736) pri vseh preiskovancih. Pomnoženim odsekom DNA bomo nato določili genotip s pomočjo metode DHPLC, ki jo bomo pred tem še uvedli v laboratorij ter optimizirali za analizo. Na koncu pa bomo še statistično ocenili klinični pomen polimorfizma -1397_-1396insGGA, in sicer njegovo pogostost pri Slovencih, vpliv na vrednosti MGK, vpliv na koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije, DKK, OPG in RANKL ter vpliv na uspešnost zdravljenja osteoporoze z antiresorptivnima zdraviloma alendronatom ter raloksifenom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS PREISKOVANCEV TER MERITEV, KI SO BILE OPRAVLJENE PREDHODNO

Pogostost polimorfizma -1397_-1396insGGA gena za sklerostin smo določili pri slovenski populaciji 718 preiskovancev (601 ženska in 117 moških). Pri ugotavljanju povezanosti polimorfizma z MGK, biokemijskimi kazalci kostne remodelacije, DKK, OPG in RANKL pa smo preiskovance razdelili v naslednje skupine:

- vse preiskovanke skupaj (510),
- premenopavzne preiskovanke (59),
- zdrave pomenopavzne preiskovanke (222),
- pomenopavzne preiskovanke z osteoporozo (229),
- moški preiskovanci (117).

Klinični podatki preiskovancev so navedeni v prilogi 2.

Ocenili smo tudi vpliv polimorfizma na uspešnost zdravljenja pri dveh skupinah pomenopavznih osteoporoznih preiskovank. Skupina 52 preiskovank se je 1 leto zdravila z bifosfonatom alendronatom (Fosamax[®], 10 mg dnevno), kot dodatek pa so jemale še kalcij (500 mg dnevno) ter vitamin D3 (500 IU dnevno). Skupina 47 preiskovank pa se je 1 leto zdravila z raloksifenom (Evista[®], 60 mg dnevno), sočasno pa so jemale še kalcijev karbonat (1 g dnevno) ter vitamin D3 (400 IU dnevno).

Preiskovankam in preiskovancem so odvzeli kri za izolacijo DNA ter izmerili MGK na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Kliničnega centra v Ljubljani, v Splošni bolnišnici Celje in v Zdravilišču Dolenjske toplice (Ambulanta za osteoporozo). Genomska DNA preiskovancev je bila izolirana iz levkocitov periferne venske krvi z metodo izsoljevanja po Millerju (28). MGK so preiskovancem izmerili z dvoenergetsko rentgensko absorpciometrijo (angl. Dual Energy X-Ray Absorptiometry, DEXA) (1). MGK so določili v predelu vratu stegenice (del kolka), v celotnem predelu kolka ter v predelu ledvenih vretenc.

Biokemijski kazalci kostne remodelacije so bili izmerjeni predhodno na Kliniki za nuklearno medicino, Klinični center, Ljubljana. Serumsko koncentracijo alkalne fosfataze (ALP) so določili z rutinsko metodo z uporabo p-nitrofenilfosfata. Koncentracijo kostne alkalne fosfataze v serumu (BALP) so izmerili z radioimunološko metodo s pomočjo testa Tandem-R Ostase (Beckman Coulter). Serumsko koncentracijo prečno povezanih C-terminalnih telopeptidov kolagena I (CTX) je bila izmerjena z encimskoimunsko metodo po navodilih testa Serum CrossLaps (Osteometer Bio Tech). Koncentracijo deoksipiridinolina (Dpd) v urinu so merili z encimskoimunsko metodo s testom Pyrilinks-D (Metra Biosystems). Koncentracijo plazemskega osteokalcina (OC) so določili s pomočjo dveh metod: pri osteoporoznih bolnicah, zdravljenih z alendronatom, so uporabili radioimunološko metodo (test ELSA-Osteo, CIS Bio International), pri ostalih preiskovancih pa kemiluminiscentno imunometrično metodo (test Immulite Osteocalcin, Diagnostic products Corporation).

Koncentracija Dickkopf (DKK) je bila izmerjena z imunometrično metodo ELISA (Biochemica GmbH, Dunaj, Avstrija). Koncentracijo celotnega serumskega osteoprotegrina (OPG) so izmerili z encimskoimunsko metodo po navodilih testa Human Osteoprotegrin ELISA (Biochemica GmbH, Dunaj, Avstrija). Serumsko koncentracijo RANKL pa je bila izmerjena z encimskoimunskim testom sRANKL ELISA (Biochemica GmbH, Dunaj, Avstrija).

3.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR REAKCIJA)

S PCR reakcijo smo pomnožili 102 bp (ob prisotnosti insercije GGA 105 bp) dolg DNA odsek v promotorju gena za sklerostin (slika 7). Preučevani polimorfizem -1397_-1396insGGA se nahaja 1396 nukleotidov pred začetkom eksone 1 gena za sklerostin.

```

10321 ggaggctgga gggatcataga caaggggagg tggatgaggag ggccagcttc tcacaacact
10381 accggctctg ctgggagaga tagatcacc ccaacaatgg ccacagctgt tttcatctgc
10441 cctgaaggaa actgacttag gaagcaggta tcagagaggg cccttctga gggggcttct
10501 gtctggcttg taaaactgtc agagcagctg cattcatgtg tcggatgatg gatgatggaa
10561 agga*cagtcg gctgcagatg gacacagcga cttgcaagtt gaggcaggtg gcaaaggact
10621 tgcagaggct ctgcaggtgg ggcattgctga ttcattgccc agttaaata ccagaggatc
10681 tgggcagcct ctccacagga gctgcttctc ctcaacaat ctgtcttcaa tgaaagattc

```

Slika 7: Zaporedje nukleotidov v delu promotornega gena za sklerostin, ki vsebuje preučevani polimorfizem (GenBank, Accession Number AF326736); podčrtano – s PCR reakcijo pomnožen odsek DNA, senčeno – odseka, na katera se prilegata oligonukleotidna začetnika SOST-F (18 bp) in SOST-R (20 bp), * - mesto, kjer se pojavi polimorfizem -1397_-1396insGGA (13).

3.2.1 Priprava reakcijske zmesi

Reakcijsko zmes za PCR reakcijo smo pripravili v komori za PCR. V eni seriji smo v epruveti (500 µl) najprej pripravili skupno reakcijsko zmes za 10 vzorcev in slepi vzorec (namen slepega vzorca je potrditi, da med delom ni prišlo do kontaminacije), ki vsebuje vse reagente razen DNA vzorca (preglednica IV). Potem smo v vsako od označenih 11 epruvet (200 µl) dodali 23,75 µl skupne reakcijske zmesi, v 10 epruvet dodali še po 1,25 µl DNA ter v slepi vzorec 1,25 µl ultra čiste vode. Po končanem pipetiranju smo epruvete dobro zaprli, premešali reakcijsko zmes in na koncu centrifugirali (10000 obratov/min, 30 s).

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi PCR za en vzorec.

reagenti	volumen (µl)
10X PCR Gold pufer	2,5
dNTP (2 mM)	2,5
SOST-F (5 µM)	1,875
SOST-R (5 µM)	1,875
MgCl ₂ (25 mM)	2
H ₂ O (ultra čista)	12,875
Taq polimeraza (5 U/ µl)	0,125
DNA	1,25
	$\Sigma = 25 \mu\text{l}$

Reagenti:

- 10X PCR Gold pufer (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA)
- 2 mM delovna raztopina dNTP, pripravljena iz 100 mM osnovnih raztopin dATP, dGTP, dCTP, dTTP (PCR Markers G316A, Promega Corporation, Madison, WI, ZDA). Priprava: V epruveto odpipetiramo 10 µl vsake od osnovnih raztopin in dodamo 460 µl ultra čiste vode, sterilizirane z avtoklaviranjem.
- 25 mM raztopina MgCl₂ (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA)
- 5 µM delovna raztopina istosmernega oligonukleotidnega začetnika SOST-F, pripravljena iz 100 µM osnovne raztopine z redčenjem 1:20 (Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Nemčija):
nukleotidno zaporedje: 5'-GGGCTTCTGTCTGGCTTG-3' (T_m = 62,18 °C)
- 5 µM delovna raztopina obratnosmernega oligonukleotidnega začetnika SOST-R, pripravljena iz 100 µM osnovne raztopine z redčenjem 1:20 (Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Nemčija):
nukleotidno zaporedje: 5'-CAAGTCGCTGTGTCCATCTG-3' (T_m = 62,45 °C)
- ultra čista voda (aparatus ELGA, Purelab Classic, Ransbach-Baumbach, Nemčija), sterilizirana z avtoklaviranjem
- AmpliTaq Gold[®] DNA polimeraza, 5 U/µl (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA)
- delovne raztopine DNA, predhodno pripravljene z redčenjem osnovnih izolatov 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 ali 1:100 glede na izmerjeno koncentracijo DNA v osnovnem izolatu (med 250 in 2400 µg/ml)

Pribor in aparature:

- 200 µl in 500 µl epruvete, sterilizirane z avtoklaviranjem
- polavtomatske pipete 0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl
- nastavki za pipete, sterilizirani z avtoklaviranjem
- avtoklav A-21 (Kambič, Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija)
- centrifuga/vortex Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija)
- komora za PCR z UV lučko (BioSan, Riga, Latvija)

Opozorila:

→ Pred pripravo reakcijske zmesi očistimo delovne površine v komori za PCR ter ves pribor, ki ga bomo uporabili (polavtomatske pipete, stojala za epruvete, vsebnike z nastavki za pipete ter stekleničke z epruvetami) s 3 % hipokloritom in prižgemo UV-lučko ($\lambda = 254 \text{ nm}$) za 15 min! Tudi epruvete z ostalimi reagenti, ki jih kasneje vnašamo v komoro, predhodno očistimo s 3 % hipokloritom. Tako se izognemo kontaminaciji in s tem nastanku lažno pozitivnih rezultatov.

→ Vedno uporabljamo sveže rokavice in haljo, namenjeno pripravi reakcijske zmesi za PCR!

→ DNA vzorce hranimo v hladilniku pri 4 °C, reagente pa v zmrzovalniku pri – 20 °C .

→ Encim *Taq* DNA polimerazo vzamemo iz zmrzovalnika tik prek uporabo in ga takoj po uporabi damo spet nazaj v zmrzovalnik! Tako omogočimo optimalno delovanje encima skozi daljše časovno obdobje.

3.2.2 Potek PCR reakcije

Epruvete s pripravljenimi reakcijskimi zmesmi smo vstavili v ciklični termostat. Na podlagi programa, ki ga predhodno vnesemo, ciklični termostat v določenih časovnih intervalih spreminja temperaturo in s tem omogoči pomnožitev zelenega odseka. Program PCR reakcije prikazuje preglednica V. PCR reakcija je za posamezno serijo trajala 1 h in 35 minut. Reakcijske zmesi s PCR produkti smo nato do nadaljne uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Preglednica V: Program PCR reakcije.

	temperatura (°C)	trajanje	
začetna denaturacija	95 °C	10 min	
denaturacija	95 °C	30 s	x 30
prileganje	58 °C	30 s	
podaljševanje	72 °C	30 s	
končno podaljševanje	72 °C	8 min	
inkubacija	4 °C	∞	

Aparatura:

- ciklični termostat 2720 (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)

3.2.3 Preverjanje uspešnosti PCR reakcije z agarozno gelsko elektroforezo

Po končani PCR reakciji smo preverili njeno uspešnost s pomočjo elektroforeze na 2 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom (EtBr). Agarozna gelska elektroforeza je separacijska metoda, ki omogoča ločevanje molekul RNA in DNA. Molekule se ločujejo samo na osnovi velikosti, saj je razmerje med nabojem in dolžino nukleinske kisline pri vseh molekulah enako (20). S pomočjo elektroforeze smo lahko PCR reakcijo ovrednotili tako v kvalitativnem smislu (določitev velikosti odseka DNA) kot tudi v kvantitativnem smislu (ocena količine pomnoženega odseka).

Opozorilo:

→ Pri rokovanju z EtBr je potrebna posebna previdnost, ker je mutagen in toksičen. Uporaba nitrilnih rokavic je nujna, ker rokavice iz lateksa ne nudijo zadostne zaščite. EtBr tudi hitro razpade na svetlobi, zato je potrebno izpostavitvev agaroznega gela svetlobi zmanjšati na minimum.

Priprava 2 % agaroznega gela z EtBr

V erlenmajerico smo zatehtali 1,5 g agaroze ter dodali 75 ml 1xTAE pufra. Erlenmajerico z agarozo in pufrom smo starirali ter jo nato pokrili z urnim steklom. Zmes smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler ni nastala popolnoma bistra raztopina. Erlenmajerico z raztopino smo potem postavili nazaj na tehtnico ter nadomestili izparelo količino raztopine z destilirano vodo. V digestoriju smo nato dodali 4 μ l EtBr, dobro premešali ter počakali 5-10 minut, da se je raztopina ohladila na približno 60 °C. Ohlajeno raztopino smo nato v digestoriju vlili v predhodno pripravljeni nosilec za vlivanje gela z že vstavljenima glavničkoma za tvorbo žepkov v gelu (vsak glavniček omogoči nastanek 30 žepkov v agaroznem gelu). Nosilec za gel smo zaščitili pred svetlobo ter počakali 30 minut, da se je gel strdil. Nato smo previdno odstranili glavnička, gel iz nosilca prenesli v plastično vrečko ter do uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C.

Reagenti:

- agarosa (Agarose for routine use, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Nemčija)
- 1xTAE pufer, pripravljen z 1:50 redčenjem 50xTAE pufra (sestava 50xTAE pufra: 242.0 g Tris baze, 57.1 g 100 % očetne kisline, 100 ml 0.5 M Na₂EDTA s pH 8.0, bidestilirana voda ad 1000 ml)
- destilirana voda
- etidijev bromid, 10 mg/ml (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Nemčija)

Pribor in aparature:

- 200 ml erlenmajerica
- Tehnica EXACTA 300 EB (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- 100 ml merilni valj
- urno steklo
- mikrovalovna pečica
- polavtomatska pipeta 2-20 µl
- nastavek za pipeto
- nosilec za vlivanje gela (10 cm x 15 cm)
- glavniček za tvorbo 30 žepkov v gelu
- digestorij

Potek agarozne gelske elektroforeze

Agarozni gel smo potopili v elektroforezno kadičko, napolnjeno z 1xTAE pufrom. V žepke smo nanesti PCR marker (služi za potrditev velikosti odseka, ki smo ga pomnožili), PCR produkte in slepi vzorec (na parafilmu smo pred tem 2 µl vsake od zgoraj naštetih raztopin pomešali z 2 µl nanašalnega pufra). Nanašalni pufer vsebuje barvilo ksilen cianol, ki olajša nanašanje vzorcev v žepke ter omogoča spremljanje hitrosti potovanja v električnem polju, saj potuje z določeno hitrostjo proti anodi. Nanašalni pufer pa vsebuje tudi glicerol, ki poveča gostoto vzorca ter omogoči vsedanje vzorca v žepke gela. Po nanosu smo preverili, ali gel v kadički stoji vodoravno in ali je v celoti potopljen v 1xTAE pufri ter kadičko spet zaščitili pred svetlobo. Elektroforeza je potekala 20 minut pri konstantni napetosti 90 V.

Reagenti:

- 1xTAE pufer
- nanašalni pufer ksilen cianol (priprava: natehtamo 0,025 g ksilen cianola, 3,87 g glicerola in dodamo 7 ml destilirane vode)
- PCR marker, ki vsebuje DNA odseke dolžin 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 baznih parov (PCR Markers G316A, Promega Corporation, Madison, WI, ZDA)

Pribor in aparature:

- elektroforezna kadička Wide Mini-Sub Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA)
- usmernik Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA)
- polavtomatska pipeta 2-20 µl
- nastavki za pipete, sterilizirani z avtoklaviranjem
- parafilm

Detekcija PCR produktov na agaroznem gelu

Po končani elektroforezi smo agarozni gel prenesli v komoro dokumentacijskega sistema za slikanje gelov ter detektirali fluorescenco v gel vgrajenega EtBr pri valovni dolžini 302 nm (EtBr fluorescira približno 20x močnejše po interkalaciji med bazne pare DNA molekule). S tem je mogoča lokalizacija DNA odsekov na agaroznem gelu ter posledično ovrednotenje uspešnosti PCR reakcije.

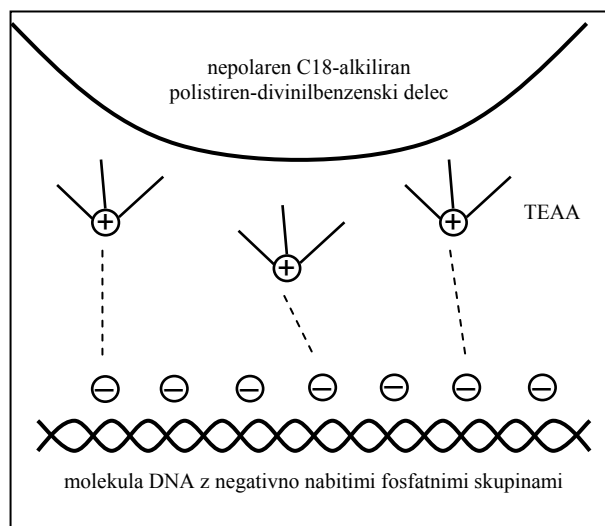
Aparatura:

- dokumentacijski sistem za slikanje gelov UVI tec in program UVI Photo

3.3 DENATURACIJSKA VISOKOLOČLJIVOSTNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (DHPLC)

Za analizo s PCR pomnoženih odsekov DNA smo uporabili sistem WAVE[®] (Transgenomic), ki je popolnoma avtomatiziran ter deluje na principu reverzno-fazne ionsko-izmenjevalne tekočinske kromatografije. Nepolarno stacionarno fazo v separacijski

koloni predstavljajo C18-alkilirani polistiren-divinilbenzenski delci, ki omogočajo analizo v širokem območju pH in temperature (40 do 80 °C). Pozitivno nabiti reagent, trietilamonijev acetat (TEAA), omogoča vezavo negativno nabite molekule DNA na nepolarno stacionarno fazo (slika 8). Z naraščanjem deleža organske mobilne faze (acetonitril) se odsek DNA nato eluira iz kolone glede na velikost (nedenaturacijski pogoji) ali glede na sekvenco in velikost (denaturacijski pogoji). Mi smo analizo izvedli pri nedenaturacijskih pogojih.



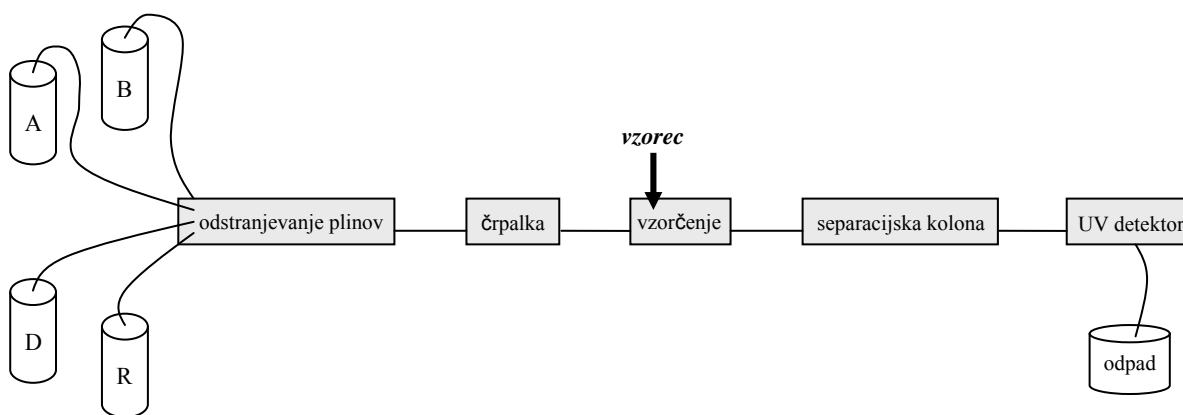
Slika 8: Princip vezave molekule DNA na stacionarno fazo sistema WAVE®.

3.3.1 Priprava mikrotitrne ploščice za analizo

Po 12 µl PCR produkta smo nanegli na mikrotitrsko ploščico, ki ima 96 vdolbinic. Prvih 5 vdolbinic smo vedno pustili praznih in so služile za ekvibracijo aparature DHPLC. V šesto vdolbinico smo nato nanegli 10 µl standardne raztopine, sestavljene iz zmesi odsekov DNA različnih dolžin (DNA Sizing standard). Standardna raztopina omogoči določitev velikosti analiziranih odsekov DNA. V ostalih 90 vdolbinic smo nato nanegli PCR produkte. Po končanem pipetiranju smo mikrotitrsko ploščico pokrili s pokrovom za mikrotitrsko ploščico ter kratko centrifugirali, da smo odpravili morebitne kapljice na stenah vdolbinic ter zračne mehurčke, ki bi lahko motili DHPLC analizo. Pokrito mikrotitrsko ploščico smo nato položili na nosilec za mikrotitrne ploščice, ki je del aparature DHPLC. Nosilec je konstantno hlajen in tako prepreči izparevanje vzorcev, ki čakajo na analizo.

3.3.2 Priprava aparature DHPLC za analizo

Pripravo sistema WAVE[®] za analizo smo izvedli v skladu s standardnim operativnim postopkom (SOP) za DHPLC (Transgenomic). Preverili smo, ali količina pufrov zadostuje za izvedbo analize (slika 9). Preverili smo tudi nivo odpadnih pufrov, odstranili morebitne zračne mehurčke v kolonicah ter sprali iglo. Na koncu smo izvedli še ekvilibracijo kolone s 50 % pufra A ter 50 % pufra B, ki je trajala 30 min pri pretoku 0,9 ml/min.



Slika 9: Shematski prikaz komponent sistema WAVE[®]; A – pufer A , B – pufer B, D – raztopina D, R – raztopina za spiranje igel.

3.3.3 Potek analize DHPLC

Z optimizacijo metode smo dosegli pogoje, potrebne za določitev genotipa našega polimorfizma. PCR produkte, ki se razlikujejo za 3 bazne pare, smo ločevali po dolžini, zato smo uporabili linearni gradient za elucijo DNA odsekov iz kolone. Pri linearnem gradientu se razmerje med pufroma A in B konstantno spreminja, in sicer s časom narašča količina pufra B, ki vsebuje acetonitril ter omogoči postopno eluiranje DNA odsekov iz kolone. Krajši odseki se eluirajo hitreje, daljši pa kasneje, ker tvorijo proporcionalno več interakcij s stacionarno fazo.

Pri analizi vsakega vzorca pride najprej do injiciranja vzorca (PCR produkta) v kolono, potem sledi gradientno eluiranje vzorca iz kolone s spreminjanjem razmerja pufrov A in B pri pretoku 0,9 ml/min. Po končani eluciji se kolona še očisti ter ekvilibrira za analizo naslednjega vzorca. Potek analize pri že optimiziranih pogojih prikazuje preglednica VI.

Preglednica VI: Potek analize DHPLC.

proces	čas (min)	% pufra A	% pufra B
injiciranje	0	65	35
začetek gradienta	0,5	60	40
konec gradienta	7	43,7	56,3
začetek čiščenja	7,1	65	35
konec čiščenja	7,6	65	35
začetek ekvilibracije	7,7	65	35
konec ekvilibracije	8,1	65	35

Analiza posameznega vzorca je trajala 9,4 minute. Pri tem je bila temperatura grelca konstantna (50 °C). Med procesom elucije je delež pufra B naraščal s hitrostjo 2,5 % na minuto. Volumen posameznega, v kolono injiciranega vzorca je bil 8 µl. DNA odseke smo po ločitvi v koloni detektirali s pomočjo UV detekcijskega sistema pri valovni dolžini 260 nm (DNA absorbira UV svetlobo pri tej valovni dolžini).

Opozorilo:

→ Pri rokovanju s pufri za DHPLC analizo, še posebej pri pufrih, ki vsebujejo acetonitril, je nujna uporaba rokavic. Acetonitril je toksičen ob inhaliranju in ob stiku s kožo.

Reagenti:

- WAVE[®] DNA Sizing standard, ki vsebuje DNA odseke dolžin 80, 102, 174, 257, 267, 298, 434, 458 in 587 bp (Transgenomic Inc, Omaha, ZDA)
- pufer A (WAVE[®] Optimized Buffer A): 0,1 M trietilamonijev acetat (TEAA), raztopina v vodi, pH 7 (Transgenomic Ltd, Elancourt, Francija)
- pufer B (WAVE[®] Optimized Buffer B): 0,1 M TEAA, raztopina v vodi, 25 % acetonitril, pH 7 (Transgenomic Ltd, Elancourt, Francija)
- raztopina D (WAVE[®] Optimized Solution D): 25 % voda, 75 % acetonitril (Transgenomic Ltd, Elancourt, Francija)
- raztopina za spiranje igel (WAVE[®] Optimized Syringe Wash Solution): 96 % voda, 4 % acetonitril (Transgenomic Ltd, Elancourt, Francija)

Pribor in aparature:

- mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami (Thermo Scientific, UK)
- pokrov za mikrotitrne ploščice
- DHPLC aparatura: WAVE[®] 3500 DNA Fragment Analysis System model 3500 z grelcem L7300+, separacijsko kolono DNASep[®] ter s programsko opremo Navigator[™] Software (Transgenomic Inc, Omaha, ZDA)
- nastavki za pipete, sterilizirani z avtoklaviranjem
- centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- polavtomatske pipete

3.4 SEKVENČNA ANALIZA**3.4.1 Priprava vzorcev za sekvenčno analizo**

Izmed vzorcev, katerim smo z metodo DHPLC določili genotipe, smo naključno izbrali 3 vzorce z različnimi genotipi, torej z genotipi ins -/- (vzorec št. 39opg), ins -/+ (vzorec št. 8opg) ter ins +/+ (vzorec št. 49opg). Za izbrane vzorce smo še enkrat ponovili PCR reakcijo po že opisanem postopku, s to razliko, da je bil končni volumen reakcijske zmesi za posamezen vzorec 50 µl. Uspešnost PCR reakcije smo preverili na agaroznem gelu.

PCR produkt mora biti čimbolj čist (neporabljeni oligonukleotidni začetniki, DNA polimeraza, soli, dNTP ter genomska DNA motijo sekvenčno analizo). Zato smo PCR produkte pred samo sekvenčno analizo očistili. Reakcijsko zmes smo nanjali na kolono, pri tem se PCR produkt adsorbira na membrano iz silikagela. Nečistoče smo sprali z ustreznimi raztopinami, na koncu pa eluirali PCR produkt z vodo. Za čiščenje smo uporabili komplet Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Po čiščenju smo za vsak vzorec pripravili dve raztopini s PCR produktom (torej skupno 6 raztopin). V eno epruveto smo odpipetirali 20 µl raztopine PCR produkta ter 4 µl oligonukleotidnega začetnika SOST-F, v drugo epruveto pa 20 µl raztopine PCR produkta in 4 µl oligonukleotidnega začetnika SOST-R.

3.4.2 Izvedba sekvenčne analize

Sekvenčno analizo je izvedlo podjetje MWG Biotech (Ebersberg, Nemčija) z Value Read Service. Pri sekvenčni analizi so uporabili avtomatizirano metodo po Sangerju (določitev nukleotidnega zaporedja s pomočjo fluorescentno označenih dideoksinukleozid trifosfatov). Vsak vzorec je bil analiziran dvakrat: enkrat z uporabo istosmernega oligonukleotidnega začetnika SOST-F, drugič pa z uporabo obratnosmernega oligonukleotidnega začetnika SOST-R.

3.5 STATISTIČNE METODE

Klinični pomen polimorfizma -1397_-1396insGGA smo ovrednotili s pomočjo naslednjih statističnih testov:

- normalnost porazdelitve posameznih spremenljivk smo testirali s testom Kolmogorov-Smirnov,
- test χ^2 smo uporabili za primerjanje porazdelitve genotipov med skupinami preiskovancev,
- za ugotavljanje razlik v vrednosti MGK med različnimi genotipskimi skupinami smo uporabili test ANCOVA (analiza kovariance),
- za ugotavljanje razlik v vrednostih biokemijskih kazalcev kostne remodelacije ter DKK, OPG in RANKL med posameznimi genotipskimi skupinami smo uporabili test ANOVA (analiza variance) pri normalni porazdelitvi, pri nenormalni porazdelitvi pa test Kruskal-Wallis,
- za oceno vpliva polimorfizma na uspešnost zdravljenja z alendronatom ter raloksifenom smo uporabili test ANOVA pri normalni porazdelitvi spremenljivk, pri nenormalni porazdelitvi pa test Kruskal-Wallis.

Pri vseh testih smo kot statistično značilno opredelili vrednost $p \leq 0,05$.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški programski paket SPSS 15.0 for Windows, INC, USA.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA POGOJEV PCR REAKCIJE

Pogoje PCR reakcije je vedno potrebno določiti eksperimentalno. Pri optimizaciji pogojev pa smo morali upoštevati še zahteve, povezane z nadaljno DHPLC analizo PCR produktov. V pomoč pri določitvi pogojev ter količine reagentov PCR reakcije sta nam bila v pomoč Priročnik za uporabo PCR ter navodila SOP za sistem WAVE[®] (21, 23).

Komponente reakcijske zmesi

Prvi korak pri načrtovanju PCR reakcije je bila izbira oligonukleotidnih začetnikov. Pri tem smo poskušali izbrati take začetnike, ki bi pomnožili čim krajši DNA odsek, ki vsebuje preučevani polimorfizem -1397_-1396insGGA v promotorju gena SOST. Kratki DNA odseki (v našem primeru 102 bp oz. 105 bp) imajo to prednost, da se pri DHPLC analizi hitreje eluirajo iz kolone - s tem je čas analize krajši. Pri določitvi sekvence ter dolžine začetnikov smo si pomagali s programom OligoAnalyzer 3.0 (29). Izbrali smo 18 bp dolg istosmerni začetnik SOST-F z nukleotidnim zaporedjem 5'-GGGCTTCTGTCTGGCTTG-3' ($T_m = 62,18$ °C, vsebnost baz GC je 61 %) ter 20 bp dolg obratnosmerni začetnik SOST-R z nukleotidnim zaporedjem 5'-CAAGTCGCTGTGTCCATCTG-3' ($T_m = 62,45$ °C, vsebnost baz GC je 55 %).

Uspešnost PCR reakcije je v veliki meri odvisna tudi od kakovosti ter koncentracije DNA. Pri nadaljnji DHPLC analizi PCR produktov pa lahko raztopina DNA, ki vsebuje nečistoče, poškoduje kolono, čeprav predstavlja majhen delež v skupni PCR reakcijski zmesi. Proizvajalec DHPLC aparature priporoča ekstrakcijo DNA z metodo izsoljevanja, ki je bila uporabljena tudi pri ekstrakciji DNA, ki smo jo uporabili.

Pri izbiri DNA polimeraze smo morali upoštevati tudi njeno kompatibilnost s separacijsko kolono sistema WAVE[®]. Transgenomic zagotavlja optimalno delovanje ob uporabi polimeraze Optimase[®], ki je kompatibilna z sistemom WAVE[®] ter hkrati sintetizira DNA odseke z veliko natančnostjo. Mi smo uporabili *Taq* polimerazo, ki je cenejša in tudi kompatibilna z WAVE[®] sistemom, dela pa več napak pri sintezi. Za *Taq* polimerazo smo se

odločili tudi zato, ker smo DNA odseke ločevali po velikosti in ne pod denaturacijskimi pogoji (ločevanje DNA odsekov na podlagi razlike v sekvenci).

Tudi ostale komponente PCR reakcijske zmesi lahko vplivajo na kakovost DHPLC analize. Številne PCR komponente povzročijo zmanjšanje resolucije in/ali poškodbo separacijske kolone, zato se moramo uporabiti le-teh izogniti. V PCR reakcijski zmesi ne smejo biti prisotni: voda, sterilizirana z avtoklaviranjem, goveji serumski albumin, mineralna olja, proteinaza K, vprašljiva pa je tudi uporaba nedefiniranih stabilizatorjev ali aditivov. Visokomolekularni stabilizatorji (polietilenglikol) ter detergenti (Triton X100, Tween20) ne smejo preseči končne koncentracije 1 % v reakcijski zmesi. Končna koncentracija glicerola je lahko 2 %, DMSO 10 % ter betaina 2.5 M. Naštete sestavine so lahko prisotne v PCR pufri, raztopini, kjer je shranjen encim ali dNTP-ji, zato smo preverili sestavo vseh raztopin, ki smo jih pri PCR reakciji uporabili ter ugotovili, da ustrezajo zahtevam.

Optimizacija sestave reakcijske zmesi ter pogojev PCR reakcije

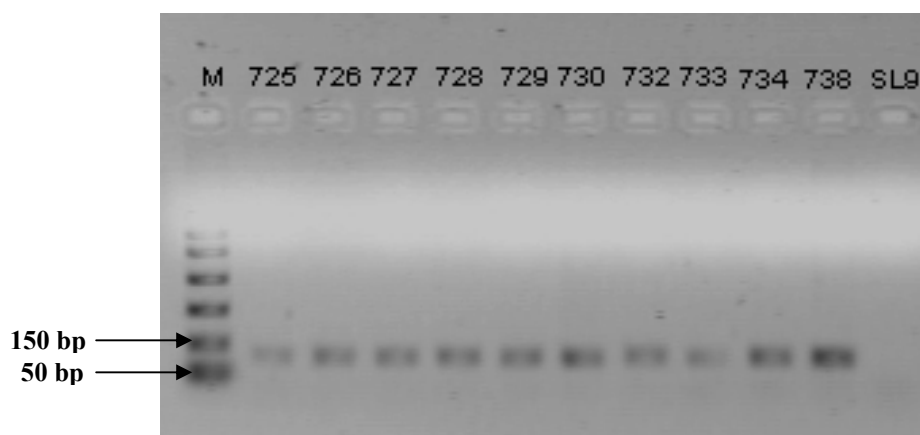
Namen PCR reakcije je bil pomnožitev odseka promotorja gena SOST od nukleotida -1468 do nukleotida -1367. Doseči smo hoteli čim večjo specifičnost PCR reakcije, saj bi lahko nespecifični produkti motili nadaljno DHPLC analizo. Med procesom optimizacije PCR reakcije smo spreminjali naslednje parametre: koncentracijo $MgCl_2$, število ciklov ter temperaturo prileganja začetnikov.

Pri prvi PCR reakciji smo uporabili različne koncentracije $MgCl_2$ z namenom določiti optimalno koncentracijo $MgCl_2$ za delovanje *Taq* polimeraze. Reakcijsko zmes (20 μ l) so poleg raztopine $MgCl_2$ ter vode sestavljali še: 2 μ l 10X PCR pufra, 2 μ l dNTP, 1.5 μ l SOST-F, 1.5 μ l SOST-R, 0.1 μ l *Taq* polimeraze ter 1 μ l DNA. Potek PCR reakcije pa je bil sledeči: začetna denaturacija pri 95 °C 10 min, potem 40 ciklov z začetno denaturacijo (95 °C, 30 s), prileganjem začetnikov (50 °C, 30 s) ter podaljševanjem (72 °C, 30 s), potem pa še končno podaljševanje 8 min pri 72 °C. Ločevanje z agarozno gelsko elektroforezo je trajalo 15 min pri 90 V. Rezultat prikazuje slika 10.



Slika 10: Rezultat prve PCR reakcije; M - DNA marker; konc. MgCl₂: 1 mM (št.1), 2 mM (št. 2), 3 mM (št. 3), 4 mM (št. 4), 2 mM (SL).

Zaradi prevelikega števila ciklov (40) ter zaradi bistveno prenizke T prileganja (50 °C) je pri PCR reakciji nastalo izredno veliko nespecifičnih produktov. Zato smo se odločili ponoviti PCR reakcijo pod ostrejšimi pogoji z namenom zmanjšanja nastanka nespecifičnih produktov: število ciklov smo zmanjšali na 30 ter T prileganja povišali na 58 °C. Trajanje elektroforeze smo povišali na 20 min, da bi se DNA odseki DNA markerja še bolje ločili. Pri tej reakciji smo tako kot pri prvi reakciji uporabili štiri različne koncentracije MgCl₂. Pod spremenjenimi pogoji ni prišlo do nastanka nespecifičnih produktov, željeni PCR produkt pa se je pomnožil v zadostni količini. Z DNA markerjem smo lahko potrdili, da se je pomnožil okoli 100 bp velik odsek DNA. Pri drugi PCR reakciji pa smo lahko določili tudi optimalno koncentracijo MgCl₂ v reakcijski zmesi, in sicer 2 mM. Pod optimiziranimi pogoji smo nato pomnožili željen odsek DNA pri 718 vzorcih DNA (slika 11).



Slika 11: Rezultat PCR reakcije po končani optimizaciji; M – DNA marker, SL9 – slepi vzorec, številke označujejo analizirane vzorce.

Količina nastalega PCR produkta pri vseh vzorcih ni bila enaka (razlog je najverjetneje različna kakovost izhodne DNA). PCR produkte smo potem analizirali z DHPLC, ki je izredno občutljiva metoda in detektira tudi manjše količine PCR produkta (genotipizacija je bila možna pri vseh vzorcih na sliki 11). Zato je veliko bolj kot količina nastalega produkta (dosežena npr. s povečanjem števila ciklov) pomembna kakovost nastalega PCR produkta (s povečanjem števila ciklov se poveča tudi nastanek nespecifičnih produktov).

Pri 12 vzorcih DNA PCR produkt ni nastal ali pa je bil po naši oceni le prešibak za DHPLC analizo. Po vsej verjetnosti je bila pri teh vzorcih kakovost DNA v delovni raztopini slaba. Za te vzorce smo pripravili nove delovne raztopine ter PCR reakcijo ponovili pri spremenjenih pogojih, in sicer smo T prileganja začetnikov znižali na 57 °C, število ciklov pa povečali na 35. PCR reakcija je uspela pri 11 vzorcih. Pri vzorcu, kjer PCR produkt tudi pri spremenjenih pogojih ni nastal, pa smo izvedli sekundarno PCR reakcijo, kar pomeni, da smo pri PCR reakciji namesto delovne raztopine DNA uporabili enako količino PCR produkta iz prejšnje reakcije. Če pri prvi PCR reakciji nastane produkt, a je pod mejo detekcije na agaroznem gelu, se ta produkt v drugi PCR reakciji pomnoži v večji količini in ga lahko detektiramo. Pogoji sekundarne PCR reakcije so bili enaki kot pogoji reakcije za pomnožitev zadnjih 12 vzorcev. Pri sekundarni PCR reakciji je nastala zadostna količina PCR produkta.

S spreminjanjem sestave reakcijske zmesi ter pogojev PCR reakcije smo razvili PCR metodo, ki je omogočila pomnožitev željenega odseka promotorja gena SOST pri vseh 718 vzorcih DNA.

4.2 OPTIMIZACIJA POGOJEV IN REZULTATI DHPLC ANALIZE

Cilj diplomske naloge ni bil le določitev pogostosti ter kliničnega pomena polimorfizma -1397_-1396insGGA, ampak tudi uvedba sistema WAVE[®] (aparatura za izvedbo DHPLC analize) v laboratorij. Sistem WAVE[®] smo v laboratoriju uporabili prvič in z njim izvedli genotipizacijo vzorcev na podlagi ločevanja PCR produktov po dolžini (nedenaturacijski pogoji).

Pri analizi posameznega DNA odseka pride najprej do injiciranja vzorca v separacijsko kolono, potem sledijo: eluiranje odseka s kolone ob linearno naraščujoči koncentraciji acetonitrila (pufer B), čiščenje kolone ter ekvilibracija kolone. S pomočjo programske

opreme lahko definiramo trajanje in potek vseh štirih faz. Najpomembnejši za analizo je proces gradientnega eluiranja DNA odseka, kjer lahko opredelimo začetno razmerje med pufroma A in B (v našem primeru je bilo to razmerje vedno 60 % : 40 %), hitrost naraščanja koncentracije pufra B ter trajanje eluiranja.

Za prvo analizo smo izbrali pogoje, pri katerih smo pričakovali, da bomo lahko PCR produkt detektirali, torej precej dolgo fazo eluiranja. S tem smo hoteli preprečiti, da bi se analiza končala prej, kot bi DNA odsek sploh pripotoval do detektorja. Časovni potek analize ter spreminjanje razmerja pufrov A in B podaja preglednica VII. Med analizo je bila temperatura grelca 50 °C, volumen injiciranega vzorca 8 µl, pretok skozi kolono pa 0,9 ml/min. Delež pufra B je naraščal 1,4 % na minuto.

Preglednica VII: Potek analize DHPLC na začetku procesa optimizacije.

proces	čas (min)	% pufra A	% pufra B
injiciranje	0	65	35
začetek gradienta	1	60	40
konec gradienta	13	45,6	54,4
začetek čiščenja	13,1	65	35
konec čiščenja	13,6	65	35
začetek ekvilibracije	13,7	65	35
konec ekvilibracije	14,1	65	35

Pri prvi analizi je torej postopek injiciranja trajal 1 min, gradientno eluiranje 12 min, čiščenje 0,5 minute ter ekvilibracija 0,4 minute. Analiza enega vzorca je trajala skupno 15,4 minute. Čas, ki so ga odseki potrebovali, da so pripotovali do detektorja, je bil med 8,6 in 9,0 minutami. DNA odseki so se pod temi pogoji ločevali po dolžini, torej je bila določitev genotipa možna.

Naš cilj pa je bil pogoje analize tako optimizirati, da bi bil čas analize čim krajši ter s tem poraba reagentov čim manjša. Zato smo izvedli nadaljne tri analize (preglednica VIII).

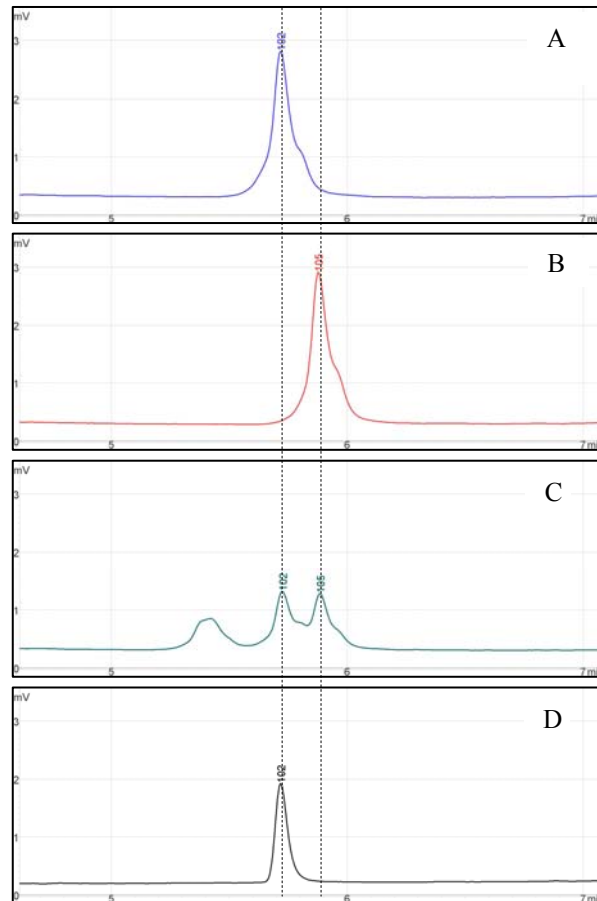
Preglednica VIII: Spremembe pogojev analize DHPLC med optimizacijo.

	hitrost naraščanja deleža pufra B	trajanje elucije
1. analiza	2 % / min	9,9 min
2. analiza	2,5 % / min	8,1 min
3. analiza	3 % / min	6,9 min

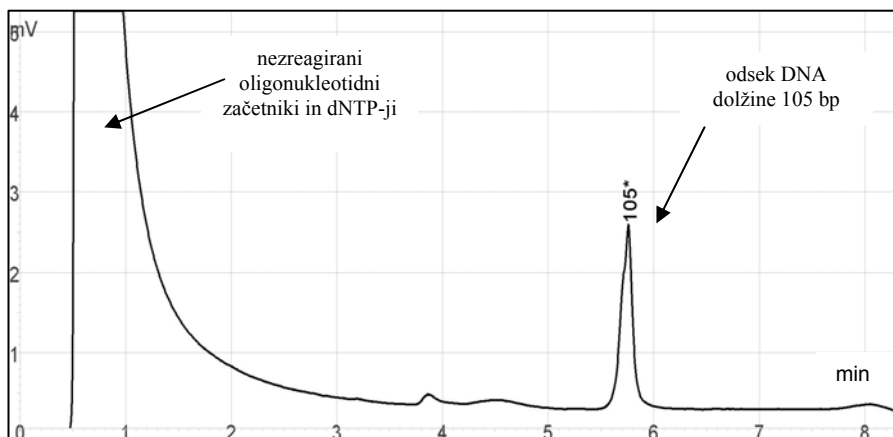
Pri tretji analizi so odseki pripotovali do detektorja z zelo majhno časovno razliko, kar bi lahko otežilo ločevanje odsekov po dolžini. Zato smo se odločili za analizo vzorcev pri pogojih druge analize iz preglednice VIII, kjer je bila ločitev odsekov po dolžini možna. Pri teh pogojih so odseki pripotovali do detektorja po najkasneje 6 minutah. Z namenom skrajšanja analize smo potem trajanje elucije skrajšali na 6,5 minut (detekcija odsekov je še vedno možna, ker le-ti pripotujejo do detektorja prej, kot se konča elucija) ter skrajšali čas injiciranja iz 1 minute na 0,5 minute. Optimizirani pogoji DHPLC analize so navedeni v preglednici VI.

4.2.1 Določitev genotipa vzorcev

Uspelo nam je določiti genotip pri vseh 718 vzorcih DNA (genotipi vseh preiskovancev so navedeni v prilogi 1). DHPLC analiza nam je omogočila razlikovanje med tremi različnimi genotipi (slika 12). Genotip ins -/- (homozigot, PCR produkt je dolg 102 bp) se kaže kot enojen vrh s povprečnim retencijskim časom (t_R) okoli 5,78 min, genotip ins +/+ (homozigot s prisotnim polimorfizmom, PCR produkt je dolg 105 bp) pa kot enojen vrh s t_R 5,93 min. Pri heterozigotnem genotipu ins -/+ pa sta se pojavila dva pričakovana glavna vrhova (za 102 in 105 bp dolg DNA odsek), dodatno pa še levo od njiju manjši in širši vrh. Poleg opisanih vrhov se pri analizi posameznega vzorca vedno pojavi še visok vrh na začetku, ki predstavlja detektirane nezreagirane začetnike ter dNTP-je (slika 13).

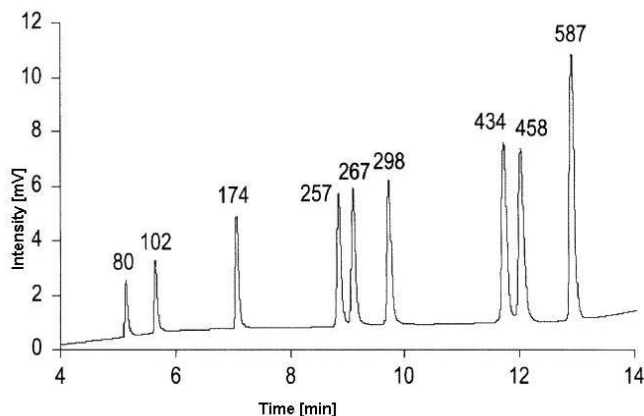


Slika 12: Kromatogrami treh vzorcev z različnimi genotipi ter 102 bp dolgega odseka DNA Sizing standarda; A – genotip ins $-/-$ (vzorec 23opg), B – genotip ins $+/+$ (13opg), C – genotip ins $-/+$ (40opg), D – DNA Sizing standard, števila nad posameznimi vrhovi odgovarjajo številu baznih parov posameznega odseka.



Slika 13: Primer kromatograma analize DHPLC.

Velikost DNA odsekov smo lahko določili s pomočjo DNA Sizing standarda, ki je potoval skozi kolono pod enakimi pogoji kot ostali vzorci (slika 14). S pomočjo programske opreme smo potem lahko iz podatkov o velikosti in t_R odsekov v standardu določili velikost analiziranim odsekom.



Slika 14: Kromatogram DNA Sizing standarda; sestavljajo ga odseki DNA dolžin 80, 102, 174, 257, 267, 298, 434, 458 ter 587 baznih parov.

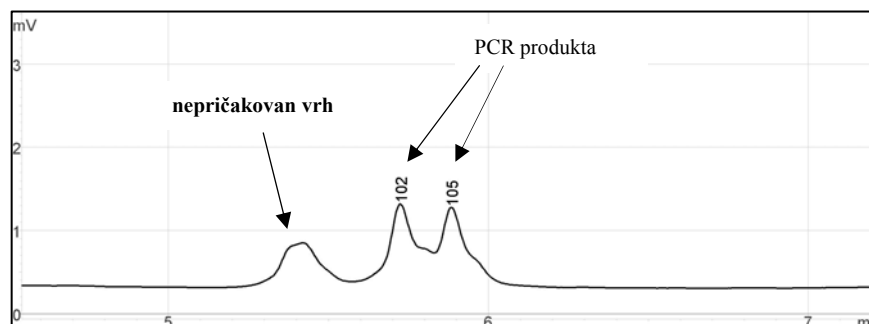
4.2.2 Analiza oblike kromatografskih vrhov

Višina vrhov je variirala, kar je posledica različne količine PCR produkta v injiciranem vzorcu. To smo tudi pričakovali. Presenetila pa nas je nesimetričnost vrhov. Kadar PCR reakcija poteče specifično (kar smo poskušali doseči z manjšim številom ciklov ter visoko T prileganja začetnikov), nastane samo en produkt, ki se pri DHPLC analizi pokaže kot simetričen vrh. To se v našem primeru ni zgodilo. Izključili smo možnost, da bi bila nesimetričnost posledica napak sistema WAVE[®] (npr. slaba kakovost ali poškodba separacijske kolone, temperatura grelca bi lahko variirala, neprimerni pufri ...). Pri DNA Sizing standardu (za kakovost PCR produktov garantira proizvajalec) so bili vrhovi posameznih DNA odsekov simetrični (slika 12. D), kar nam je dalo zagotovilo, da je delovanje sistema WAVE[®] primerno. Zato smo sklepali, da je razlog za nesimetričnost slabša kakovost naših PCR produktov.

Pri PCR reakciji smo uporabili encim AmpliTaq Gold[®] DNA polimeraza, ki pa nima sposobnosti kontrolnega branja. Polimeraze s sposobnostjo kontrolnega branja lahko popravljajo napake pri sintezi DNA odsekov (če se v verigo vgradi napačen nukleotid, encim to zazna in ga zamenja). Tako je natančnost delovanja takih encimov 3 do 6-krat

večja kot natančnost navadnih polimeraz. Za *Taq* polimerazo pa je poleg pomanjkanja sposobnosti kontrolnega branja značilno tudi, da včasih na 3' konec PCR produkta doda dATP. Tako je del PCR produkta za en nukleotid daljši, kar lahko zaradi visoke občutljivosti DHPLC analize tudi detektiramo kot nesimetričen vrh (21).

Pri osebah, kjer je polimorfizem -1397_-1396insGGA prisoten le v enem alelu (heterozigoti), pri PCR reakciji nastaneta dva produkta, dolga 102 bp in 105 bp. Na kromatogramu pa je viden še tretji vrh, ki se eluira nekoliko prej kot ostala dva in je tudi bolj razvlečen (slika 15). Razlog za pojav tega vrha je po vsej verjetnosti tvorba heterodupleksov. Analizo smo izvajali pri 50 °C in možno je, da se je že pri tej temperaturi del dvovijačnih DNA molekul (PCR produkti) razklenilo. Enovijačne molekule DNA so se potem povezale nazaj, vendar so pri tem nastali poleg homodupleksov (povezava dveh enakih enovijačnih DNA) tudi heterodupleksi (povezava ene 102 bp dolge enovijačne DNA s 105 bp dolgo enovijačno DNA, ki vsebuje insercijo GGA). Pri heterodupleksih pa prileganje verig ni bilo več popolno, kar spremeni lastnosti potovanja heterodupleksa v separacijski koloni. Zaradi nepopolnega prileganja je v stiku s kolono tudi nepolaren razklenjen del heterodupleksa, kar povzroči šibkejšo vezavo na TEAA ter hitrejšo elucijo heterodupleksa z acetonitrilom, ki ga potem pri DHPLC analizi detektiramo. Nastanek heterodupleksa je torej najverjetneje razlog za pojav nižjega in bolj razvlečenega vrha s krajšim t_R .



Slika 15: Kromatogram vzorca s heterozigotnim genotipom ins -/+.

4.2.3 Spremljanje tlaka v separacijski koloni

Ločevanje odsekov DNA v separacijski koloni poteka pod izredno visokimi tlaki. Konstanten tlak zagotavlja enake pogoje za analizo vseh vzorcev. Kadar tlak naraste, je to znak prisotnosti kontaminantov v koloni ali na filtru pred kolono, ki ovirajo normalen pretok skozi kolono. V takem primeru pride do spremembe hitrosti potovanja odsekov DNA ter zamika vrhov na kromatogramu. Tako je določitev genotipa onemogočena in analizo je potrebno ponoviti. Kadar pa tlak med analizo pade, je to znak prisotnosti zračnih mehurčkov v koloni. V tem primeru je potrebno zračne mehurčke odstraniti, analizo pa prav tako ponoviti.

Na začetku smo imeli z vzdrževanjem konstantnega tlaka probleme. Analiza prve mikrotitrskeske ploščice je potekala tekoče, pri analizi druge mikrotitrskeske ploščice pa je začel tlak že kar na začetku hitro naraščati do maksimalnega dovoljenega tlaka 2500 psi (1 psi \approx 6,9 kPa). Varovalni mehanizem WAVE[®] sistema je nato sam izklopil črpalko ter prekinil analizo. Razlog za strmo povečanje tlaka je bil po vsej verjetnosti prisotnost kontaminantov v PCR produktih, ki so se v koloni nabirali že med analizo prve mikrotitrskeske ploščice ter nato med analizo druge mikrotitrskeske ploščice. Kolono smo sprali z raztopino D (75 % acetonitril) pri povišani temperaturi 80 °C, pri spiranju pa smo usmerili pretok raztopine D v nasprotno smer (»Reverse Hot Wash«). Po spiranju se je tlak v koloni normaliziral ter omogočil nadaljevanje analize.

Strmo naraščanje tlaka smo hoteli pri nadaljnjih analizah preprečiti. Spremljali smo vrednosti tlaka: med analizo vzorcev pri pretoku 0,9 ml/min se je tlak gibal med 1200 in 1300 psi, po končani analizi, ko se pretok avtomatsko zmanjša na 0,05 ml/min, pa se je tlak gibal okoli 70 psi. Opazili smo, da že med analizo 90 vzorcev (1 mikrotitrskeska ploščica) tlak postopoma rahlo narašča, saj se v koloni in filtru postopoma kopičijo kontaminanti. Zato smo vsakič po analizi mikrotitrskeske ploščice izvedli »Hot Wash« (spiranje kolone z raztopino D pri 80 °C). Tako smo preprečili zamašitev kolone, zagotovili konstanten tlak ter s tem povečali kakovost ter ponovljivost analize. Redno spiranje kolone je potrebno tudi zaradi tega, ker se v njej konstantno odlagajo kontaminanti, tudi če je kakovost raztopin, ki so injicirane v kolono, dobra.

4.2.4 Problem ponovljivosti DHPLC analize

Med samo DHPLC analizo je kljub razmeroma konstantnemu tlaku še vedno prihajalo do premika posameznih vrhov v levo ali v desno ob normalnem poteku analize pri ostalih vzorcih (v takem primeru smo analizo ponovili). Ponavadi je do zamika prišlo na začetku analize, kar kaže na to, da separacijska kolona ni bila predhodno dovolj ekvilibrirana s slepimi vzorci.

Problem je bila tudi ponovljivost med analizami, še posebej med tistimi, ki smo jih izvajali ob različnih dnevih. Če primerjamo povprečno vrednost t_R 102 bp dolgih odsekov DNA pri različnih analizah, je bila razlika med analizami tudi do 0,5 minute. Razlogov za to je lahko več, vendar so po vsej verjetnosti za premike odgovorni pufri, s katerimi spiramo DNA odseke iz kolone (pufer A in B). Pufri vsebujejo hlapne substance in takoj, ko jih začnemo uporabljati, se začne zaradi izhlapevanja razmerje komponent v njih počasi, a konstantno spreminjati. Dlje so pufri v uporabi, bolj se razmerje spreminja, kar tudi povzroči različno hitro elucijo odsekov DNA iz kolone. Zaradi tega pride tudi do razlik v t_R . Proizvajalec svetuje le 14 dnevno uporabo enega pufera zaradi že zgoraj omenjenega izhlapevanja ter nevarnosti rasti mikrobov, če je pufer dlje časa v uporabi.

4.3 REZULTAT SEKVENČNE ANALIZE

Po določitvi genotipa vzorcev na prvi mikrotitrski ploščici s pomočjo DHPLC smo 3 različne vzorce, ki smo jim določili 3 različne genotipe, poslali na sekvenčno analizo. To smo storili z namenom, da se prepričamo, ali je bila določitev genotipa s HPLC pravilna. Rezultat sekvenčne analize je potrdil rezultate DHPLC analize: vzorec 39opg ne vsebuje polimorfizma -1397_-1396insGGA, pri vzorcu 8opg je polimorfizem prisoten v heterozigotni obliki, pri vzorcu 49opg pa v homozigotni obliki. Navedene tri vzorce smo pri nadaljnjih DHPLC analizah uporabili kot interne standarde, ki so nam bili v pomoč pri določitvi genotipa ostalih vzorcev.

4.4 KLINIČNI POMEN POLIMORFIZMA -1397_-1396insGGA

Geni, vpleteni v razvoj monogenih bolezni kosti, so potencialni kandidati za regulacijo kostne remodelacije tudi v splošni populaciji. Mutacije v genu za sklerostin (genu SOST) so odgovorne za monogeno bolezen sklerosteozo, za katero je značilna ekstremno povečana kostna masa. Nadaljne raziskave so dokazale, da protein sklerostin zavira tvorbo kostnine. Polimorfizmi v promotorju gena SOST bi lahko vplivali na izražanje gena zaradi eventuelne vezave transkripcijskih faktorjev, s tem pa bi posledično vplivali tudi na količino sklerostina. V okviru diplomskega dela smo želeli oceniti klinični pomen enega od teh polimorfizmov v promotorju gena SOST, in sicer polimorfizma -1397_-1396insGGA.

Ugotavljali smo razlike v pogostosti pojavljanja polimorfizma pri zdravih in osteoporoznih preiskovankah (statistični test χ^2). Ocenili smo tudi vpliv na mineralno gostoto kosti, ki je osnovni kazalec osteoporoze (test ANCOVA). Ugotavljali smo, ali polimorfizem vpliva na koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije (odražajo trenutno intenzivnost presnove v kosteh) in na koncentracijo nekaterih lokalnih dejavnikov, ki so prav tako kot protein sklerostin vpleteni v regulacijo kostne remodelacije (testa ANOVA in Kruskal-Wallis). Analizirali pa smo tudi morebiten vpliv polimorfizma na uspešnost zdravljenja osteoporoze z alendronatom in raloksifenom (testa ANOVA in Kruskal-Wallis).

Genotip smo določili vsem 718 preiskovankam in preiskovancem (priloga 1). 510 preiskovankam ter 117 preiskovancem so predhodno določili tudi mineralno gostoto kosti v predelu vratu stegenice (MGK_vs), v celotnem predelu kolka (MGK_cel) ter v predelu ledvenih vretenc (MGK_lv). Preiskovanke smo razdelili v tri podskupine: premenopavzne (59 preiskovank), zdrave pomenopavzne (222) ter pomenopavzne osteoporozne preiskovanke (229). Moški preiskovanci so predstavljali posebno skupino, ker je pri njih mehanizem nastanka osteoporoze drugačen kot pri ženskah. Klinični podatki za vse skupine preiskovancev so navedeni v prilogi 2.

Predhodno so bili izmerjeni tudi biokemijski kazalci kostne remodelacije, vendar število preiskovancev, ki jim je bil izmerjen določen biokemijski kazalec, variira. Koncentracija alkalne fosfataze (ALP) je bila izmerjena pri 51 preiskovankah, koncentracija kostne alkalne fosfataze (BALP) pri 209 preiskovankah, koncentracija C-terminalnega telopeptida kolagena (CTx) pri 232 preiskovankah in preiskovancih, koncentracija deoksipiridinolina (Dpd) pri 48 preiskovankah, koncentracija osteokalcina (OC) pa pri 269 preiskovankah in

preiskovancih. Naštete biokemijske kazalce smo uporabili kot kazalce kostne razgradnje (CTx, Dpd) ali kot kazalce kostne tvorbe (ALP, BALP, OC).

Zanimal nas je tudi vpliv polimorfizma na vrednosti nekaterih lokalnih dejavnikov (regulatorjev) kostne razgradnje, kot npr. vpliv na koncentracijo osteoprotegrina (OPG) ter vpliv na koncentracijo liganda receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANKL). OPG in RANKL nadzirata osteoklastogenezo. OPG je bil izmerjen pri 219, RANKL pa pri 244 preiskovankah in preiskovancih. Ocenili smo tudi vpliv polimorfizma na koncentracijo proteina Dickkopf (DKK), ki je bila določena pri 68 preiskovankah. DKK je prav tako kot protein sklerostin vpleten v regulacijo signalne poti Wnt/ β -katenin ter s tem v proces osteoblastogeneze. Tako sklerostin kot DKK sta ekstracelularna inhibitorja signalne poti Wnt/ β -katenin in povzročita zmanjšanje tvorbe kostnine, vendar se mehanizem njunega delovanja razlikuje.

Pred izvedbo nadaljnjih statističnih testov smo najprej preverili normalnost porazdelitve spremenljivk. Na podlagi normalnosti ali nenormalnosti porazdelitve se odločimo, kateri test bomo uporabili pri nadaljnji analizi. Parametrične teste uporabimo pri normalni porazdelitvi spremenljivk, medtem ko pri nenormalnosti porazdelitve uporabimo njihove neparametrične ekvivalente. Pri testiranju normalnosti porazdelitve smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test, kjer ničelna hipoteza predpostavlja normalno porazdelitev vsake posamezne spremenljivke. Pri nekaterih spremenljivkah smo ničelno hipotezo zavrgli ($p < 0,05$), torej se te spremenljivke ne porazdeljujejo normalno.

4.4.1 Pogostost polimorfizma -1397_-1396insGGA

Na podlagi določenega genotipa smo vse preiskovance razdelili v 3 različne genotipske skupine: ins -/-, ins -/+ ter ins +/+. Pogostost določenega genotipa pri posameznih skupinah preiskovancev prikazuje preglednica IX.

Vse skupine se nahajajo v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (HWE). HWE velja v veliki populaciji, kjer se osebki naključno razmnožujejo, kjer ni pozitivne ali negativne selekcije določenega genotipa, dodatnih mutacij in migracij. Po Hardy-Weinbergovem načelu se v taki populaciji pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja, kar lahko zaključimo tudi za naš polimorfizem v preiskovanih skupinah (30).

Preglednica IX: Pogostost genotipov pri posameznih skupinah preiskovancev.

skupina	ins -/- (%)	ins +/- (%)	ins +/+ (%)
vsi preiskovanci in preiskovanke (718)	42,2 (303)	45,7 (328)	12,1 (87)
vse preiskovanke (601)	41,4 (249)	46,1 (277)	12,5 (75)
premenopavzne preiskovanke (59)	39,0 (23)	50,8 (30)	10,2 (6)
zdrave pomenopavzne preiskovanke (222)	41,0 (91)	46,8 (104)	12,2 (27)
pomenopavzne osteoporozne preiskovanke (229)	39,3 (90)	46,7 (107)	14,0 (32)
moški preiskovanci (117)	46,2 (54)	43,6 (51)	10,3 (12)

* Vrednost v oklepaju je število preiskovancev v določeni skupini.

Najbolje lahko klinični pomen in vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na pojavnost osteoporoze ovrednotimo s primerjavo zdravih in osteoporoznih pomenopavznih preiskovank. Pogostost genotipov pri teh dveh skupinah preiskovank smo primerjali s testom χ^2 . Ničelna hipoteza predpostavlja enakost v pogostosti genotipov pri obeh skupinah preiskovank. Hipoteze pri 5 % stopnji tveganja nismo mogli zavreči ($p = 0,834$). Razporeditev genotipov med skupinama se torej ne razlikuje statistično značilno. Zaključimo lahko, da polimorfizem nima vpliva na pojavnost osteoporoze pri Slovenkah.

Do sedaj sta bili objavljeni dve študiji, ki sta določili pogostost polimorfizma -1397_-1396insGGA v določeni populaciji ter tudi ovrednotili njegov vpliv na mineralno gostoto kosti. Naše rezultate smo primerjali z rezultati teh dveh študij.

Polimorfizem -1397_-1396insGGA so identificirali Balemans in sodelavci (17). Analizirali so sekvenco gena SOST pri 47 posameznikih (moški in ženske, ki niso bili v sorodu ter so izhajali iz različnih etničnih skupin), pri tem odkrili polimorfizem -1397_-1396insGGA in določili sledečo pogostost genotipov: ins -/- : ins +/- : ins +/+ = 25 : 43 : 32 (%). Če rezultat te analize primerjamo z našimi rezultati, ugotovimo, da je genotip ins +/+ bistveno bolj zastopan kot v slovenski populaciji, genotip ins -/- pa manj. Razlog za to razliko bi lahko bilo dejstvo, da izhaja 47 preiskovancev iz različnih etničnih skupin (tudi predstavniki različnih ras), mi pa smo analizirali samo skupino belcev. Možno je, da se polimorfizem -1397_-1396insGGA npr. pri azijski ali pri črnski rasi pojavlja z večjo frekvenco kot pri kavkazijski.

Balemans in sodelavci so nato določili pogostost polimorfizma v populaciji 619 perimenopavznih žensk (belk) iz Velike Britanije. 619 žensk so izbrali iz večje populacije

na podlagi vrednosti MGK ter jih razdelili v dve skupini (skupina z nizko MGK ter skupina z visoko MGK). Pogostost polimorfizma pri skupini žensk z nizko MGK je bila ins -/- : ins +/- : ins +++ = 42,9 : 45,8 : 11,3 (%), pri skupini z visoko MGK pa : ins -/- : ins +/- : ins +++ = 45,0 : 45,0 : 10,0 (%) (17). Pogostost posameznih genotipov v teh dveh skupinah preiskovank je primerljiva z rezultati naše analize, pa tudi število preiskovank je primerljivo.

Uitterlinden in sodelavci pa so določili pogostost polimorfizma pri populaciji 1016 postmenopavznih nizozemskih žensk (belke) z naslednjim rezultatom: ins -/- : ins +/- : ins +++ = 37 : 50 : 13 (%) (12). Skupino postmenopavznih nizozemskih žensk smo primerjali s skupino postmenopavznih Slovenk (združitve skupine postmenopavznih preiskovank brez in z osteoporozo, N = 451). Pri tej skupini je bila pogostost ins -/- : ins +/- : ins +++ = 40,1 : 46,8 : 13,1 (%). Rezultati se primerljivi, le da je v slovenski populaciji pomenopavznih žensk genotip ins +/- za 3% manj zastopan na račun povečane pojavnosti genotipa ins -/-.

Na podlagi primerjave naših rezultatov ter rezultatov drugih študij lahko zaključimo, da se pogostost polimorfizma -1397_-1396insGGA gena SOST ne razlikuje bistveno pri populaciji Angležinj, Nizozemk in Slovenk.

Pri nobeni od do sedaj objavljenih raziskav nismo izsledili podatka o pogostosti polimorfizma -1397_-1396insGGA pri moški populaciji. S testom χ^2 pa smo preverili, ali se porazdelitev genotipov pri naših moških preiskovancih (povprečna starost 67,6 let) razlikuje od porazdelitve genotipov pri preiskovankah (povprečna starost 61,3 let). Razporeditev genotipov med skupinama se ne razlikuje statistično značilno ($p = 0,591$), iz česar lahko zaključimo, da se porazdelitev genotipskih skupin pri Slovenkah in Slovencih ne razlikuje.

4.4.2 Vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na mineralno gostoto kosti

Zanimalo nas je, ali obstaja med genotipskimi skupinami ins -/-, ins +/- in ins +++ statistično značilna razlika v vrednostih mineralne gostote kosti na različnih delih skeleta (na vratu stegenice (MGK_vs), v celotnem kolku (MGK_cel) in v predelu ledvenih vretenc (MGK_lv)). Mineralna gostota kosti je osnovni kazalec osteoporoze. Z ugotavljanjem vpliva polimorfizma -1397_-1396insGGA na MGK najboljše ocenimo njegov pomen pri

osteoporozni. Za oceno tega vpliva smo uporabili test ANCOVA (analiza kovariance), s katerim določimo vpliv neodvisne spremenljivke na odvisno spremenljivko, pri tem pa v analizo vključimo še kovariate. ANCOVA odstrani vpliv kovariat ter s tem omogoči boljšo oceno vpliva neodvisne spremenljivke (31). V našem primeru so bile neodvisna spremenljivka genotipske skupine, odvisna spremenljivka MGK, kovariati pa starost ter indeks telesne mase (ITM) preiskovancev. Starost in ITM vplivata na vrednost MGK posameznika. S testom ANCOVA smo ta vpliv statistično izničili z določitvijo prirejene vrednosti MGK, nato pa testirali vpliv genotipskih skupin na prirejene vrednosti MGK.

Pogoj za izvedbo testa ANCOVA je, da se spremenljivke porazdeljujejo normalno. Kolmogorov-Smirnov test je pokazal, da se vedno normalno porazdeljuje ali sama vrednost MGK ali pa lnMGK, zato smo lahko v vseh primerih uporabili test ANCOVA za nadaljno analizo. Rezultate testa ANCOVA prikazuje preglednica X.

Preglednica X: Vpliv polimorfizma na MGK pri preiskovankah.

	genotip	MGK_vs ± SD	p	MGK_cel ± SD	p	MGK_lv ± SD	p
vse preiskov. (N = 509)	ins -/-	0,7094 ± 0,1271	0,147	0,8534 ± 0,1372	0,073	- 0,1375 ± 0,1954	0,123
	ins -/+	0,7043 ± 0,1226		0,8395 ± 0,1403		- 0,1568 ± 0,1816	
	ins +/+	0,6793 ± 0,1137		0,8224 ± 0,1291		- 0,1814 ± 0,1617	
premenop. preiskov. (N = 59)	ins -/-	0,7899 ± 0,07308	0,996	0,9278 ± 0,08416	0,711	1,009 ± 0,1098	0,850
	ins -/+	0,7792 ± 0,08509		0,9090 ± 0,09206		1,001 ± 0,1080	
	ins +/+	0,7872 ± 0,08103		0,9508 ± 0,1172		1,028 ± 0,1686	
zdrave pomen. preiskov. (N = 222)	ins -/-	0,7742 ± 0,1191	0,524	0,9318 ± 0,1248	0,135	0,9926 ± 0,1492	0,243
	ins -/+	0,7597 ± 0,1274		0,9084 ± 0,1384		0,9639 ± 1360	
	ins +/+	0,7388 ± 0,09612		0,8753 ± 0,1083		0,9563 ± 0,1139	
pomen. osteop. preiskov. (N = 228)	ins -/-	0,6223 ± 0,08674	0,271	0,7566 ± 0,0907	0,533	0,7515 ± 0,1013	0,128
	ins -/+	0,6295 ± 0,07747		0,7529 ± 0,9990		0,7388 ± 0,08002	
	ins +/+	0,6089 ± 0,08620		0,7536 ± 0,1089		0,7246 ± 0,7930	

* Vrednosti MGK so prirejene.

** Poševno: upoštevana je vrednost lnMGK_lv, ki se porazdeljuje normalno.

*** Vrednost $p \leq 0,05$ pomeni statistično značilno razliko.

Ničelno hipotezo (vrednosti MGK med genotipskimi skupinami se ne razlikujejo) bi lahko zavrgli, če bi bila vrednost $p \leq 0,05$. Rezultat je pokazal, da pri nobeni skupini preiskovank ni statistično značilne razlike v vrednostih MGK med genotipskimi skupinami. Iz tega

lahko sklepamo, da pri Slovenkah polimorfizem -1397_-1396insGGA gena SOST ne vpliva na vrednosti MGK in s tem tudi ne na pojavnost osteoporoze pri ženskah.

Vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na MGK so preučevali tudi Balemans in sodelavci (17). Primerjali so dve skupini perimenopavznih žensk: 326 žensk je predstavljalo skupino z visoko MGK (16 % večje populacije perimenopavznih preiskovank z največjo vrednostjo MGK), 293 žensk pa je predstavljalo skupino z nizko MGK (16 % večje populacije perimenopavzni preiskovank z najnižjo vrednostjo MGK). Ugotovili so, da se porazdelitev treh genotipskih skupin med skupinama z visoko in nizko MGK podobno kot pri nas ne razlikuje.

Uitterlinden in sodelavci pa so nasprotno ugotovili, da je prisotnost polimorfizma -1397_-1396insGGA povezana z znižanjem MGK v vratu stegenice ($p = 0,05$) ter v predelu ledvenih vretenc ($p = 0,01$) pri postmenopavznih Nizozemkah. Pri skupini z genotipom ins -/- so določili za 4 % višjo vrednost MGK_{vs} in MGK_{lv} kot pri skupini z genotipom ins +/+. Preiskovanke so nato razdelili še v tri starostne skupine (55 – 63 let, 64 - 71 let in 72 – 80 let) ter spet primerjali vrednosti MGK v različnih genotipskih skupinah ločeno za vsako starostno skupino posebej. Test ANCOVA je pokazal, da razlika v MGK_{lv} med genotipskimi skupinami narašča s starostjo: v najstarejši skupini preiskovank je razlika v vrednostih MGK_{lv} med genotipoma ins -/- in ins +/+ znašala 8 % ($p = 0,004$) (12).

Tudi mi smo slovenske preiskovanke razdelili v starostne skupine in s testom ANCOVA preverili, če je mogoče vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA statistično značilen le pri starejših preiskovankah. Naša analiza ni potrdila vpliva starosti preiskovank na razlike v vrednostih MGK med različnimi genotipskimi skupinami ($p > 0,05$).

Vpliv polimorfizma na MGK smo ovrednotili tudi pri moških preiskovancih (preglednica XI). Uitterlinden in sodelavci niso dokazali vpliva polimorfizma na MGK pri starejših Nizozemcih (12). Pri 117 Slovencih pa je test ANCOVA pokazal, da je razlika v vrednostih MGK na celotnem kolku signifikantno različna med tremi genotipskimi skupinami ($p = 0,031$).

Preglednica XI: Vpliv polimorfizma na MGK pri moških preiskovancih.

genotip	MGK_vs ± SD	p	MGK_cel ± SD	p	MGK_lv ± SD	p
ins -/-	0,8531 ± 0,1726	0,062	1,070 ± 0,1828	0,031	1,082 ± 0,1758	0,370
ins -/+	0,7910 ± 0,1469		1,002 ± 0,1442		1,041 ± 0,1831	
ins ++	0,7261 ± 0,08269		0,9196 ± 0,09379		1,009 ± 1397	

* Vrednosti MGK so prirejene.

** Vrednost $p \leq 0,05$ pomeni statistično značilno razliko.

Če primerjamo vrednosti MGK_cel posameznih genotipskih skupin, ugotovimo, da je vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA odvisen od števila alelov z insercijo GGA. Pri preiskovancih z genotipom ins -/- je vrednost MGK_cel najvišja, nižja pri preiskovancih, ki nosijo en alel za polimorfizem (genotip ins +/-), najnižja pa je pri preiskovancih, ki so homozigoti za polimorfizem (torej imajo 2 alela za polimorfizem). Razlika med vrednostjo MGK_cel med skupino ins -/- in ins ++ je kar 14 %. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da polimorfizem -1397_-1396insGGA statistično značilno vpliva na znižanje MGK na področju celotnega kolka. Ob tem polimorfizem vpliva tudi na MGK v predelu vretenc ter v predelu vratu stegenice, in sicer opazimo trend padanja vrednosti MGK z večanjem števila alelov za polimorfizem -1397_-1396insGGA, vendar pa razlika ni statistično značilna.

Skupina slovenskih moških preiskovancev je relativno majhna (117). Vsekakor pa tudi iz rezultatov pri tako majhni skupini lahko domnevamo, da ima polimorfizem vlogo pri regulaciji MGK pri moških. Prisotnost polimorfizma -1397_-1396insGGA je povezana z znižanjem MGK v kolku ter posledično s povečanjem tveganja za nastanek osteoporoze. Za potrditev te domneve pa bi bilo potrebno izvesti študijo z večjo skupino Slovencev.

4.4.3 Vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije, DKK, OPG in RANKL

Biokemijski kazalci kostne remodelacije so indikator trenutnega dogajanja v kostnem metabolizmu. Alkalna fosfataza (ALP), kostna alkalna fosfataza (BALP) ter osteokalcin (OC) so kazalci tvorbe kostnine, C-terminalni telopeptid kolagena (CTx) in deokspiridinolin (Dpd) pa odražata intenzivnost kostne razgradnje. Proteini Dickkopf (DKK), osteoprotegrin (OPG) in ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B

(RANKL) pa so kot lokalni faktorji vključeni v signalne poti, ki regulirajo kostno remodelacijo. V te signalne poti pa je posredno ali neposredno vključen tudi protein sklerostin. S testom ANOVA (analiza varianc) smo analizirali, ali pojavnost polimorfizma -1397_-1396insGGA gena SOST vpliva na vrednosti naštetih biokemijskih kazalcev ter na vrednosti DKK, OPG in RANKL.

Test ANOVA nam pove, kako 3 ali več neodvisnih spremenljivk (v našem primeru 3 genotipske skupine) interagira med sabo in kako te interakcije vplivajo na odvisne spremenljivke (biokemijski kazalci kostne remodelacije, DKK, OPG, RANKL) (31). Ničelna hipoteza v našem primeru se glasi: Povprečne vrednosti biokemijskih kazalcev, DKK, OPG in RANKL so enake v vseh genotipskih skupinah. Slabost testa ANOVA je, da z njim izvemo le, ali so razlike v povprečnih vrednostih med posameznimi skupinami statistično značilne, ne izvemo pa, katere skupine se razlikujejo med seboj. Zato moramo izvesti še dodatno analizo (*post hoc* test), da ugotovimo, katere skupine se razlikujejo med seboj in katere ne.

Pri spremenljivkah, ki se ne porazdeljujejo normalno, pa uporabimo neparametrični ekvivalent testa ANOVA, ki se imenuje Kruskal-Wallis test (31). Spremenljivke, ki se niso porazdeljevale normalno in pri katerih smo uporabili test Kruskal-Wallis, so koncentracija RANKL pri treh skupinah preiskovank (vse preiskovanke, premenopavzne ter zdrave pomenopavzne preiskovanke) ter koncentraciji BALP in OPG samo pri skupini vseh preiskovank. Pri skupini moških preiskovancev so se vse spremenljivke normalno porazdeljevale.

Rezultate testov ANOVA in Kruskal-Wallis prikazuje preglednica XII. Ničelne hipoteze nismo mogli v nobenem primeru zavreči, saj je vrednost p v vseh primerih večja od 0,05. Polimorfizem 1397_-1396insGGA torej nima značilnega vpliva na koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije ali na koncentracijo DKK, OPG in RANKL.

Preglednica XII: Vrednosti p testov ANOVA in Kruskal-Wallis po posameznih skupinah za biokemijske kazalce ter DKK, OPG in RANKL.

	ALP	BALP	CTx	Dpd	OC	DKK	OPG	RANKL
vse preiskovanke	0,547	<i>0,358</i>	0,276	0,464	0,386*	0,178*	<i>0,358</i>	<i>0,541</i>
premenopavzne preiskovanke	---	0,843	0,847	---	0,940	---	0,488	<i>0,180</i>
zdrave pomeno. preiskovanke	---	0,883	0,246	---	0,706	0,693*	0,094	<i>0,415</i>
pomen. osteop. preiskovanke	0,547	0,077	0,544	0,464	0,254	0,145*	0,714	0,755
moški preiskovanci	---	---	0,408	---	0,499	---	0,360	0,618

Legenda: - krepko tiskano: vrednost p testa ANOVA

- poševno tiskano: vrednost p testa Kruskal-Wallis.

* Pri izračunu vrednosti p uporabljen logaritem vrednosti spremenljivke, ker se le-ta porazdeljuje normalno.

Protein sklerostin zavira tvorbo kostnine. Po vsej verjetnosti polimorfizem -1397_-1396insGGA v promotorju gena SOST nima pomembne vloge pri ekspresiji gena, ker bi se to odražalo v spremenjeni količini nastalega proteina. Ta pojav pa bi lahko posredno opazili zaradi spremenjene koncentracije biokemijskih kazalcev kostne remodelacije. Možno pa je tudi, da polimorfizem sicer ima vpliv na kostno remodelacijo, vendar je ta vpliv šibak in ga zaradi nespecifičnosti biokemijskih kazalcev težko zaznamo. Naše domneve bi bilo potrebno potrditi na dodatnih in vitro raziskavah.

4.4.4 Vpliv polimorfizma -1397_-1396insGGA na uspešnost zdravljenja z alendronatom ter raloksifenom

Dve skupini pomenopavznih osteoporoznih preiskovank smo spremljali pri zdravljenju z antiresorptivnima zdraviloma alendronatom (N = 52) ter raloksifenom (N = 47). Zdravili alendronat in raloksifen inhibirata delovanje osteoklastov ter s tem resorpcijo kostnine. Po končanem zdravljenju, ki je trajalo 1 leto, so jim ponovno izmerili vrednosti MGK ter koncentracije biokemijskih kazalcev kostne remodelacije. Klinični podatki obeh skupin preiskovank so navedeni v prilogi 2.

Raziskali smo, ali polimorfizem -1397_-1396insGGA vpliva na uspešnost zdravljenja z omenjenima antiresorptivnima zdraviloma. Uporabili smo testa ANOVA in Kruskal-Wallis.

Test Kruskal-Wallis smo uporabili le v primeru spremenljivke MGK_cel pri skupini preiskovank, zdravljenih z raloksifenom, saj se ta spremenljivka ne porazdeljuje normalno. Ostale spremenljivke se porazdeljujejo normalno in smo pri njih uporabili test ANOVA.

Ničelna hipoteza se glasi: Spremembe vrednosti mineralne gostote kosti ter spremembe koncentracij biokemijskih kazalcev kostne remodelacije med enoletnim zdravljenjem z alendronatom ali raloksifenom so enake v vseh genotipskih skupinah. Ničelne hipoteze v nobenem primeru nismo zavrgli, saj je vrednost p vedno večja od 0,05 (preglednica XIII). Polimorfizem -1397_-1396insGGA torej nima statistično značilnega vpliva na uspešnost enoletnega zdravljenja z antiresorptivnima zdraviloma alendronatom in raloksifenom.

Preglednica XIII: Vpliv polimorfizma na zdravljenje z alendronatom in raloksifenom.

	p (alendronat)	p (raloksifen)
MGK_vs	---	0,981
MGK_cel	0,172	0,143*
MGK_lv	0,651	0,067
BALP	0,459	0,174
CTx	---	0,402
Dpd	0,127	---
OC	0,754	0,109

* Uporabljen test Kruskal-Wallis.

5 SKLEP

Namen našega dela je bil določiti pogostost polimorfizma -1397_-1396insGGA v promotorju gena za sklerostin ter ovrednotiti njegov vpliv na pojavnost osteoporoze.

Razvili smo PCR metodo, s katero smo pomnožili tarčni odsek DNA vseh 718 preiskovancev. V nadaljevanju smo razvili še DHPLC metodo in z njo določili genotipe preiskovancev. Pojavnost posameznih genotipov v slovenski populaciji 718 moških in žensk je sledeča: ins -/- : ins +/- : ins +/+ = 42 % : 46 % : 12 %.

Klinični pomen polimorfizma -1397_-1396insGGA smo ocenili na podlagi statistične analize ter ugotovili, da:

- polimorfizem nima statistično značilnega vpliva na MGK pri nobeni skupini preiskovank, nasprotno pa je pri moških preiskovancih vpliv na MGK na področju celotnega kolka statistično značilen ($p = 0,031$), in sicer z večanjem števila alelov insGGA vrednost MGK pada (razlika v vrednostih MGK v kolku med homozigotnima genotipoma je kar 14 %),
- polimorfizem nima statistično značilnega vpliva na vrednosti biokemijskih kazalcev kostne remodelacije, DKK, OPG in RANKL ne pri preiskovankah in ne pri preiskovancih ($p > 0,05$),
- polimorfizem nima statistično značilnega vpliva na uspešnost enoletnega zdravljenja pomenopavznih osteoporoznih preiskovank z alendronatom in raloksifenom ($p > 0,05$).

Rezultati nakazujejo, da polimorfizem -1397_-1396insGGA nima vpliva na pojavnost osteoporoze pri preiskovankah ali pa je vpliv premajhen, da bi ga določili v preučevani populaciji. Rezultate analize bi bilo smiselno vključiti v metaanalizo, ki bi ovrednotila naše delo skupaj z rezultati ostalih raziskovalnih skupin, saj pri večji populaciji lažje dokažemo majhen vpliv določenega polimorfizma. Enako bi bilo potrebno potrditi vpliv polimorfizma na znižanje MGK pri moških na večji populaciji.

6 LITERATURA

1. Kocijančič A, Mravlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2005: 898-933.
2. Kocijančič A: Osteoporoza: diagnostika in zdravljenje. Farm Vestn 1999; 50: 1-6.
3. Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Clifford JR: Osteoporosis, 3. izdaja, Elsevier Academic Press, London, 2008
4. Hadjidakis DJ, Androulakis II: Bone Remodeling. Ann N Y Acad Sci 2006; 1092: 385-396.
5. Baron R, Rawadi G: Targeting the Wnt/ β -Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton. Endocrinology 2007; 148(6): 2635-2643.
6. Marc J: Biokemični in genetični kazalci osteoporoze. Farm Vestn 2000; 51: 352-355.
7. Seibel MJ: Biochemical Markers of Bone Turnover, Part I: Biochemistry and variability. Clin Biochem Rev, 2005; 26: 97-122.
8. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA: Regulation of bone mass by Wnt signaling. J Clin Invest 2006; 116(5): 1202-1209.
9. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM: Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. Gene 2004; 341: 19-39.
10. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Hul EV, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Ende JVD, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dijkers FG, Stratakis C, Lindpainter K, Vickery B, Foernzler D, Hul WV: Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). Hum Mol Genet 2001; 10(5): 537-543.
11. Ott SM: Sclerostin and Wnt signaling – The Pathway to Bone Strength. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(12): 6741-6743.
12. Uitterlinden AG, Arp PP, Paepers BW, Charnley P, Proll S, Rivadeneira F, Fang Y, van Meurs BJ, Britschgi TB, Latham JA, Schatzman RC, Pols HAP, Brunkow ME: Polymorphisms in the Sclerosteosis/van Buchen disease Gene (SOST) Region Are Associated with Bone-Mineral Density in Elderly Whites. Am J Hum Genet 2004; 75: 1032-1045.
13. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepers BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu YH, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P,

- Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan JT: Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 2001; 68 (3): 577-589.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=AF326736> 2008.
14. Ralston SH, de Crombrughe B: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes & Dev* 2006; 20: 2492-2506.
 15. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP: Mechanisms of Anabolic Therapies for Osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 905-916.
 16. Keller H, Kneissel M: SOST is target gene for PTH in bone. *Bone* 2005; 37(2): 148-58.
 17. Balemans W, Foerzler D, Parsons C, Ebeling M, Thompson A, Reid DM, Lindpaintner K, Ralston SH, Van Hul W: Lack of Association Between the SOST gene and Bone Mineral Density in Perimenopausal Women: Analysis of Five Polymorphisms. *Bone* 2002; 31(4): 515-519.
 18. Huang QY, Chee Kung AW: Genetics of osteoporosis. *Mol Gen Met* 2006; 88: 295-306.
 19. Čelhar T, Ferik P, Mlinarič Raščan I: Genetska raznolikost kot osnova uporabnosti farmakogenomike v klinični praksi. *Farm Vestn* 2007; 58: 149-154.
 20. Borut Štrukelj, Janko Kos: *Biološka zdravila - od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 51 – 64, 136-186.
 21. Steffen C: *PCR Applications Manual*, 2. izdaja, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, 1999: 10-48.
 22. Schollen E, Dequeker E, McQuaid S, Vankeirsbilck B, Michils G, Harvey J, van den Akker E, van Schooten R, Clark Z, Schrooten S, Matthijs G: Diagnostic DHPLC Quality Assurance (DDQA): A Collaborative Approach to the Generation of Validated and Standardized Methods for DHPLC-Based Mutation Screening in Clinical Genetics Laboratories. *Hum Mut* 2005, 25: 583-592.
 23. Schollen in sodelavci: Standard operating procedure DHPLC, *Hum Mut*: 1-35.
 24. Coleman WB, Tsongalis GJ: *Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian*, Humana Press, New Jersey, 1997: 123-162.
 25. Taylor GR: *Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*, CRC Press, New York, 1997: 95-108.
 26. Schena M: *Microarray Analysis*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2003: 1-27.

27. Dunnen JT, Antonrakis E: Nomenclature for the description of human sequence variations. Hum Gen 2001; 109: 121-124.
28. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nuc Ac Res 1988; 16: 1215.
29. <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> 2007.
30. Mueller RF, Young ID: Emerys Elements of Medical Genetics, 10. izdaja, Churchill Livingstone, 1998: 113-126.
31. Field Andy: Discovering Statistics Using SPSS, 2. izdaja, SAGE Publications, London, 2005: 309-388.

7 PRILOGE

7.1 PRILOGA 1: REZULTATI GENOTIPIZACIJE

Preglednica XIV: Rezultati genotipizacije preiskovank.

št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip
666	ins -/+	826	ins -/+	1098	ins -/-	24opg	ins -/+	614r	ins -/-
667	ins +/+	827	ins -/+	1099	ins -/+	25opg	ins -/-	615r	ins -/+
669	ins +/+	915	ins -/+	1100	ins -/+	26opg	ins -/-	616r	ins -/-
670	ins -/-	916	ins -/-	1101	ins +/+	27opg	ins -/-	617r	ins -/-
671	ins -/+	917	ins -/-	1103	ins -/+	28opg	ins -/+	618r	ins +/+
673	ins -/+	918	ins -/+	1104	ins -/-	29opg	ins -/-	619r	ins -/+
674	ins -/-	920	ins -/+	1107	ins +/+	30opg	ins -/+	620r	ins -/+
675	ins +/+	921	ins -/+	1110	ins -/-	31opg	ins -/+	621r	ins +/+
676	ins -/+	923	ins -/+	1111	ins -/-	32opg	ins -/+	622r	ins +/+
677	ins -/+	925	ins -/-	1112	ins -/+	33opg	ins -/-	623r	ins -/-
678	ins -/+	926	ins -/-	1113	ins -/-	34opg	ins -/+	624r	ins -/-
679	ins +/+	927	ins -/+	1115	ins -/+	35opg	ins -/+	625r	ins +/+
681	ins -/-	928	ins -/+	1116	ins -/+	36opg	ins -/+	626r	ins -/+
682	ins +/+	929	ins -/+	1117	ins -/+	37opg	ins +/+	627r	ins -/+
684	ins -/-	930	ins -/+	1118	ins -/+	38opg	ins -/+	628r	ins -/+
685	ins -/-	932	ins -/-	1121	ins -/-	39opg	ins -/-	629r	ins -/-
687	ins +/+	933	ins -/+	1123	ins -/-	40opg	ins -/+	630r	ins -/+
688	ins +/+	934	ins -/+	1126	ins -/-	41opg	ins -/-	631r	ins -/+
690	ins -/+	936	ins -/-	1127	ins -/+	42opg	ins -/+	632r	ins -/-
691	ins -/-	938	ins -/-	1128	ins -/+	43opg	ins -/-	633r	ins -/+
695	ins -/+	939	ins -/+	1129	ins -/+	44opg	ins -/-	634r	ins -/+
696	ins -/+	942	ins -/-	1130	ins +/+	45opg	ins -/-	635r	ins -/+
697	ins -/+	945	ins -/-	1131	ins -/-	46opg	ins -/-	636r	ins -/+
698	ins -/+	947	ins -/-	1132	ins -/+	47opg	ins -/+	637r	ins -/+
701	ins -/+	949	ins -/+	1133	ins -/-	48opg	ins -/+	638r	ins -/+
703	ins -/-	950	ins -/+	1134	ins -/+	49opg	ins +/+	639r	ins -/-
704	ins -/-	954	ins +/+	1135	ins -/+	50opg	ins -/+	640r	ins -/+
705	ins -/-	955	ins -/-	1136	ins -/+	51opg	ins -/-	659r	ins -/+
706	ins -/+	956	ins -/+	1138	ins -/-	52opg	ins +/+	660r	ins -/+
708	ins -/-	959	ins -/+	1139	ins -/-	53opg	ins -/-	661r	ins -/+
709	ins -/+	960	ins -/+	1140	ins -/+	54opg	ins -/+	662r	ins -/-
710	ins -/+	961	ins -/+	1141	ins +/+	55opg	ins -/-	663r	ins -/+
711	ins -/+	962	ins -/-	1142	ins -/+	56opg	ins -/-	664r	ins -/-
713	ins -/-	963	ins -/+	1143	ins -/-	57opg	ins -/+	665r	ins -/-
715	ins -/+	964	ins -/-	1145	ins -/+	58opg	ins -/-	666r	ins -/+
717	ins -/-	966	ins -/+	1146	ins -/+	59opg	ins -/+	667r	ins -/+
718	ins -/-	967	ins -/-	1147	ins -/-	60opg	ins -/-	1002z	ins -/-
719	ins -/+	968	ins -/-	1149	ins -/+	61opg	ins -/+	1003z	ins -/+
720	ins -/+	969	ins -/+	1150	ins -/+	62opg	ins -/+	1004z	ins -/-
721	ins -/-	970	ins -/-	93f	ins -/+	63opg	ins -/-	1005z	ins -/+
722	ins -/+	971	ins -/-	94f	ins -/-	64opg	ins -/+	1006z	ins -/-
723	ins -/-	976	ins -/-	95f	ins -/+	65opg	ins -/-	1007z	ins -/+
724	ins -/+	977	ins -/+	96f	ins +/+	66opg	ins -/+	1008z	ins +/+
725	ins +/+	978	ins -/+	97f	ins -/+	67opg	ins -/+	1009z	ins -/+
726	ins -/+	982	ins -/-	98f	ins -/-	68opg	ins -/+	1010z	ins -/+
727	ins -/-	983	ins -/-	99f	ins -/+	69opg	ins -/+	1011z	ins -/-
728	ins -/-	987	ins -/+	100f	ins -/+	70opg	ins -/-	1012z	ins -/+
729	ins -/-	988	ins -/+	101f	ins -/+	71opg	ins -/+	1021z	ins -/-
730	ins -/-	989	ins -/-	102f	ins -/+	72opg	ins -/+	1028z	ins -/+
732	ins -/+	990	ins -/-	103f	ins -/+	73opg	ins +/+	1030z	ins -/+
733	ins -/-	991	ins -/+	106f	ins -/+	74opg	ins +/+	1031z	ins -/-
734	ins +/+	995	ins +/+	108f	ins -/-	75opg	ins -/+	1032z	ins +/+
738	ins -/-	997	ins -/-	109f	ins -/+	76opg	ins -/-	1033z	ins +/+
741	ins -/-	999	ins +/+	110f	ins -/+	77opg	ins -/-	1034z	ins -/-
743	ins -/-	1000	ins -/-	111f	ins -/-	78opg	ins -/-	1035z	ins -/-

št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip
744	ins -/+	1002	ins -/-	112f	ins -/-	79opg	ins +/+	1036z	ins -/+
745	ins -/+	1004	ins -/-	113f	ins -/-	80opg	ins -/+	1037z	ins -/+
747	ins -/+	1005	ins -/-	114f	ins -/-	81opg	ins +/+	1038z	ins -/+
748	ins +/+	1006	ins -/-	115f	ins +/+	82opg	ins -/-	1039z	ins -/-
749	ins -/+	1007	ins +/+	117f	ins -/-	83opg	ins -/+	1040z	ins -/+
750	ins -/-	1008	ins -/-	118f	ins +/+	84opg	ins +/+	1041z	ins -/-
752	ins -/+	1009	ins -/-	119f	ins -/+	85opg	ins -/+	1042z	ins -/+
753	ins -/-	1010	ins -/-	120f	ins -/+	86opg	ins -/-	1043z	ins -/+
754	ins -/-	1012	ins -/-	121f	ins -/-	87opg	ins -/-	1045z	ins -/-
755	ins -/-	1014	ins -/+	122f	ins -/-	88opg	ins -/-	1049z	ins -/-
756	ins -/-	1015	ins +/+	123f	ins -/+	89opg	ins -/-	1051z	ins -/+
757	ins -/+	1016	ins -/-	124f	ins +/+	90opg	ins -/+	1052z	ins -/+
758	ins -/+	1018	ins -/-	125f	ins -/-	91opg	ins -/-	1053z	ins -/+
759	ins -/-	1020	ins -/+	126f	ins -/-	92opg	ins -/+	1054z	ins -/+
761	ins -/+	1021	ins -/-	129f	ins -/+	93opg	ins -/-	1055z	ins -/-
763	ins -/+	1022	ins -/+	130f	ins -/-	94opg	ins -/+	1056z	ins -/+
764	ins -/-	1023	ins -/+	131f	ins +/+	95opg	ins -/+	1057z	ins -/-
766	ins -/-	1025	ins -/+	134f	ins -/+	96opg	ins -/-	1058z	ins -/-
767	ins -/+	1026	ins -/-	135f	ins -/+	97opg	ins -/+	1059z	ins +/+
768	ins +/+	1027	ins -/-	136f	ins -/+	98opg	ins -/-	1060z	ins -/-
769	ins -/-	1029	ins -/+	137f	ins -/-	99opg	ins -/-	1061z	ins -/+
770	ins -/-	1030	ins -/-	138f	ins -/+	100opg	ins -/-	1062z	ins -/+
771	ins -/-	1031	ins -/-	139f	ins -/-	101opg	ins -/-	1064z	ins -/-
772	ins -/-	1033	ins -/+	140f	ins -/-	102opg	ins -/-	1065z	ins +/+
774	ins -/+	1035	ins +/+	141f	ins -/+	103opg	ins -/-	1066z	ins -/+
775	ins -/-	1038	ins -/-	142f	ins -/-	104opg	ins +/+	1067z	ins -/-
776	ins -/-	1039	ins -/-	146f	ins -/-	105opg	ins -/-	1068z	ins -/+
777	ins -/+	1041	ins -/-	148f	ins -/+	106opg	ins -/+	1069z	ins -/-
778	ins -/-	1042	ins -/+	149f	ins -/-	107opg	ins -/+	1070z	ins -/-
779	ins -/+	1043	ins -/+	155f	ins -/-	108opg	ins -/+	1071z	ins -/-
780	ins -/-	1044	ins -/-	156f	ins -/-	109opg	ins +/+	1072z	ins -/+
781	ins -/+	1045	ins -/+	158f	ins -/-	110opg	ins -/-	1074z	ins -/-
782	ins +/+	1046	ins -/-	159f	ins -/-	111opg	ins -/+	1075z	ins -/+
783	ins +/+	1047	ins -/+	160f	ins -/+	112opg	ins -/+	1076z	ins -/+
785	ins -/+	1050	ins -/-	161f	ins -/+	113opg	ins -/-	1077z	ins +/+
787	ins -/-	1054	ins +/+	163f	ins -/-	114opg	ins -/+	1078z	ins -/-
788	ins -/+	1055	ins -/-	167f	ins +/+	115opg	ins -/-	1079z	ins -/+
789	ins -/-	1057	ins -/+	168f	ins +/+	116opg	ins -/+	1081z	ins -/+
790	ins +/+	1058	ins +/+	169f	ins -/+	117opg	ins -/-	1082z	ins -/-
791	ins -/-	1059	ins -/-	170f	ins -/-	587r	ins +/+	1083z	ins -/+
793	ins -/+	1060	ins -/-	174f	ins -/+	588r	ins +/+	1085z	ins -/-
794	ins +/+	1061	ins -/+	175f	ins -/+	589r	ins -/-	1087z	ins -/+
795	ins -/+	1062	ins +/+	176f	ins -/-	590r	ins -/-	1088z	ins -/-
796	ins +/+	1064	ins -/+	1opg	ins -/-	591r	ins -/-	1089z	ins -/-
797	ins -/+	1065	ins +/+	2opg	ins -/-	592r	ins -/+	1090z	ins +/+
798	ins -/+	1066	ins -/-	3opg	ins -/+	593r	ins -/-	1091z	ins -/+
800	ins -/+	1067	ins -/-	4opg	ins -/+	594r	ins -/+	1092z	ins -/+
801	ins -/+	1070	ins -/+	5opg	ins -/+	595r	ins -/-	1093z	ins +/+
802	ins -/+	1071	ins -/+	6opg	ins -/+	596r	ins -/-	1094z	ins -/-
803	ins -/+	1072	ins -/+	7opg	ins +/+	597r	ins -/+	1095z	ins -/+
804	ins -/-	1075	ins -/-	8opg	ins -/+	598r	ins +/+	1097z	ins -/+
808	ins +/+	1076	ins -/+	9opg	ins -/+	599r	ins -/+	1098z	ins +/+
809	ins -/-	1079	ins -/+	10opg	ins -/-	600r	ins +/+	1100z	ins -/+
810	ins -/+	1080	ins +/+	11opg	ins -/+	601r	ins -/+	1101z	ins -/+
811	ins -/+	1081	ins -/+	12opg	ins -/+	602r	ins +/+	1102z	ins -/-
812	ins -/-	1084	ins -/-	13opg	ins +/+	603r	ins -/+	1103z	ins -/+
813	ins -/-	1085	ins -/-	14opg	ins +/+	604r	ins -/+	1104z	ins -/+
815	ins -/+	1086	ins +/+	15opg	ins -/+	605r	ins -/+	1105z	ins -/+
816	ins -/+	1087	ins -/+	16opg	ins -/-	606r	ins -/-	1106z	ins +/+
817	ins +/+	1088	ins -/-	17opg	ins -/-	607r	ins -/-	1107z	ins -/-
818	ins -/-	1089	ins -/+	18opg	ins -/-	608r	ins -/-	1108z	ins -/+
819	ins -/-	1092	ins -/+	19opg	ins -/+	609r	ins -/-	1110z	ins -/-
820	ins -/+	1093	ins -/+	20opg	ins -/-	610r	ins +/+		
822	ins -/-	1095	ins -/+	21opg	ins -/-	611r	ins -/+		
824	ins -/-	1096	ins -/-	22opg	ins -/-	612r	ins -/+		
825	ins +/+	1097	ins -/+	23opg	ins -/-	613r	ins -/+		

Preglednica XV: Rezultati genotipizacije preiskovancev.

št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip	št. vzorca	genotip
668	ins -/-	751	ins -/-	943	ins -/+	998	ins -/+	1077	ins -/-
672	ins -/-	760	ins +/+	944	ins -/+	1001	ins -/+	1078	ins -/-
680	ins -/+	762	ins -/+	946	ins -/+	1003	ins -/-	1082	ins -/+
683	ins -/+	765	ins -/+	948	ins +/+	1011	ins -/-	1083	ins +/+
686	ins -/-	773	ins -/-	951	ins -/+	1013	ins -/-	1090	ins -/-
689	ins -/+	784	ins +/+	952	ins -/+	1017	ins -/+	1091	ins -/+
692	ins -/-	786	ins -/+	953	ins -/+	1024	ins -/+	1094	ins -/+
693	ins -/+	792	ins -/+	957	ins -/-	1028	ins -/-	1102	ins -/+
694	ins -/-	799	ins -/-	958	ins +/+	1032	ins +/+	1105	ins -/-
699	ins -/-	805	ins -/+	965	ins -/-	1034	ins -/-	1106	ins -/+
700	ins -/+	806	ins -/-	972	ins -/+	1036	ins -/-	1108	ins -/-
702	ins -/+	807	ins -/+	973	ins -/-	1037	ins -/+	1109	ins -/-
707	ins +/+	814	ins -/+	974	ins -/-	1040	ins -/-	1114	ins -/-
712	ins -/+	821	ins -/+	975	ins -/-	1048	ins -/-	1119	ins +/+
714	ins -/-	823	ins -/+	979	ins -/+	1049	ins -/-	1120	ins -/+
716	ins -/-	913	ins -/-	980	ins -/-	1051	ins -/+	1122	ins -/-
731	ins +/+	914	ins -/-	981	ins -/-	1052	ins -/-	1124	ins -/-
735	ins -/-	919	ins -/-	984	ins -/+	1053	ins -/-	1125	ins -/-
736	ins -/+	922	ins -/+	985	ins -/-	1056	ins -/+	1137	ins -/+
737	ins -/+	924	ins -/-	986	ins -/-	1063	ins -/+	1144	ins -/+
739	ins -/+	935	ins -/+	992	ins -/-	1068	ins +/+	1148	ins -/-
740	ins -/+	937	ins -/-	993	ins -/-	1069	ins -/+		
742	ins -/-	940	ins -/-	994	ins -/+	1073	ins +/+		
746	ins -/+	941	ins +/+	996	ins -/+	1074	ins -/+		

7.2 PRILOGA 2: KLINIČNI PODATKI PREISKOVANCEV PO GENOTIPSKIH SKUPINAH

Preglednica XVI: Klinični podatki za vse preiskovanke po genotipskih skupinah.

	ins -/-	ins -/+	ins +/+	skupno
starost	61,33 ± 10,65 (204)	60,97 ± 9,286 (241)	62,02 ± 9,225 (65)	61,25 ± 9,833 (510)
ITM	26,86 ± 4,523 (203)	27,13 ± 4,745 (241)	27,09 ± 4,775 (65)	27,02 ± 4,654 (509)
MGK_vs (g/cm ²)	0,7093 ± 0,1268 (204)	0,7043 ± 0,1226 (241)	0,6793 ± 0,1137 (65)	0,7031 ± 0,1233 (510)
MGK_cel (g/cm ²)	0,8534 ± 0,1369 (201)	0,8395 ± 0,1403 (239)	0,8224 ± 0,1291 (65)	0,8428 ± 0,1377 (505)
MGK_lv (g/cm ²)	0,8878 ± 0,1744 (203)	0,8692 ± 0,1607 (240)	0,8489 ± 0,1617 (65)	0,8740 ± 0,1666 (508)
ALP (μkat/l)	1,079 ± 0,2827 (21)	1,056 ± 0,2778 (23)	0,9514 ± 0,1310 (7)	1,051 ± 0,2640 (51)
BALP (μg/l)	10,78 ± 4,710 (84)	11,89 ± 5,662 (96)	10,51 ± 3,874 (29)	11,25 ± 5,086 (209)
CTx (pmol/l)	3578 ± 1889 (83)	3910 ± 2180 (106)	3252 ± 1605 (23)	3709 ± 2018 (212)
Dpd (nmol/mmol kreatinina)	7,939 ± 4,482 (21)	6,941 ± 2,401 (20)	8,743 ± 3,395 (7)	7,640 ± 3,575 (48)
OC (μg/l)	17,91 ± 9,829 (93)	20,25 ± 12,59 (119)	21,81 ± 13,31 (32)	19,56 ± 11,75 (244)
DKK (ng/ml)	0,05643 ± 0,07973 (28)	0,09636 ± 0,1458 (33)	0,6129 ± 1,341 (7)	0,1331 ± 0,4482 (68)
OPG (pmol/l)	4,707 ± 1,800 (74)	4,987 ± 1,613 (95)	5,230 ± 1,926 (25)	4,911 ± 1,727 (194)
RANKL (pmol/l)	0,3502 ± 0,4564 (89)	0,4354 ± 0,5488 (107)	0,4222 ± 0,3838 (23)	0,3994 ± 0,4971 (219)

Preglednica XVII: Klinični podatki za premenopavzne preiskovanke po genotipskih skupinah.

	ins -/-	ins -/+	ins +/+	skupno
starost	44,52 ± 4,785 (23)	46,20 ± 4,358 (30)	45,50 ± 5,357 (6)	45,47 ± 4,614 (59)
ITM	25,32 ± 5,341 (23)	23,73 ± 3,000 (30)	24,57 ± 2,749 (6)	24,43 ± 4,065 (59)
MGK_vs (g/cm ²)	0,7900 ± 0,07308 (23)	0,7792 ± 0,08509 (30)	0,7872 ± 0,8103 (6)	0,7842 ± 0,07900 (59)
MGK_cel (g/cm ²)	0,9278 ± 0,08416 (22)	0,9090 ± 0,09206 (29)	0,9508 ± 0,1172 (6)	0,9207 ± 0,09115 (57)
MGK_lv (g/cm ²)	1,010 ± 0,1098 (23)	1,001 ± 0,1080 (30)	1,028 ± 0,1686 (6)	1,007 ± 0,1137 (59)
BALP (μg/l)	8,156 ± 2,667 (22)	8,430 ± 3,549 (29)	7,642 ± 2,229 (6)	8,242 ± 3,077 (57)
CTx (pmol/l)	2566 ± 1218 (21)	2789 ± 1498 (29)	2601 ± 1394 (6)	2684 ± 1368 (56)
OC (μg/l)	10,55 ± 3,692 (22)	10,94 ± 5,161 (29)	10,40 ± 5,486 (6)	10,73 ± 4,600 (57)
OPG (pmol/l)	4,017 ± 0,8889 (23)	3,850 ± 0,9649 (30)	4,327 ± 0,8618 (6)	3,963 ± 0,9223 (59)
RANKL (pmol/l)	0,4174 ± 0,2269 (23)	0,5767 ± 0,5581 (30)	0,3167 ± 0,1941 (6)	0,4881 ± 0,4332 (59)

Preglednica XVIII: Klinični podatki za zdrave pomenopavzne preiskovanke po genotipskih skupinah.

	ins -/-	ins -/+	ins +/+	skupno
starost	61,03 ± 8,620 (91)	62,37 ± 7,848 (104)	63,41 ± 9,116 (27)	61,95 ± 8,332 (222)
ITM	27,97 ± 4,869 (91)	28,96 ± 5,062 (104)	27,88 ± 5,547 (27)	28,43 ± 5,047 (222)
MGK_vs (g/cm ²)	0,7742 ± 0,1191 (91)	0,7597 ± 0,1274 (104)	0,7388 ± 0,09612 (27)	0,7631 ± 0,1207 (222)
MGK_cel (g/cm ²)	0,9318 ± 0,1248 (89)	0,9084 ± 0,1384 (104)	0,8753 ± 0,1083 (27)	0,9138 ± 0,1304 (220)
MGK_lv (g/cm ²)	0,9926 ± 0,1492 (90)	0,9639 ± 0,1369 (104)	0,9563 ± 0,1139 (27)	0,9747 ± 0,1394 (221)
BALP (µg/l)	12,13 ± 4,314 (21)	11,68 ± 3,015 (15)	11,31 ± 5,035 (7)	11,84 ± 3,951 (43)
CTx (pmol/l)	3621 ± 1866 (40)	4262 ± 1971 (44)	3545 ± 1520 (10)	3913 ± 1894 (94)
DKK (ng/ml)	0,06929 ± 0,1014 (14)	0,06000 ± 0,08691 (14)	0,04000 (1)	0,06379 ± 0,09124 (29)
OC (µg/l)	14,04 ± 5,403 (28)	15,21 ± 5,503 (31)	15,02 ± 5,835 (9)	14,71 ± 5,450 (68)
OPG (pmol/l)	4,438 ± 1,646 (30)	5,303 ± 1,430 (31)	4,660 ± 1,632 (9)	4,850 ± 1,584 (70)
RANKL (pmol/l)	0,3134 ± 0,3250 (44)	0,4349 ± 0,0,6124 (45)	0,4500 ± 0,3923 (10)	0,3824 ± 0,4824 (99)

Preglednica XIX: Klinični podatki za pomenopavzne osteoporozne preiskovanke po genotipskih skupinah.

	ins -/-	ins -/+	ins +/+	skupno
starost	65,92 ± 9,132 (90)	63,75 ± 7,665 (107)	63,94 ± 6,565 (32)	64,63 ± 8,174 (229)
ITM	26,13 ± 3,627 (89)	26,30 ± 4,044 (107)	26,90 ± 4,269 (32)	26,32 ± 3,910 (228)
MGK_vs (g/cm ²)	0,6230 ± 0,08652 (90)	0,6295 ± 0,07745 (107)	0,6089 ± 0,08620 (32)	0,6241 ± 0,08227 (229)
MGK_cel (g/cm ²)	0,7577 ± 0,09076 (90)	0,7530 ± 0,09992 (106)	0,7536 ± 0,1090 (32)	0,7549 ± 0,09733 (228)
MGK_lv (g/cm ²)	0,7519 ± 0,1008 (90)	0,7388 ± 0,08002 (106)	0,7246 ± 0,07930 (32)	0,7420 ± 0,08881 (228)
ALP (µkat/l)	1,079 ± 0,2827 (21)	1,056 ± 0,2778 (23)	0,9514 ± 0,1310 (7)	1,051 ± 0,2640 (51)
BALP (µg/l)	11,50 ± 5,264 (41)	13,88 ± 6,282 (52)	11,23 ± 3,473 (16)	12,60 ± 5,665 (109)
CTx (pmol/l)	4466 ± 2050 (22)	4428 ± 2612 (33)	3392 ± 1940 (7)	4324 ± 2347 (62)
Dpd (nmol/mmol kreatinina)	7,939 ± 4,482 (21)	6,941 ± 2,401 (20)	8,743 ± 3,395 (7)	7,640 ± 3,575 (48)
OC (µg/l)	24,19 ± 10,36 (43)	27,48 ± 13,55 (59)	29,42 ± 13,43 (17)	26,57 ± 12,51 (119)
DKK (ng/ml)	0,04357 ± 0,05063 (14)	0,1232 ± 0,1747 (19)	0,7083 ± 1,442 (6)	0,1846 ± 0,5844 (39)
OPG (pmol/l)	5,849 ± 2,230 (21)	5,702 ± 1,715 (34)	6,285 ± 2,267 (10)	5,839 ± 1,953 (65)
RANKL (pmol/l)	0,3536 ± 0,7713 (22)	0,3037 ± 0,4110 (32)	0,4729 ± 0,5123 (7)	0,3411 ± 0,5697 (61)

Preglednica XX: Klinični podatki za moške preiskovance po genotipskih skupinah.

	ins -/-	ins -/+	ins +/+	skupno
starost	66,96 ± 6,100 (54)	67,96 ± 6,232 (51)	68,75 ± 5,413 (12)	67,58 ± 6,075 (117)
ITM	28,42 ± 4,165 (54)	27,18 ± 3,207 (51)	28,12 ± 3,934 (12)	27,85 ± 3,767 (117)
MGK_vs (g/cm ²)	0,8531 ± 0,1726 (41)	0,7910 ± 0,1469 (41)	0,7261 ± 0,0827 (9)	0,8128 ± 0,1587 (90)
MGK_cel (g/cm ²)	1,070 ± 0,1828 (41)	1,002 ± 0,1443 (40)	0,9196 ± 0,09379 (9)	1,025 ± 0,1650 (90)
MGK_lv (g/cm ²)	1,082 ± 0,1758 (53)	1,041 ± 0,1831 (51)	1,009 ± 0,1397 (12)	1,057 ± 0,1763 (116)
CTx (pmol/l)	2270 ± 1192 (10)	1971 ± 1118 (6)	1386 ± 615,1 (4)	2003 ± 1086 (20)
OC (µg/l)	8,757 ± 5,889 (14)	11,56 ± 4,485 (7)	8,800 ± 3,216 (4)	9,548 ± 5,171 (25)
OPG (pmol/l)	5,120 ± 1,341 (14)	6,160 ± 2,110 (7)	5,448 ± 0,7569 (4)	5,4636 ± 1,540 (25)
RANKL (pmol/l)	0,171 ± 0,1069 (14)	0,214 ± 0,1215 (7)	0,150 ± 0,1291 (4)	0,180 ± 0,1118 (25)

Preglednica XXI: Klinični podatki za preiskovanke, zdravljene z alendronatom, po genotipskih skupinah.

	ins -/-	ins -/+	ins +/+	skupno
starost	67,41 ± 5,949 (22)	63,57 ± 7,005 (23)	64,86 ± 3,132 (7)	65,08 ± 6,624 (52)
ITM	26,55 ± 4,092 (22)	26,72 ± 3,465 (23)	26,31 ± 3,331 (7)	26,59 ± 3,661 (52)
MGK_cel (g/cm ²)	0,7390 ± 0,09356 (22)	0,7464 ± 0,1204 (23)	0,7047 ± 0,1085 (7)	0,7377 ± 0,1069 (52)
MGK_lv (g/cm ²)	0,7015 ± 0,07301 (22)	0,7151 ± 0,06283 (23)	0,6674 ± 0,1049 (7)	0,7029 ± 0,07371 (52)
BALP (µg/l)	12,25 ± 6,199 (22)	12,68 ± 5,459 (23)	11,72 ± 3,782 (7)	12,37 ± 5,520 (52)
Dpd (nmol/mmol kreatinina)	7,939 ± 4,482 (21)	6,941 ± 2,401 (20)	8,743 ± 3,395 (7)	7,640 ± 3,575 (48)
OC (µg/l)	22,90 ± 8,598 (22)	24,28 ± 9,227 (23)	26,54 ± 11,34 (7)	24,00 ± 9,150 (52)
dMGK_cel (%)*	4,47 ± 2,17 (20)	4,70 ± 4,01 (20)	1,96 ± 2,43 (6)	4,24 ± 3,20 (46)
dMGK_lv (%)*	6,81 ± 4,31 (20)	6,80 ± 4,86 (20)	4,96 ± 4,03 (6)	6,56 ± 4,48 (46)
dBALP (%)*	50,5 ± 36,7 (18)	40,0 ± 15,1 (13)	34,9 ± 6,78 (4)	44,8 ± 28,2 (35)
dDpd (%)*	79,5 ± 31,4 (21)	65,3 ± 29,1 (20)	55,0 ± 28,7 (7)	70,0 ± 30,8 (48)
dOC (%)*	58,5 ± 26,1 (20)	55,6 ± 20,5 (20)	51,0 ± 9,61 (6)	56,3 ± 21,9 (46)

* Sprememba vrednosti spremenljivke med enoletnim zdravljenjem v procentih.

Preglednica XXII: Klinični podatki za preiskovanke, zdravljene z raloksifenom, po genotipskih skupinah.

	ins -/-	ins -/+	ins +/+	skupno
starost	58,64 ± 6,652 (14)	61,00 ± 4,472 (24)	61,67 ± 6,062 (9)	60,43 ± 5,508 (47)
ITM	25,30 ± 3,760 (14)	26,07 ± 3,577 (24)	25,64 ± 3,399 (9)	25,76 ± 3,538 (47)
MGK_vs (g/cm ²)	0,6316 ± 0,06611 (14)	0,6362 ± 0,07109 (24)	0,6176 ± 0,1060 (9)	0,6313 ± 0,07592 (47)
MGK_cel (g/cm ²)	0,7375 ± 0,06708 (14)	0,7195 ± 0,09424 (24)	0,7409 ± 0,1424 (9)	0,7289 ± 0,09664 (47)
MGK_lv (g/cm ²)	0,7846 ± 0,07826 (14)	0,7459 ± 0,06549 (24)	0,7472 ± 0,08162 (9)	0,7578 ± 0,07313 (47)
BALP (µg/l)	9,978 ± 3,7247 (14)	14,58 ± 6,318 (23)	10,85 ± 3,395 (9)	12,44 ± 5,501 (46)
CTx (pmol/l)	4629 ± 1891 (14)	5779 ± 1793 (24)	4800 ± 1882 (9)	5249 ± 1881 (47)
OC (µg/l)	28,56 ± 10,32 (14)	37,92 ± 10,76 (24)	34,02 ± 13,31 (9)	34,39 ± 11,65 (47)
dMGK_vs (%)*	- 1,24 ± 3,38 (14)	- 1,00 ± 2,51 (24)	- 1,15 ± 5,82 (9)	- 1,10 ± 3,50 (47)
dMGK_cel (%)*	- 0,893 ± 2,97 (14)	2,08 ± 14,6 (24)	1,80 ± 3,13 (9)	1,14 ± 10,6 (47)
dMGK_lv (%)*	- 0,271 ± 3,20 (14)	- 0,282 ± 3,44 (24)	- 0,778 ± 3,54 (9)	- 1,67 ± 3,53 (47)
dBALP (%)*	1,65 ± 2,87 (13)	4,85 ± 6,15 (21)	2,94 ± 2,64 (8)	3,50 ± 4,91 (42)
dCTx (%)*	0,131 ± 0,141 (14)	0,210 ± 0,120 (23)	0,150 ± 0,180 (9)	0,174 ± 0,180 (46)
dOC (%)*	5,23 ± 6,74 (14)	11,2 ± 8,09 (23)	10,8 ± 11,3 (9)	9,27 ± 8,66 (46)

* Sprememba vrednosti spremenljivke med enoletnim zdravljenjem v procentih.

Preglednica XXIII: Referenčne vrednosti biokemijskih kazalcev kostne remodelacije.

biokemijski kazalec	referenčna vrednost
ALP	0,5 – 1,5 µkat/l
BALP	moški: 7,3 – 15,9 µg/l
	ženske pred menopavzo: 5,6 – 11,4 µg/l
	ženske po menopavzi: 7,8 – 17,2 µg/l
CTx	moški: 891-5797 pmol/L
	ženske pred menopavzo: 868-5719 pmol/L
	ženske po menopavzi: 1100-10470 pmol/L
Dpd	moški: 2,3-5,4 nM DPD/mM kreatinina ženske: 3,0-7,4 nM DPD/mM kreatinina
OC	3,1 – 13,7 µg/l