

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA LEDEN

**POVEZANOST POLIMORFIZMA C677T V MTHFR GENU Z MINERALNO
KOSTNO GOSTOTO**

**ASSOCIATION OF C677T POLYMORPHISM OF MTHFR GENE WITH BONE
MINERAL DENSITY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

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.

Zahvaljujem se mentorici, izr. prof. dr. Janji Marc, mag. farm. za strokovne nasvete in pomoč pri izvedbi diplomske naloge. Za koristne namige in praktične nasvete gre posebna zahvala tehnični sodelavki Majdi Osredkar, sam.strok.del., 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, oktober 2009

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec

Član diplomske komisije: doc. dr. Bojan Doljak

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|------|
| KAZALO VSEBINE..... | iii |
| POVZETEK..... | v |
| SEZNAM OKRAJŠAV..... | vi |
| SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC..... | viii |
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Okostje..... | 1 |
| 1.1.1. Kostnina (<i>Texus osseus</i>)..... | 1 |
| 1.1.2. Kostna premena (remodelacija)..... | 3 |
| 1.2. Osteoporoza..... | 5 |
| 1.2.1. Klinične oblike osteoporoze..... | 6 |
| 1.2.2. Diagnostika osteoporoze..... | 8 |
| 1.2.3. Zdravljenje osteoporoze..... | 9 |
| 1.2.4. Prevalenca osteoporoze v Sloveniji..... | 10 |
| 1.3. Genetika osteoporoze..... | 11 |
| 1.4. Encim MTHFR..... | 14 |
| 1.4.1. Fiziološka vloga MTHFR..... | 15 |
| 1.4.2. Gen za MTHFR..... | 16 |
| 1.4.3. Polimorfizem v genu za MTHFR..... | 17 |
| 1.4.3.1. Polimorfizem C677T MTHFR gena..... | 18 |
| 1.4.4. Genska analiza..... | 20 |
| 2. NAMEN DELA..... | 22 |
| 3. METODE DELA..... | 23 |
| 3.1. Preiskovanci..... | 23 |
| 3.2. Verižna reakcija s polimerazo..... | 23 |
| 3.2.1. Priprava reakcijske zmesi..... | 24 |
| 3.2.2. Potek PCR reakcije..... | 26 |
| 3.2.3. Preverjanje uspešnosti PCR reakcije z elektroforezo..... | 27 |
| 3.2.4. Detekcija PCR produktov..... | 30 |
| 3.3. Analiza dolžin restrikcijskih fragmentov..... | 30 |
| 3.3.1. Pogoji in izvedba restrikcije..... | 31 |
| 3.3.2. Analiza produktov restrikcije z elektroforezo..... | 33 |
| 3.4. Statistične metode..... | 37 |
| 3.4.1. Genotipske in alelne frekvence..... | 38 |
| 3.4.2. Hardy-Weinbergovo ravnotežje..... | 38 |
| 3.4.3. Kolmogorov-Smirnov test..... | 39 |
| 3.4.4. Hi-kvadrat test (chi-square)..... | 39 |
| 3.4.5. Fisherjev natančni test..... | 39 |
| 3.4.6. Analiza variance (ANOVA)..... | 40 |
| 3.4.7. Analiza kovariance (ANCOVA)..... | 40 |
| 4. REZULTATI IN RAZPRAVA..... | 41 |
| 4.1. Elektroforeza PCR produktov..... | 41 |
| 4.1.1. Uspešnost pomnožitve..... | 42 |
| 4.2. Elektroforeza produktov restrikcije..... | 42 |
| 4.2.1. Problematika RFLP..... | 43 |
| 4.3. Alelne in genotipske frekvence..... | 44 |
| 4.3.1. Alelne frekvence..... | 44 |
| 4.3.2. Primerjava genotipskih frekvenc med skupinami..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 4.4. Povezanost polimorfizma C677T v MTHFR genu z mineralno kostno gostoto (MKG) | 48 |
| 4.5. Vpliv polimorfizma C667T v MTHFR genu na uspešnost zdravljenja z alendronatom ter raloksifenom | 52 |
| 5. SKLEP | 54 |
| 6. LITERATURA | 56 |
| 7. PRILOGE | 59 |
| 7.1. Priloga 1: Rezultati genotipizacije | 59 |
| 7.2. Priloga 2: Genotipske frekvence | 62 |
| 7.3. Priloga 3: Klinični podatki preiskovancev po genotipskih skupinah | 65 |

POVZETEK

Osteoporozo je sistemska bolezen skeleta, katere pogostost narašča s starostjo. Na njen razvoj vplivajo okoljski in genski dejavniki. Ker je začetek bolezni tih in neopazen, ljudje sami ne zaznajo prisotnosti bolezni in je pogosto prvo opozorilo zlom. Preprečevanje zlomov, zgodnejše odkrivanje te bolezni in optimizacija zdravljenja so ključni aspekti študij na tem področju.

Polimorfizem C677T v genu za 5,10-metilentetrahidrofolat reduktazo (MTHFR), ki povzroča termolabilnost tega encima, naj bi vodil v povišano raven homocisteina v plazmi oziroma v hiperhomocisteinemijo. Nedavne študije povezujejo omenjen polimorfizem tudi z znižano mineralno kostno gostoto (MKG). Izmerjene vrednosti MKG pa predstavljajo zlati standard za diagnozo osteoporoze.

V okviru diplomske naloge smo določili genotipske frekvence polimorfizma C677T in ocenili njegov klinični pomen pri slovenski populaciji (599 žensk in 119 moških). Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnožili želeni odsek promotorja MTHFR, nato pa z analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) določili genotip preiskovancev.

Frekvence genotipov proučevanega polimorfizma C677T v MTHFR genu se pri Slovencih porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem. Ugotovili smo, da pri alelni frekvenci mutacije C677T med Slovenci in ostalimi evropskimi narodi (z izjemo Italijanov, Nemcev in Norvežanov) ni statistično značilne razlike. Določili smo sledečo pogostost genotipov CC : CT : TT = 44,4% : 44,2% : 11,4%. Posamezni genotipi se med nobenimi skupinami znotraj populacije niso statistično razlikovali. V naši raziskavi pa smo dokazali povezanost polimorfizma C677T z zvišano vrednostjo MKG kolka pri osteoporoznih preiskovankah starih od vključno 60 do 70 let (ANOVA, $p=0,041$). Prav tako smo dokazali povezanost polimorfizma C677T z zvišano MKG vratu stegenice pri osteoporoznih preiskovankah (ANCOVA, $p=0,047$) in pri pomenopavznih preiskovankah z osteoporozo (ANCOVA, $p=0,050$). Polimorfizem pa nima statistično značilnega vpliva na uspešnost enoletnega zdravljenja pomenopavznih osteoporoznih preiskovank z alendronatom in raloksifenom.

Naša raziskava se sicer pridružuje tistim, ki so dokazali povezanost polimorfizma C677T z MKG, vendar je smer te povezave v nasprotju s pričakovanji. Najbolj verjetna razlaga za take rezultate je, da je naš polimorfizem v vezanem neravnovesju z nekim drugim SNP-jem v njegovi bližini, ki močneje vpliva na MKG. Predlagamo, da raziskave na tem področju v prihodnje zajamejo večjo populacijo in doženejo povezavo MTHFR gena, plazemskega folata in plazemskega homocisteina z osteoporozo oz. z MKG.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|-------------------|---|
| 5-metilTHF | 5-metiltetrahidrofolat |
| 5, 10-metilen THF | 5, 10-metilentetrahidrofolat |
| AK | aminokislina |
| ANCOVA | analiza kovariance |
| ANOVA | analiza variance |
| bp | bazni par |
| BMD | Bone Mineral Density |
| C, Cys | cistein |
| CC | homozigot brez mutacije C677T |
| cDNA | DNA, sintetizirana iz RNA z rezervno transkriptazo |
| CT | heterozigot z mutacijo C677T |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| dTMP | deoksitimidin monofosfat |
| dUMP | deoksiuridin monofosfat |
| DXA | dual-energy X-ray absorptiometry |
| ETBr | etidijev bromid |
| EF | elektroforeza |
| FAD | flavin adenin dinukleotid |
| FADH ⁻ | flavin adenin dinukleotid (reducirana oblika) |
| ITM | indeks telesne mase |
| kb | kilobazni par |
| kDa | kilodalton |
| MKG | mineralna kostna gostota |
| MKG_cel | mineralna kostna gostota v predelu celotnega kolka |
| MKG_lv | mineralna kostna gostota v predelu ledvenih vretenc |
| MKG_vs | mineralna kostna gostota v predelu vratu stegenice |
| MTHFR | 5, 10-metilentetrahidrofolatna reduktaza |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo |

| | |
|-------|---|
| PTH | parathormon |
| RANKL | ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B |
| RFLP | Restriction fragment length polymorphism |
| SAM | S-adenozilmetionin |
| SD | standardna deviacija |
| SERM | selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SOST | gen, ki kodira protein sklerostin |
| SSCP | Single strand conformation polymorphism |
| SZO | Svetovna zdravstvena organizacija |
| XC | nanašalni pufer ksilen cianol |

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

Slike

- Slika 1:** Shematski prikaz kostnega pregrajevanja.
Slika 2: Obrazec za izračun T-vrednosti
Slika 3: Prerez 2. ledvenega vretenca pri 37 let starem moškem in 75 let stari ženski (primerjava).
Slika 4: Merjenje BMD z DXA.
Slika 5: Pristopi za ugotavljanje dednega nagnjenja k osteoporozi in drugim kompleksnim boleznim.
Slika 6: Shematski prikaz redukcije, ki jo katalizira encim MTHFR.
Slika 7: Reakcije v presnovni poti folata.
Slika 8: Kromosom 1 z označenim mestom, kjer se nahaja MTHFR gen.
Slika 9: Polimorfizmi MTHFR gena.
Slika 10: Alelne frekvence T677T populacij (v %) na različnih geografskih območjih in znotraj različnih rasnih/etičnih skupin.
Slika 11: Pomnoženi odsek DNA.
Slika 12: Slika zaporedja, ki ga cepi *HinfI*.
Slika 13: Prikaz cepitvenega mesta DNA fragmenta s *HinfI* in elektroforetske slike različnih restrikcijskih produktov: CC genotip, CT genotip in TT genotip.
Slika 14: Obrazca za izračun alelne frekvence posameznega alela v populaciji preiskovancev.
Slika 15: 2% agarozni gel po elektroforezi s PCR produkti.
Slika 16: 4% agarozni gel po elektroforezi s produkti restrikcije (negativ).

Preglednice

- Preglednica I:** Diagnoza osteoporoze (SZO)
Preglednica II: Glavne značilnosti obeh tipov involutivne osteoporoze.
Preglednica III: Zdravila za zdravljenje osteoporoze.
Preglednica IV: Dedovanje fenotipov kosti z vlogo pri osteoporozi.
Preglednica V: Pregled nekaj kandidatnih genov za osteoporozo.
Preglednica VI: Sestava reakcijske zmesi za PCR
Preglednica VII: Pogoji za verižno reakcijo PCR
Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za analizo *HinfI*-RFLP
Preglednica IX: Alelne frekvence za C in T alel pri skupini vseh preiskovancev in skupini preiskovank z osteoporozo
Preglednica X: Alelna frekvenca T alela mutacije C677T v genu za MTHFR pri različnih populacijah v Evropi in primerjava s Slovenci.
Preglednica XI: Primer ugotovljene in pričakovane genotipske frekvence pri premenopavznih preiskovankah
Preglednica XII: Vpliv polimorfizma na MGK pri preiskovankah.
Preglednica XIII: Izmerjene vrednosti MKG in spremembe vrednosti MKG pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom in raloksifenom
Preglednica XIV: Vpliv polimorfizma na zdravljenje z alendronatom in raloksifenom.
Preglednica XV: Rezultati genotipizacije preiskovank.
Preglednica XVI: Rezultati genotipizacije preiskovancev.
Preglednica XVII: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri slovenski populaciji.
Preglednica XVIII: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri moških.
Preglednica XIX: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri ženskah.
Preglednica XX: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri pomenopavznih ženskah.
Preglednica XXI: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri zdravih premenopavznih ženskah.

| | |
|----------------------------|---|
| Preglednica XXII: | Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri osteoporoznih ženskah. |
| Preglednica XXIII: | Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri ženskah, ki se zdravijo z raloksifenom. |
| Preglednica XXIV: | Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri ženskah, ki se zdravijo z alendronatom. |
| Preglednica XXV: | Klinični podatki za vse preiskovanke po genotipskih skupinah. |
| Preglednica XXVI: | Klinični podatki za premenopavzne preiskovanke po genotipskih skupinah. |
| Preglednica XXVII: | Klinični podatki za pomenopavzne preiskovanke po genotipskih skupinah. |
| Preglednica XXVIII: | Klinični podatki za osteoporozne preiskovanke po genotipskih skupinah. |
| Preglednica XXIX: | Klinični podatki za moške preiskovance po genotipskih skupinah. |
| Preglednica XXX: | Klinični podatki za moške preiskovance z osteoporozo po genotipskih skupinah. |
| Preglednica XXXI: | Klinični podatki za preiskovanke, zdravljene z alendronatom, po genotipskih skupinah. |
| Preglednica XXXII: | Klinični podatki za preiskovanke, zdravljene z raloksifenom, po genotipskih skupinah. |

1. UVOD

1.1. Okostje

Človeški skelet sestavljajo tako zrasle kot tudi posamezne kosti, podprte in dopolnjene z ligamenti, kitami, mišicami in hrustancem. Okostje ima skupno 206 kosti in pri odrasli osebi predstavlja okrog 13% celotne telesne teže, polovica od tega je voda.

Skelet opravlja več funkcij:

1. Opora: okostje daje telesu obliko in mu nudi oporo.
2. Gibanje: na kosti, ki omogočajo gibanje so prirasle skeletne mišice – sila, ki nastane pri krčenju in raztezanju mišic, se prenese na kost in slednja se premakne.
3. Varovanje: okostje varuje veliko vitalnih organov, kot so možgani, pljuča, srce.
4. Produkcija krvnih celic: rdeči mozeg je krvotvorno (hemopoetično) tkivo in v njem nastajajo vse vrste krvnih celic, zlasti rdeče.
5. Skladiščenje: kosti so glavno skladišče kalcijevih in fosfatnih ionov, kostni mozeg pa lahko skladišči železo in feritin.
6. Endokrina regulacija: iz kostnih celic se sprošča hormon osteokalcin, ki uravnava porabo krvnega sladkorja in nalaganje maščob.

1.1.1. Kostnina (*Texus osseus*)

Glavni sestavni del kosti je kostnina ali kostno tkivo. Kostno tkivo je trdo, vendar tudi prožno. Trdnost mu dajejo anorganske snovi (zlasti kalcijev fosfat), prožnost pa organske snovi (beljakovina kolagen). Na površini je iz goste masivne kostnine (kompaktno kostno tkivo), ki kot skorja obdaja luknjičavo, satovju podobno kostno sredico (kostna puhlica ali spongiozna substanca). Obe vrsti kostnine sta v vseh kosteh, le v različni količini (1,2).

Kostnina je specializirano vezivno tkivo zgrajena iz celic in medceličnine.

A. Za kostnino značilno ločimo anorgansko medceličnino in organsko oz. vlaknato medceličnino.

Kar 90 % organske medceličnine predstavlja kolagen tipa I., ki sestoji iz glicina, prolina in hidroksiprolina. Poleg kolagena sestavljajo organsko medceličnino še specifični glikoproteini, sialoproteini in osteokalcin, ki zelo dobro vežejo kalcijeve ione ter glikozaminoglikani, hondroitin-4-sulfat, hondroitin-6-sulfat in keratan sulfat (2,3).

Anorganske snovi predstavljajo 50% suhe teže kostnine. Najpogostejši so kalcijevi in fosfatni ioni, vendar pa najdemo v kostnini tudi bikarbonatne, citratne, magnezijeve, kalijeve in natrijeve ione. Kalcij in fosfor tvorita kristale hidroksiapatita in amorfni kalcijev fosfat. Površinski ioni kristalov hidroksiapatita, ki ležijo vzdolž kolagenskih vlaken, so dobro hidrirani, tako da se okoli njih tvori plašč iz vode in ionov, kar je pomembno za izmenjavo ionov med kristali in telesnimi tekočinami. Povezava kristalov hidroksiapatita in kolagenskih vlaken je odgovorna za trdnost in odpornost kostnine (2).

B. Poleg medceličnine grade kostnino štiri vrste celic (2).

1. Osteoprogenitorne celice so nediferencirane, nepravilno oblikovane celice, podobne fibroblastom. Izvirajo iz mezenhimskih celic, imajo veliko mitotsko aktivnost in se preoblikujejo v celice, ki tvorijo kostnino - osteoblaste.

2. Osteoblasti so celice, ki tvorijo organski, nemineralizirani, del kostne medceličnine, imenovan osteoid. Aktivni osteoblasti so polarizirane celice bazofilne citoplazme z veliko zrnatega endoplazemskega retikuluma in Golgijevega aparata. Ko se aktivni osteoblast obda z medceličnino, postane manj aktiven in se preoblikuje v osteocit.

3. Osteocit je celica, popolnoma obdana bodisi z osteoidom ali z mineralizirano kostno medceličnino. Med seboj osteociti komunicirajo s podaljški, na koncu katerih so presledkovni stiki. Podaljški ležijo v kanalčkih, ki jih obdaja medceličnina, *canaliculi ossei*. Ti kanalčki so pomembni tudi za preskrbo osteocitov, saj metaboliti ne morejo z difuzijo prehajati skozi zapnelo medceličnino. Ti izdelujejo organski matriks, sodelujejo pa tudi pri pripravi kalcijevega hidroksiapatita v obliko, ki je primerna za vezavo na organski matriks. To vezavo imenujemo mineralizacija kostnine.

4. Osteoklasti so do 100 µm velike celice s številnimi jedri (od 2 do 5 jeder), katerih funkcija je razgrajevanje kostne medceličnine in nastanek Howshipovih lakun. Nastanejo

iz usmerjene monocitno – makrofagne matične celice. Citoplazma osteoklasta vsebuje številne lizosome, ki vsebujejo kislino fosfatazo, kolagenazo, katepsin K in karboanhidrazo, s čimer si zagotavlja kislo okolje (pH 4.5) na mestu resorpcije. Zaradi kislega okolja se hidroksiapatit raztopi, kolagenska vlakna pa so tako izpostavljena encimski razgradnji. Osteoklasti razgrajujejo samo mineralizirano medceličnino, ne pa tudi osteoida.

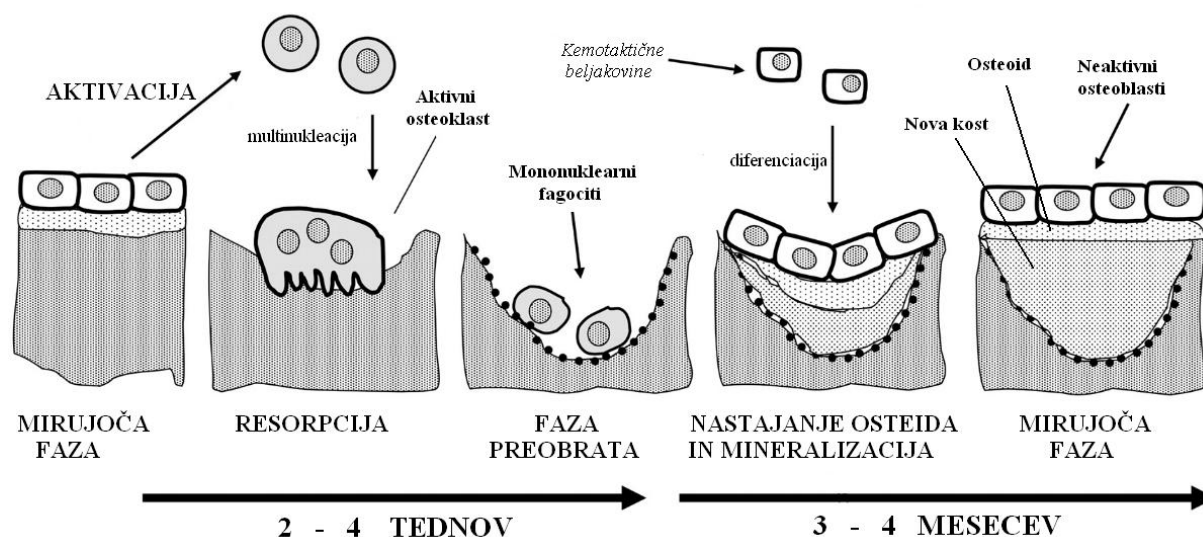
1.1.2. Kostna premena (remodelacija)

Kost se kot vsa druga tkiva v našem organizmu nenehno obnavlja, staro kostnino zamenjuje nova. Gre za kompleksni biološki proces, ki je odvisen od genetskih, hormonskih, metabolnih in starostno povezanih faktorjev. Ta kostna remodelacija (premena) ni tako hitra, kot v nekaterih drugih tkivih, vendar se nam v letu dni obnovi približno 10 % kosti, od tega 4 % kortikalne in 25 % trabekularne kosti (3,4). Remodelacija kosti omogoča celjenje mikrotravm, zagotavlja prožnost kosti in sproščanje kalcija v cirkulacijo, da bi bile zadoščene potrebe elektrolitskega ravnovesja v organizmu (3).

Ciklus remodelacije kosti obsega več faz (Slika 1) (2,3,4,5):

1. Faza mirovanja: kostno površino prekriva plast izredno tankih mirujočih osteoblastov.
2. Faza razgaljenja: pod vplivom stimulatorjev resorpcije kosti se sploščeni osteoblasti skrčijo in razgalijo kostno površino.
3. Faza aktivacije: razgaljena kost vsebuje kemične substance, ki privlačijo osteoklaste. Večjedrni osteoklasti migrirajo k razgaljeni površini kosti.
4. Faza kostne razgradnje: osteoklast se pritrdi na kostnino v stičnih točkah (podosomih) in si z aktivno razgradnjo kostne medceličnine izdolbe Howshipovo lakuno.
5. Faza preobrata: osteoklasti izginejo, na njihovo mesto pridejo mononuklearni fagociti, ki počistijo resorpcijsko votlino, zgladijo njeno dno in v njej odložijo cement.

6. Faza tvorbe novega osteida: kemotaktične beljakovine organskega matriksa sprožijo aktivacijo osteoblastov, ki tvorijo novo nemineralizirano kost – osteoid.
7. Faza mineralizacije: za mineralizacijo je potrebna visoka področna koncentracija kalcijevih in fosfatnih ionov nad praznimi vrednostmi. Osteoblasti izločajo matriksne vezikle, na katere se prično nalagati kristali hidroksiapatita. Področja mineralizacije rastejo, se zlivajo med seboj, dokler mineralizirana medceličnina popolnoma ne zapolni prostora med osteocitnimi lakunami.
8. Faza mirovanja: osteoblasti na površini novega osteida se sploščijo, nekateri osteoblasti, ki ostanejo med lamelami osteida, se pretvorijo v osteocite, nekaj pa jih preprosto izgine.



Slika 1: Shematski prikaz kostnega pregrajevanja

Na tvorbo in resorpcijo kosti družno vplivajo sistemski (PTH, kalcitriol, kalcitonin) in lokalni faktorji. Sistemski regulatorji so različni hormoni, ki uravnavajo nivo kalcija v serumu in obenem vplivajo na metabolizem kosti. Lokalni dejavniki delujejo v kosti med samimi kostnimi celicami ter med kostnimi celicami in celicami drugih tkiv, prisotnih v kosti (kri, kostni mozeg, endotelijske in hrustančne celice). Gre za številne citokine ter rastne faktorje (osteoprotegerina, RANKL, RANK, interlevkina 1, TNF katepsin K), ki omogočajo tesno sklopitev procesa resorpcije in formacije kostnine (2,3,5).

1.2. Osteoporoza

Osteoporoza je zloženka dveh grških besed »osteon« in »poros« in literarno pomeni poroznost kosti. Gre za kompleksno bolezensko stanje karakterizirano z nizko kostno gostoto in s spremenjeno mikroarhitekturno zgradbo kostnega tkiva, kar vodi do povečane kostne lomljivosti in občutljivosti za zlome (6). Pri osteoporozi je primarno prizadeto nastajanje organskega matriksa kosti, kot sekundarni učinek pa je zmanjšana tudi mineralizacija kosti, ker se ob izgubi kostnega matriksa kristali Ca hidroksiapatita nimajo kam vezati.

Mineralna kostna gostota (MKG), ki določa vsebnost mineralov v kosti, je močno povezana z obremenitveno sposobnostjo kolka in hrbtenice ter s tveganjem za zlome. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je predlagala definicijo, po kateri ima posameznik osteoporozo v primeru, da je njegova specifična teža kostnih mineralov (bone mineral density – BMD) ali vsebnost kostnih mineralov (bone mineral content – BMC) več kot 2,5 standardne deviacije znižana od največje gostote kosti v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso (preglednica I) (7).

Preglednica I: Diagnoza osteoporoze (SZO)

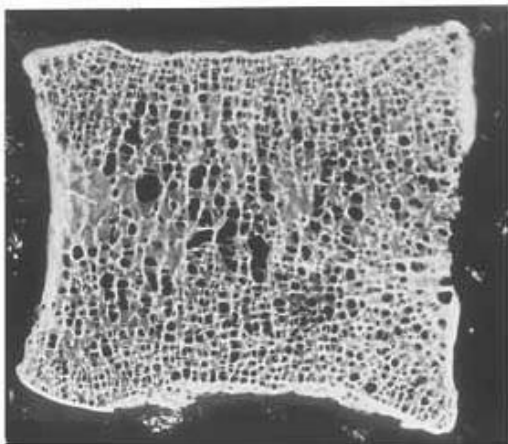
| Definicija (glede na MKG) | Izvid DXA |
|---------------------------|--|
| Normalna kost | T-vrednost ≥ -1 SD |
| Osteopenija | $-2,5$ SD < T-vrednost < -1 SD |
| Osteoporoza | T-vrednost $\leq -2,5$ SD |
| Huda osteoporoza | Osteoporozni zlom ne glede na T-vrednost |

$$T - \text{ vrednost} = \frac{\text{MKG bolnika} - \text{povprečna MKG mladih odraslih}}{\text{SD povprečna MKG mladih odraslih}}$$

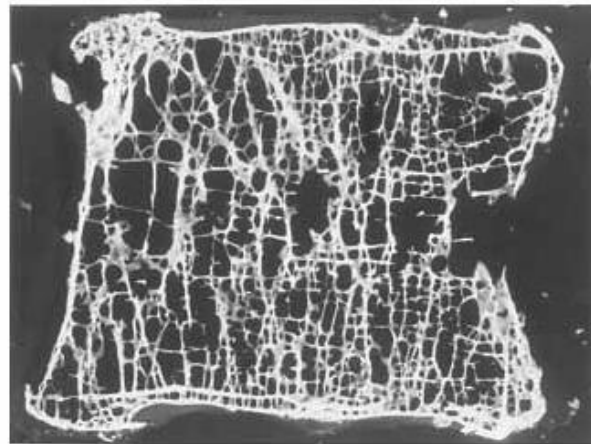
Slika 2: Obrazec za izračun T-vrednosti

Kost se kljub navidezni nespremenljivosti ves čas gradi in razgrajuje. V prvih dvajsetih letih življenja prevladuje aktivnost celic, ki kost gradijo. Kostna masa doseže svojo največjo gostoto v začetku tridesetega desetletja človekovega življenja. Konec četrtega desetletja sledi postopno upadanje kostne mase zaradi zmanjšane aktivnosti celic za tvorbo in povečane aktivnosti celic za razgradnjo kosti in njene mineralizacije. Temu sledi starostno pogojena izguba kostne mase, ki letno znaša od 0.5 do 1 % (0.5 % letno pri

moških in 1 % letno pri ženskah). Pri ženskah se po menopavzi kostna gostota zmanjšuje bistveno hitreje kot pri moških, v prvih 5 – 8 letih po menopavzi lahko doseže celo 3 – 5 % letno zmanjšanje! Statistično to pomeni, da po 50. letu vsaka druga ženska in vsak peti moški doživi zlom kosti kot posledica osteoporoze.



L2; 37 let star moški



L2; 75 let stara ženska

Slika 3: Prerez 2. ledvenega vretenca pri 37 let starem moškem in 75 let stari ženski (primerjava)

Najpogostejši in najpomembnejši osteoporozni zlomi so zlomi vretenc, kolka, zapestja in nadlahtnice. Nastanejo spontano ali pri manjši poškodbi in pomeni za bolnika pomembno poslabšanje kakovosti življenja in tako povzročijo različne stopnje odvisnosti in invalidnosti. Ti zlomi so za mnoge bolnike usodni, saj nepokretni bolniki pogosteje zbolevaro in umirajo zaradi pljučnic in embolij. Zaradi svoje množičnosti pa predstavlja tudi velik zdravstveno-ekonomski problem, saj ocenjujejo število obolelih v svetu kar na 75 milijonov. Samo v Evropi osteoporoza povzroči približno 3,5 milijona zlomov na leto, s tem povezani direktni stroški pa so ocenjeni na približno 30 milijard evrov. Strokovnjaki predvidevajo, da naj bi se do leta 2050 število zlomov povečalo na 6,3 milijona, s tem povezani stroški pa več kot podvojili (6).

1.2.1. Klinične oblike osteoporoze

Klinično delimo osteoporozo na dve veliki skupini, pogostejšo primarno (juvenilna, idiopatična in involutivna) ter sekundarno, ki se razvije kot posledica različnih bolezni ali delovanja toksičnih snovi na kost (3,4).

Primarna osteoporoza

Juvenilna osteoporoza je zelo redka in se razvije v predpubertetni dobi tako pri dečkih kot pri deklicah. Gre za pospešeno izgubo kostne mase. Bolezen traja od dveh do štirih let. Pomembno jo je razlikovati od bolezenske slike *Osteogenesis imperfecta* (3,7).

Idiopatična osteoporoza se razvije pri ženskah pred menopavzo in pri mlajših moških. Glavne posledice so zlomi vretenc in reber (3).

Od vseh vrst je najpogostejša involutivna osteoporoza, ki se pojavi ob staranju. Skupina involutivne osteoporoze je zelo heterogena in jo delimo v dve skupini: tip I ali pomenopavzno osteoporozo in tip II ali senilno osteoporozo. Razdelitev ima osnovo v različnih kliničnih pojavnih oblikah in hormonskih spremembah (preglednica II) (3).

Preglednica II: Glavne značilnosti obeh tipov involutivne osteoporoze

| Parametri | Tip I | Tip II |
|-----------------------|----------------------|----------------------------|
| Starost (leta) | 51 – 70 | nad 70 |
| spol Ž : M | 6 : 2 | 2 : 1 |
| Izguba kosti | trabekularna | trabekularna in kortikalna |
| Hitrost izgube kosti | pospešena | počasna |
| Tipična mesta zlomov | vretenca, koželjnica | vretenca, kolki |
| paratiroidna funkcija | znižana | zvišana |

Sekundarna osteoporoza

Poleg staranja in menopavze so prisotni še drugi dejavniki, ki povzročajo zmanjšanje MGK. Vzrok najdemo v drugi osnovni bolezni ali dokazljivih negativnih vplivih na presnovo kosti. Najpogostejši vzroki za nastanek sekundarne osteoporoze so:

- Endokrine bolezni: hipogonadizem, hiperkorticizem, hipertiroza, hiperparatiroidizem,...
- Bolezni prebavil: celiakija, gastrektomija, malabsorpcijski sindrom, kronični hepatitis,...
- Bolezni kostnega mozga: multipli mielom, mastocitoza
- Sistemske vezivnotkivne bolezni: revmatoidni artritis
- Genetski dejavniki
- Ostali vzroki: anoreksija, imobilizacija, kajenje, alkohol
- Zdravila: glukokortikoidi, antiepileptiki, heparin, ščitnični hormoni

Od vseh osteoporoz jih samo 5 % spada med sekundarne oblike, pogostejša pa je pri moških kot pri ženskah.

1.2.2. Diagnostika osteoporoze

Osteoporoza predstavlja trd diagnostični oreh, saj bolezen poteka zelo dolgo asimptomatsko; je le ena od številnih bolezni z zmanjšano kostno gostoto in nima neposredno diferencialno diagnostične preiskave ali testa za njeno potrditev.

Napreduvalno stopnjo bolezni lahko diagnosticiramo z rentgenskim slikanjem hrbtenice, običajno torakolumbalnega predela, ki kaže difuzno zmanjšano gostoto skeleta in patološke zlome vretenc. Vendar prve znake osteoporoze je potrebno iskati mnogo prej. Diagnostični postopek je obsežen in ga je zato smiselno izvajati v posameznih korakih. Temelji na iskanju znakov bolezni in izključevanju patoloških dogajanj s sekundarnim vplivom na kostni presnovo.

Ocenjujejo, da je 60 do 80 % odpornosti kosti za zlom odvisno od kostne mase, ki je izražena kot kostna vsebnost mineralov, ali pogosteje kot mineralna kostna gostota (MKG) v gramih na cm^2 , da s površinsko gostoto deloma zmanjšamo vpliv velikosti kosti.

Standardna metoda za oceno kostnega tkiva je merjenje MKG-ja z dvoenergijsko rentgensko absorpciometrijo (DXA), pri kateri prepuščeno rentgensko sevanje merimo s posebnimi senzorji, tako da lahko za vsako merjeno točko določimo količino prepuščenega sevanja (slika 3). Naprave same določijo mejo kosti, zaradi uporabe rentgenskih žarkov dveh energij pa lahko izničijo vpliv mehkih tkiv. Z DXA običajno merimo nad ledveno hrbtenico in kolkom, lahko pa merimo tudi vse telo. Gre za neinvazivno, hitro, varno in natančno metodo, ki nam omogoča postavitev diagnoze, prognoze in spremljanje zdravljenja (8).



Slika 4: Merjenje BMD z DXA

Z ugotovitvijo nizke MKG se postavljanje diagnoze še ne konča. Možen vzrok znižanja MKG je poleg osteoporoze tudi pomanjkanje vitamina D (osteomalacija), ki ga je treba izključiti z laboratorijskimi preiskavami. Laboratorijske preiskave v serumu oz. krvi in urinu so pomembne tudi za opredelitev samega vzroka znižanja MKG in izključitve bolezni, ki povzročajo sekundarno osteoporozo.

Današnja diagnostika osteoporoze se razvija v smeri odkrivanja vpliva genetskih dejavnikov; osteoporoza je namreč poligenska in polifaktorska bolezen. Na njen razvoj (so)vpliva več genov in hkrati tudi drugi ne-genski faktorji, kot je telesna neaktivnost, neustrezno prehranjevanje, zdravila, škodljive navade, nezadostna izpostavljenost soncu.

1.2.3. Zdravljenje osteoporoze

Namen zdravljenja je upočasniti/preprečiti kostno razgradnjo, zvečati kostno maso, preprečevati nove zlome ob enem že dokazanem osteoporoznem zlomu, omiliti kostne bolečine in zvečati pokretnost prizadetih bolnikov. Osteoporozo zdravijo z različnimi skupinami zdravil, ki imajo tudi različni način delovanja. Doslej so bila zdravila za

zdravljenje osteoporoze razdeljena v dve veliki skupini, glede na to, kako delujejo na kost. V eni skupini so zdravila, ki delujejo proti razgradnji kosti, v drugi pa so zdravila, ki spodbujajo njihovo tvorjenje (preglednica III). Danes so prizadevanja raziskovalcev ves čas usmerjena v to, da bi dobili zdravilo, ki bi ne le zaviralo razgradnjo kosti, temveč do neke mere tudi nadomestilo izgubljeno kostnino. Pri nas prvo registrirano zdravilo, ki učinkuje obojestransko, je stroncijev ranelat.

Preglednica III: Zdravila za zdravljenje osteoporoze

| Zaviralci resorpcije kosti | Pospesevalci tvorbe kosti | Kombiniran učinek |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Estrogeni | fluoridi | stroncijev ranelat |
| SERM (raloksifen) | rastni faktorji | |
| Kalcitoni | teriparatid | |
| bifosfonati (alendrolat, risedronat) | | |
| Kalcij | | |
| Vitamin D | | |

Zdravljenje pomenopavzne osteoporoze temelji na preprečevanju kostne resorpcije, ki je po menopavzi zaradi padca estrogenov v krvi močno zvečana. Dolgo časa je pri ukrepanju na prvo mesto sodilo HNZ (hormonsko nadomestno zdravljenje), ki pa je zaradi kombiniranega učinka nezaželenih pojavov (invazivni rak dojke, možganska kap, pljučna embolija), ki prevladajo nad koristmi, izgubilo svoj pomen in se danes izvaja le kratkotrajno ter pri ženskah z zgodnjo menopavzo.

Danes so zdravila prve izbire za zdravljenje pomenopavzne osteoporoze bifosfonati. Delujejo izključno na kosti kot močni zaviralci kostne razgradnje, saj z vezavo na kristale hidroksiapatita neposredno zavirajo delovanje osteoklastov in povečajo njihovo apoptozo. Raloksifen deluje kot estrogenski agonist na kosti in lipide in kot antagonist na maternico in dojke. V kosti zmanjša število in aktivnost osteoklastov ter zmanjšuje tveganje za vertebralne zlome.

1.2.4. Prevalenca osteoporoze v Sloveniji

Leta 2006 se je končala prva prevalenčna raziskava o osteoporozi v Sloveniji, ki je trajala eno leto in pol. V raziskavi, ki je zajela vso državo po vseh regijah, je bilo obravnavanih 610 oseb. Ženske so bile stare 50 let ali več, moški pa 60 let ali več. Ugotovili so, da je

prevalenca osteoporoze dokaj visoka. V absolutnem smislu je 34 odstotkov sodelujočih imelo normalen izvid, 43 odstotkov ljudi je imelo osteopenijo, ostali, torej 23 odstotkov, pa je že imelo osteoporozo. Ugotovili so, da incidenca narašča s starostjo. Najbolj so presenetili izsledki pri moških, saj je do takrat veljalo prepričanje, da je osteoporozo bolezen žensk. Najnovejše ocene in izsledki različnih raziskav po vsem svetu pa kažejo, da se število moških z osteoporozo že približuje položaju, ki velja za ženske. Ugotovili so namreč, da ima skoraj 17 odstotkov moških v starosti nad 60 let osteoporozo, žensk pa je 28 odstotkov.

Raziskovalce je zanimalo tudi to, koliko od ljudi, pri katerih so ugotovili osteoporozo, ima že postavljeno diagnozo. Izkazalo se je, da je ta odstotek razmeroma majhen, saj je bilo takih ljudi le slaba tretjina (32).

1.3. Genetika osteoporoze

Pomembna obravnava genetskih faktorjev se odraža že z dejstvom, da imajo bolniki z osteoporozo v večini primerov pozitivno družinsko zgodovino za to bolezensko stanje. Izsledki iz študij dedovanj pri dvojčkih in družinah nam kažejo, da je biološka variacija pri kostni gostoti in pri drugih kostnih fenotipih med 50% in 80% (9,10).

Osteoporozo, kot ostale genetsko kompleksne bolezni, je rezultat mnogovrstnih genetskih in okoljskih vplivov ter njihovih interakcij. Med domnevane gene, ki naj bi igrali pomembno vlogo pri razvoju osteoporoze, najdemo gene, ki so vpleteni v kostno izgradnjo in njeno remodelacijo (LRP5), gene vpletene v hormonsko signalizacijo (VDR, ESR1) in tiste, ki kodirajo strukturne proteine kosti (COL1A1) (9).

Vendar imeti pozitivno družinsko zgodovino za to bolezen še ne pomeni, da gre za genetski vzrok, če pri tem upoštevamo, da obstaja hkrati velika verjetnost, da družina živi v istem okolju. Študije dvojčkov nam omogočajo način analiziranja relativne vloge tako genov kot samega okolja. Prednost takih študij je v tem, da imajo enojajčni (MZ) dvojčki 100% enake gene, medtem ko si dvojajčni dvojčki delijo 50% enakega genetskega materiala. Če je za specifično značilnost, kot je MKG (ali bolezen), pomembna genetska komponenta, bi naj bila podobnost/verjetnost le te med enojajčnimi dvojčki večja kot pri dvojajčnih dvojčkih, kar naj bi odrazilo pomembnost deljenih genov v nasprotju z

deljenjem istega okolja pri povzročitvi bolezenskega stanja. Izsledki študij pri dvojčkih nam odkrivajo kar nekaj fenotipov, ki naj bi bili relevantni s patogenezo osteoporoze in imajo hkrati genetsko komponento: MKG, biokemični markerji kostne remodelacije in sama geometrija glave stegenice. Tveganje za zlom ima sicer manjšo genetsko predispozicijo, saj pri tem igrajo večjo vlogo sami faktorji iz okolja, kot so padci.

Preglednica IV: Dedovanje fenotipov kosti z vlogo pri osteoporozi

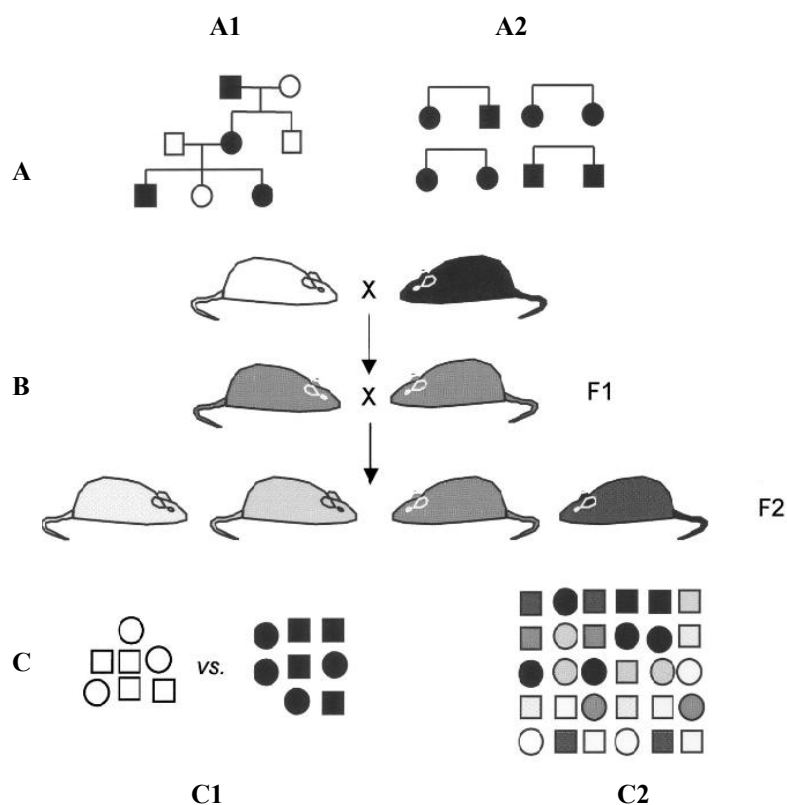
| Fenotip | Dednost (v %) |
|---------------------|---------------|
| MGK | 50 - 80 |
| Biokemični markerji | 40 - 70 |
| Geometrija kolka | 70 - 85 |
| Tveganje za zlom | 25 - 35 |

Osteoporoza je kompleksna bolezen, ki ne sledi osnovam Mendlove genetike, so pa po vsej verjetnosti prisotne interakcije med multipli geni in okoljem. Obstoječe metode za gensko kartiranje kompleksnih lastnosti so: analiza vezanega (linkage) dedovanja v družinskih in sib parih, analize vezanega dedovanja pri sorodnih vrstah miši (živalski modeli) in asociacijske študije kandidatnih genov pri nesorodnih individuumih (9,10,11) (slika 5). Cilj vseh je odkriti gen oz. gensko spremembo, ki (z veliko verjetnostjo) vpliva na kakovost kostnine.

Vsaka od teh metod ima svoje prednosti in pomanjkljivosti.

Analize vezanega dedovanja preiskujejo prisotnost mutacije pri bolnih oziroma zdravih sorodnikih različnih generacij. Te študije so statistično robustne in redko dajejo napačne pozitivne rezultate, vendar pa imajo omejeno moč detektiranja genov z zmernimi učinki, kot velja za te vključene v patogenezo osteoporoze.

Analize vezanega dedovanja pri miših (modelni organizmi) predstavljajo pravi način za detekcijo lokusa kompleksnih boleznih; komponenta okolja se lahko skrbno kontrolira, kar zmanjša vpliv negenetskih dejavnikov. Generiramo lahko velik zarod, ki je pomemben dejavnik statistične kredibilnosti, in pri tem je ustvarjena odlična genska karta s ponovljivim vzratnim križanjem v smer starševske linije. Pomanjkljivost te metode je, da geni, ki regulirajo MKG pri miših, lahko niso enaki genom, ki regulirajo MKG pri ljudeh.



Slika 5: Pristopi za ugotavljanje dednega nagnjenja k osteoporozi in drugim kompleksnim boleznim: A) Analize vezanega dedovanja (A1 – v družinskih parih, A2 – v sib-parih); B) Vezano dedovanje na živalskih modelih (F1 – prva generacija potomcev, F2 – druga generacija potomcev); C) Asociacijske študije (C1 – primerjava bolnikov in kontrolne skupine, C2 – populacijska študija) (10,11).

Asociacijske študije kandidatnih genov so relativno enostavno izvedljive in lahko identificiramo gene z majhnim vplivom na določen fenotip. Predstavljajo 90% vseh študij na področju genetike osteoporoze. Pri kandidatnemu genu ugotavljamo povezanost genotipa (prisotnost ali odsotnost mutacije oz. polimorfizma) s fenotipom, npr. z MKG. Glavna pomanjkljivost je možnost napačnih pozitivnih (ali napačnih negativnih) rezultatov zaradi zavajajočih dejavnikov in zaradi stratifikacije populacije.

Številne študije kandidatnih genov v povezavi z osteoporozo so bile že izvedene, na žalost gre v mnogih primerih za majhne, slabo zasnovane študije. Geni, prikazani v spodnji tabeli (preglednica V), so bili izbrani na osnovi svojih funkcijskih učinkov na regulacijo metabolizma kalcija, na kostno remodelacijo in kostni matriks. Trenutni izsledki študij nam kažejo, da ima večina kandidatnih genov za polimorfizem, le zmeren učinek na MKG

in ostale fenotipe povezane s patogenezo osteoporozе. Zahtevana velikost vzorca za študije genetskih učinkov naj bi štela vsaj 500 do 1000 ljudi, odvisno katera alelna frekvenca polimorfizma se pri tem proučuje.

Preglednica V: Pregled nekaj kandidatnih genov za osteoporozo

| SKUPINA | KANDIDATNI GEN |
|---------------------------------------|------------------------|
| <i>1. Hormoni in receptorji</i> | Receptor za vitamin D |
| | Receptor za estrogen |
| | Receptor za androgen |
| | PTHr1 |
| | PTH |
| | Receptor za kalcitonin |
| | TNFRSF11B |
| | Receptor za kalcij |
| | LRP5 |
| | PPAR γ |
| <i>2. Citokini in rastni faktorji</i> | aromataza |
| | IL-1 |
| | IL-1 α |
| | IL-6 |
| | TGF β |
| <i>3. Kostni matriks</i> | SOST |
| | COLIA1 |
| | Kolagenaza |
| | Alfa-2-HS-glikoprotein |
| | osteokalcin |
| | Apolipoprotein E |

1.4. Encim MTHFR

5,10-metilentetrahidrofolatna reduktaza (MTHFR) (E.C. 1.5.1.20) je eden izmed ključnih encimov v presnovni poti folata oz. usmerjanju skupin C1 v smer nastanka SAM (remetilacija homocisteina) ali v biosintezo DNA. Spada med oksidoreduktaze, v družino metilentetrahidrofolat reduktaz, in ima vezano prostetično skupino FAD (flavoprotein). Dolžino aminokislinskega zaporedja sestavlja 656 aminokislin (13).

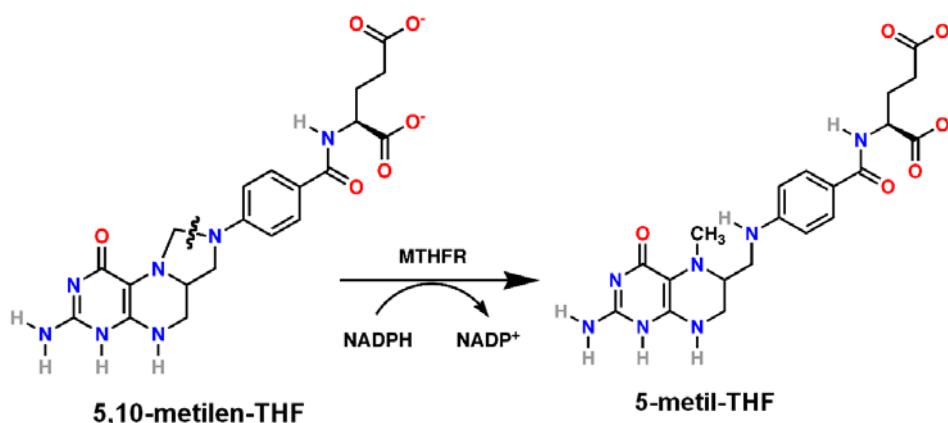
Encim so začeli podrobneje proučevati v zgodnjih 70-ih, ko so odkrili povezavo med dednimi okvarami encima in motenim metabolizmom homocisteina, kar posledično vodi v hiperhomocisteinemijo.

Človeški encim je homodimer, ki ga sestavljata dve 77 kDa podenoti. V človeških tkivih je pa bil prav tako odkrit katalitično aktiven 70 kDa polipeptid, ki nakazuje na prisotnost izoencimov MTHFR (24).

Polipeptid ima N-terminalno katalitično domeno in C-terminalno regulatorno domeno. Alosterične interakcije, med regulatorno domeno ene podenote in katalitično domeno druge, modulirajo afiniteto flavinskega kofaktorja. SAM, ki se veže na regulatorno domeno, vpliva na afiniteto katalitične domene za FAD (13).

1.4.1. Fiziološka vloga MTHFR

Citoplazemski encim MTHFR katalizira ireverzibilno redukcijo 5,10-metilen-tetrahidrofolata (N^5,N^{10} -metilen-THF) v 5-metil-tetrahidrofolat (N^5 -metil-THF), pri čemer se skupina C1 usmeri v sintezo dTMP preko encima timidilat sintaze (slika 6, slika 7).

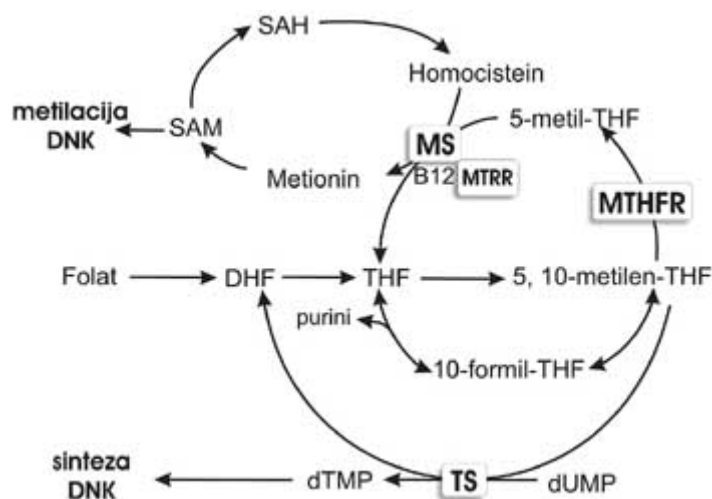


Slika 6: Shematski prikaz redukcije, ki jo katalizira encim MTHFR

Reakcija poteka po mehanizmu dvojne premestitve, kjer se hidridni ion (H^-) iz NADPH prenese na kofaktor encima FAD, ta pa ga nadalje premesti na 5,10-metilen-tetrahidrofolat. Reducirana oblika flavina $FADH^-$ je obstojna le malo časa in hitro preide nazaj v oksidirano obliko.

5,10-metilen-THF služi kot donor metilne skupine pri reduktivni metilaciji dUMP v dTMP, ki je prekursor osnovnega gradnika v sintezi DNA, timidin trifosfata. Vir 5,10-MTHF je tetrahidrofolat, ki ga dobimo kot folno kislino s hrano oz. s pomočjo črevesnih mikroorganizmov ali pa nastane iz dihidrofolata (26).

5-metil-THF, ki je prevladujoča oblika folata v krvi, pa predstavlja substrat za remetilacijo homocisteina v metionin. Nastali metionin se pretvori v SAM (S-adenozilmetionin), ki je univerzalni celični donor metilne skupine za številne metiltransferaze (slika 7).

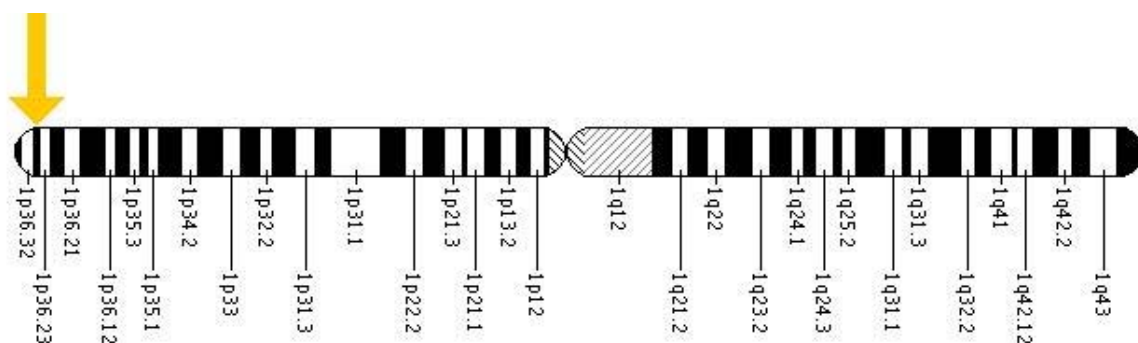


Slika 7: Reakcije v presnovni poti folata.

Encimska aktivnost je alosterično regulirana glede na koncentracijo metionina v celici s S-adenozil-metioninom (SAM), ki je inhibitor encima. Remetilacijska pot se sproži takrat, ko je koncentracija SAM v krvi nizka. Kadar pa je koncentracija SAM v krvi visoka, se homocistein presnavlja po transulfuracijski poti.

1.4.2. Gen za MTHFR

Leta 1994 so s pomočjo prašičje RNA izolirali MTHFR zaporedje dolžine 2,2 kb z 11 eksoni (Goyette et al.). Omenjena cDNA je bila osnova za odkritje mnogih mutacij in njihovega poimenovanja.



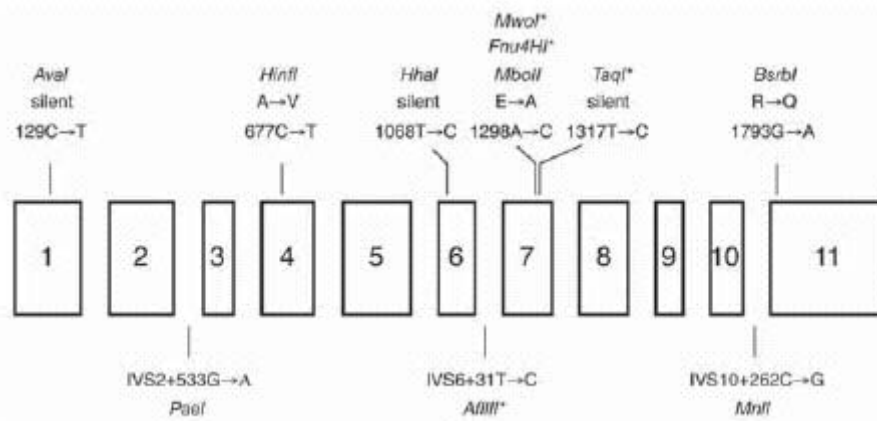
Slika 8: Kromosom 1 z označenim mestom, kjer se nahaja MTHFR gen

MTHFR gen se nahaja na kratki (p) ročici 1. kromosoma na mestu 36.3., točneje od 11.769.246 baznega para do 11.788.568 baznega para (slika 8). Sestavlja ga 11 eksonov dolžine od 102 bp do 432 bp ter 10 intronov dolžine od 250 bp pa vse do 4,2 kb. Kodirajoča regija je dolga 1980 bp in kodira za protein molekularne mase 74,6 kDa (23,24).

1.4.3. Polimorfizem v genu za MTHFR

O genskem polimorfizmu lahko govorimo, kadar sta v populaciji prisotna najmanj dva alela in ima redkejši frekvenco vsaj 1 %. Posledica genskih polimorfizmov je različna aktivnost encimov oz. stabilnost proteinov, za katere polimorfen gen nosi zapis.

Kloniranju MTHFR kodirajočega zaporedja je prvotno sledila identifikacija škodljivih mutacij pri pacientih s homocistinurijo. Trenutno je bilo na genu za MTHFR predstavljenih 34 redkih, vendar škodljivih mutacij, kot tudi 9 pogostih polimorfizmov (slika 9). Do danes sta bila v genu za MTHFR identificirana in karakterizirana dva funkcionalna polimorfizma, 677C→T na eksonu 4 in 1298A→C na eksonu 7. Poleg tega so bile predstavljene še: drugačnopomenska mutacija (1793G→A na eksonu 11), tri tihe mutacije (129C→T na eksonu 1, 1068T→C na eksonu 6 in 1317T→C na eksonu 7) in trije polimorfizmi intronov (IVS2+533G→A, IVS6+31T→C in IVS10+262C→G), vendar njihova funkcionalna implikacija ostaja še neznan (12).

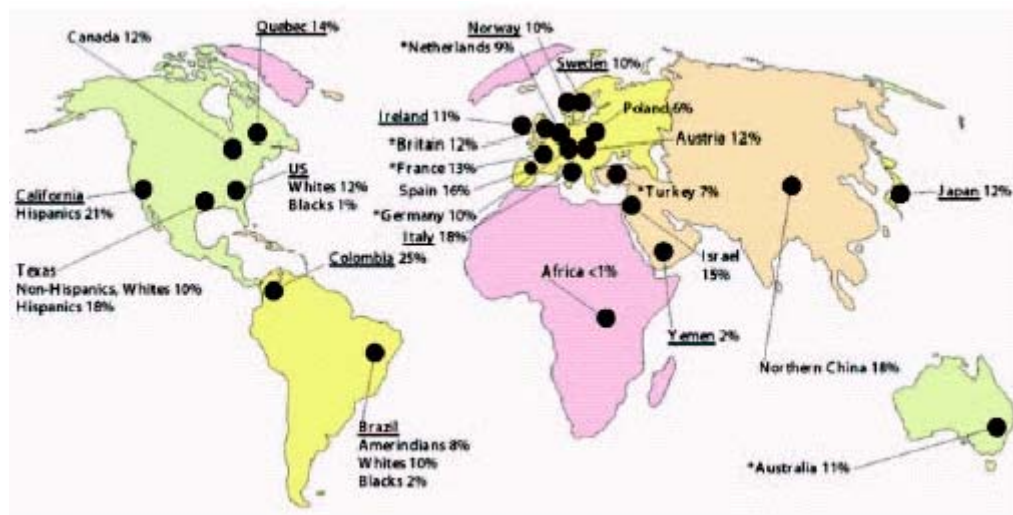


Slika 9: Polimorfizmi MTHFR gena: vzdolž eksonov (1 – 11) so indicirane pozicije SNP-jev, skupaj z zamenjanima nukleotidoma oz. s spremenjeno aminokislino in restrikcijskimi encimi za njihovo detekcijo.

1.4.3.1. Polimorfizem C677T MTHFR gena

Polimorfizem C677T v eksonu 4 povzroči substitucijo alanina v kodonu 222 z valinom in s tem spremeni vezavno mesto za kofaktor flavin adenin dinukleotid. Nastali encim je termolabilen in ima zmanjšano aktivnost (12,13).

Mutacija C677T se po svetu pojavlja relativno pogosto, le ta pa je različna tako po geografskih območjih, kot tudi med različnimi etničnimi skupinami. Kot je razvidno iz spodnje slike (slika 10), je alelna frekvenca visoka pri Italijanih ter pri Hispanicih iz Kalifornije in Kolumbije, nizka pa pri Afričanih in temnopoltih v Braziliji ter ZDA. Razlogi za take razlike v prevalenci pri nekaterih populacijah niso znani (13).



Slika 10: Genotipske frekvence T677T populacij (v %) na različnih geografskih območjih in znotraj različnih rasnih/etičnih skupin.

Posamezniki z genotipom 677TT imajo ohranjene 35 %, posamezniki z genotipom 677CT pa 60 %, *in vitro* aktivnosti encima glede na normalni genotip 677CC. Zmanjšana aktivnost encima se odraža v manj učinkoviti remetilaciji homocisteina v metionin, kar pri TT homozigotih lahko privede do kopičenja homocisteina in s tem do blage hiperhomocisteinemije, predvsem ob nizkem vnosu folatov. Slednja izzove oksidativni stres in predstavlja neodvisni dejavnik tveganja za bolezni srca in ožilja, povezan je z razvojem nekaterih duševnih bolezni (depresija, shizofrenija), degenerativnih bolezni živčevja (Alzheimerjeva bolezen), migreno, trombofilijo, preeklampsijo in motnjami v razvoju okostja, kot sta okvara nevralne cevi in volčje žrelo.

Polimorfizem C677T MTHFR gena preko nižje aktivnosti encima vodi v povečano razpoložljivost 5,10-metilen-THF in zmanjšano razpoložljivost 5-metil-THF. Povečana razpoložljivost 5,10-metilen-THF pomeni več gradnikov za purinsko sintezo in s tem popolnejšo pretvorbo dUMP v dTMP, kar lahko pomeni zmanjšan pojav napak v kromosomih ali pospešeno popraviljanje DNA. Po drugi strani pa naj bi zmanjšana razpoložljivost 5-metil-THF, ki preko znižane remetilacije homocisteina vodi v nižjo raven SAM v celici, povzročila hipometilacijo proteinov in DNA. S tem mehanizmom je lahko povezan tudi vpliv mutacij na razvojne ali rakave bolezni (17).

Obstajajo tudi epidemiološki dokazi za interakcijo med genetskimi in okoljskimi faktorji, med katere prištevamo biološko razpoložljivost vitaminov, ki naj bi vplivali na raven

homocisteina in morda imeli direkten vpliv na kostne celice. V zvezi s tem je bila opisana interakcija med MTRHFR genotipom in razpoložljivostjo riboflavina in folata. Tukaj gre za biološko verjetno interakcijo, saj so vitamini kot kofaktorji vključeni v encimske reakcije metionin-homocistein metabolične poti (14).

Nekaj študij je potrdilo asociacijo med osteoporozo in aterosklerozo. Homocistein naj bi bil kot eden od bioloških mehanizmov povezan z nagnjenostjo do obeh bolezenskih stanj, oz. njegova zvišana koncentracija naj bi bila povezana tako s krvožilnimi kot tudi s kostnimi boleznimi (14).

Kolagen tipa I je sestavni del osteoida, ki ga sintetizirajo osteoblasti. Nekatere *in vitro* študije so pokazale da homocistein moti navzkrižno povezovanje kolagena in slabša kostno mineralizacijo: preprečuje netopnost fibril, inhibira lizil oksidaze in lahko preprečuje sintezo bolj kompleksnih navzkrižnih povezav v kolagenu (15,16).

V povezani s kostno formacijo je Sakamoto dokazal, da homocistein znižuje sekrecijo osteokalcina v preosteoblastnih celicah, na drugi strani pa zvišuje sekrecijo osteopontina. Herrmann pa je opazil povečano aktivnost osteoklastov ob zvišani koncentraciji homocisteina (18).

1.4.4. Genska analiza

Metode za določevanje sprememb nukleotidnega zaporedja v izbranih genih najpogosteje temeljijo na pomnoževanju odseka DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Za ugotavljanje prisotnosti znane točkaste mutacije ali polimorfizma na preiskovanem odseku DNA lahko uporabimo več metod: analiza polimorfizmov konformacij ene verige (SSCP), analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), heterodupleks analiza in ostale metode, ki temeljijo na spremenjenih lastnostih odseka DNA, ki je posledica mutacije ali polimorfizma.

Ob odkritju nove spremembe nukleotidnega zaporedja pogosto najprej poiščejo primerno PCR/RFLP metodo za določanje, ker je enostavna in ne potrebuje drage in posebne opreme. Poleg PCR/RFLP metode je za določanje prisotnosti polimorfizma ali mutacije

uporabna tudi metoda, ki temelji na pomnoževanju brez uporabe restrikcijskih encimov (ASA, allele-specific amplification). Omejujoč problem pri teh metodah je lahko prisotnost dodatnih nukleotidnih zamenjav blizu našega polimorfizma ali mutacije, ki lahko vplivajo na prepoznavno mesto restrikcijskega encima in vezavo alelno – specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. V tem primeru sta uporabni dve metodi: heterodupleks analiza in metoda s hibridizacijskimi metodami.

2. NAMEN DELA

Osteoporoza je tiha bolezen, ki se razvija dolgo in običajno neopazno. Gre za kompleksno bolezensko stanje karakterizirano z nizko mineralno kostno gostoto (MKG) in s spremenjeno mikroarhitekturno zgradbo kostnega tkiva. Ker je okrog 85% sprememb v MKG gensko pogojenih, raziskovalci intenzivno iščejo kandidatne gene za razvoj osteoporoze.

Encim MTHFR deluje na točki, kjer na eni strani lahko usmerja presnovo folatov v smer remetilacije homocisteina ali v biosintezo DNA in RNA. V genu za MTHFR so odkrili 34 redkih, a škodljivih mutacij in 9 pogostih polimorfizmov. Ena izmed prvih odkritih je bila mutacija C677T, ki kodira vezalno mesto za folat. Encim so začeli proučevati, ko je bila odkrita povezava med motenim metabolizmom homocisteina in dednimi okvarami encima, kar posledično vodi v hiperhomocisteinemijo. Prav zvišana koncentracija homocisteina naj bi bila povezana s krvožilnimi kot tudi s kostnimi boleznimi.

Predmet diplomske naloge je polimorfizem C677T v MTHFR genu, ki zaradi spremembe delovanja encima MTHFR v presnovni poti homocisteina vodi do blage hiperhomocisteinemije, le ta pa domnevno vpliva na znižanje mineralne kostne gostote. Ta je značilna za osteoporozo in nekatere druge presnovne bolezni kosti.

V ta namen bomo 719 vzorcem določili polimorfizem gena s PCR-RFLP metodo genotipizacije. Temu bo sledila statistična obdelava, s katero bomo določali frekvenco genotipa znotraj posameznih skupin slovenske populacije in njihovo morebitno povezanost z mineralno kostno gostoto. Na koncu bomo še statistično določili vpliv genotipa na uspeh terapije z bifosfonati in terapije s selektivnim modulatorjem estrogenskih receptorjev.

Če bi dokazali vpliv polimorfizma C667T na MKG, bi lahko dobili nov genetični kazalec za prepoznavo rizičnih posameznikov, nagnjenih k razvoju osteoporoze.

3. METODE DE LA

3.1. Preiskovanci

V raziskavo je bilo vključenih 719 preiskovancev (600 žensk in 119 moških). Vzorci krvi za izolacijo DNA so bili odvzeti na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Kliničnega centra v Ljubljani, v Splošni bolnišnici Celje in v Zdravilišču Dolenjske toplice. Genomska DNA je bila izolirana iz jeder levkocitov periferne venske krvi z metodo izsoljevanja po Millerju. Vsem preiskovancem so izmerili višino in telesno težo ter izračunali ITM (indeks telesne mase). Nadalje so jim z metodo dvoenergetske rentgenske absorpciometrije (DXA) izmerili MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc (L1-L4).

Pri ugotavljanju povezanosti polimorfizma C677T v MTHFR genu z MKG smo preiskovance razdelili v naslednje skupine:

- vsi moški preiskovanci
- preiskovanci z osteoporozo
- premenopavzne preiskovanke
- pomenopavzne preiskovanke
- preiskovanke z osteoporozo

Nadalje smo ocenili vpliv gena na uspeh terapije pri dveh skupinah osteoporoznih preiskovank. V prvi skupini se je 58 preiskovank 1 leto zdravilo z bifosfonatom alendronatom (Fosamax®, 10 mg dnevno). V drugi skupini pa se je 52 preiskovank zdravilo s SERM (Evista®, 60 mg dnevno).

3.2. Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, *angl.* Polymerase chain reaction) je metoda, s katero lahko v kratkem času *in vitro* pomnožimo določen odsek DNA v velikem številu kopij.

Preglednica VI: Sestava reakcijske zmesi za PCR

| Komponenta | Volumen za posamezni vzorec | Volumen reakcijske zmesi za n – vzorcev |
|------------------------------------|-----------------------------|---|
| 10 × PCR Gold pufer | 2,0 µL | (n + 1) × 2,0 µL |
| Raztopina dNTP (2mM) | 2,0 µL | (n + 1) × 2,0 µL |
| Raztopina MgCl ₂ (25mM) | 1,2 µL | (n + 1) × 1,2 µL |
| MTHFR 677-F (5pM) | 0,8 µL | (n + 1) × 0,8 µL |
| MTHFR 677-R (5pM) | 0,8 µL | (n + 1) × 0,8 µL |
| Ultra čista voda | 12,12 µL | (n + 1) × 12,12 µL |
| Taq-polimeraza | 0,08 µL | (n + 1) × 0,08 µL |
| DNA | 1,0 µL | / |
| Končni volumen | 20,0 µL | (n + 1) × 19,0 µL |

Reagenti:

- AmpliTaqGold™ PCR kit (applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, ZDA)
- AmpliTaqGold™-polimeraza, 5 U/µL; hranimo pri T = - 20°C
- GeneAmp™ 10X PCR Buffer II; 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH pufru = 8,3 pri T = 25°C
- 25 mmol/L MgCl₂
- Raztopina dNTP – raztopina deksinukleotidov, ki vsebuje dATP, dTTP, dCTP in dGTP vsakega v koncentraciji 2 mM (pripravljena iz 100mM osnovnih razpotin dATP, dTTP, dCTP in dGTP); hranimo pri T = - 20°C
- 5 µL delovne raztopine istosmernega oligonukleotidnega začetnika MTHFR 677-F:
5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'
- 5 µL delovne raztopine obratnosmernega oligonukleotidnega začetnika MTHFR 677-R:
5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'
- ultra čista voda (aparatur ELGA, Purelab Classic, Ransbach-Baumbach, Nemčija), sterilizirana z avtoklaviranjem
- delovne raztopine DNA, predhodno pripravljene z redčenjem osnovnih izolatov 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 ali 1:100 glede na izmerjeno koncentracijo v osnovnem izolatu

Pribor in aparature:

- 0,5 mL epice, sterilizirane z avtoklaviranjem (SARSTEDT; Human DNA-/Dnase-/RNase-free)
- polavtomatske pipete 0,1-2,5 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L
- nastavki za pipete, sterilizirani z avtoklaviranjem (SARSTEDT)
- 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)
- 3 % hipoklorit
- rokavice

Posebna opozorila:

! Pred začetkom dela delovne površine v komori za PCR ter ves pribor, ki ga bomo uporabili, očistimo s 3 % hipokloritom in prižgemo UV žarnico ($\lambda = 254$ nm) za 15 min! Vse kar damo v komoro moramo predhodno očistiti s 3 % hipokloritom!

! Pri delu v komori uporabljamo čiste rokavice in imamo oblečeno delovno haljo, izključno namenjena pripravi reakcijske zmesi za PCR!

! Vse reagente hranimo v zamrzovalniku pri $T = -20^{\circ}\text{C}$, vzorce DNA v hladilniku pri $T = 4^{\circ}\text{C}$!

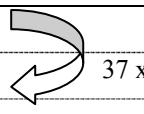
! Taq polimerazo vzamemo iz zamrzovalnika tik pred dodatkom v reakcijsko zmes in ga takoj po uporabi damo spet nazaj v zamrzovalnik!

3.2.2. Potek PCR reakcije

Po centrifugiranju smo vzorce vstavili v ciklični pomnoževalnik, v katerega smo predhodno vnesli program z optimalnimi pogoji za verižno reakcijo polimeraze. Reakcija poteka verižno; to pomeni, da jo večkrat ponovimo. Temperatura reakcije se kontrolirano spreminja v določenih časovnih intervalih (preglednica VII). Po končani PCR reakciji smo ciklični pomnoževalnik izklopili ter vzeli vzorce in slepi vzorec iz aparata. Zaradi med ohlajanjem nastalega kondenza na steni in pokrovčku epic smo le te ponovno centrifugirali in jih do nadaljnje uporabe hranili v hladilniku pri $T = 4^{\circ}\text{C}$.

Preglednica VII: Pogoji za verižno reakcijo PCR (št. programa: 49 MTHFR677)

| Stopnja | Temperatura (°C) | Čas |
|-------------------------|------------------|--------|
| začetna denaturacija | 95 | 10 min |
| denaturacija | 94 | 30 s |
| prileganje | 62 | 30 s |
| podaljševanje | 72 | 30 s |
| zaključno podaljševanje | 72 | 7 min |
| shranjevanje | 8 | ∞ |


Aparatura:

- ciklični termostat Primus 96 plus, MWG-BIOTECH AG
- centrifuga Mikro-242 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija)

3.2.3. Preverjanje uspešnosti PCR reakcije z elektroforezo

Agarozna elektroforeza temelji na ločevanju nukleinskih kislin na agaroznem gelu v električnem polju. V stalnem električnem polju pri alkalni pH so molekule DNA iztegnjene in negativno nabite ter potujejo od katode k anodi. Molekule DNA se v električnem polju gibljejo s hitrostjo, ki je predvsem odvisna od njihove velikosti in zamreženosti medija, v katerem potujejo. Koncentracijo agaroze v gelu smo izbrali glede na pričakovano dolžino molekul DNA. Elektroforezo smo izvedli na 2 % agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom, ki nam je omogočil kasnejšo detekcijo pod ultravijolično (UV) svetlobo.

Posebna opozorila:

! Etidijev bromid je mutagen in toksičen, zato je pri rokovanju z njim potrebna velika previdnost. Z njim rokujemo le v digestoriju in za to uporabljamo namenske pipete in nastavke ter vedno nosimo nitrilne rokavice.

! Etidijev bromid je občutljiv na toploto in svetlobo, zato vse raztopine in gele z dodatkom ETBr hranimo na hladnem in v temnem prostoru.

Priprava elektroforeznega gela:

2 % agarozni gel smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico natehtali 1,5 g agaroze v prahu in dodali 75 mL 1×TAE pufra. Erlenmajerico smo starirali ter jo pokrili z urnim steklom. V mikrovalovni pečici smo zmes segrevali do bistre tekočine brez mehurčkov. Potem smo počakali, da se je gelska raztopina nekoliko ohladila. Med tem časom smo pripravili nosilec za vlivanje gela z vstavljenim glavničkom (30 žepkov) za tvorbo žepkov v gelu. Erlenmajerico smo postavili nazaj na tehtnico in nadomestili izparelo količino z destilirano vodo. V digestoriju smo raztopini dodali 4 µL ETBr, dobro premešali in vsebino gela previdno prelili v prej pripravljeni kalup. Kalup smo zaščitili pred svetlobo in počakali 30 minut, da se je gel strdil. Previdno smo odstranili glavniček z nosilca, gel prenesli v plastično vrečko (s tem preprečili izsušitev gela) in ga do uporabe hranili v hladilniku pri $T = 4^{\circ}\text{C}$.

Reagenti:

- agarosa (Agarose for routine use, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Nemčija)
- 1×TAE pufer, pripravljen z 1:50 redčenjem 50×TAE pufra (sestava 50×TAE pufra: 242,0 g Tris baze, 57,1 g 100% očetne kisline in 100 mL 0,5 M raztopine Na₂EDTA s pH 8,0. Zmes dopolnimo z bidestilirano vodo do končnega volumna 1000 mL.)
- etidijev bromid, 10 mg/mL (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Nemčija)

Priprava osnovne raztopine (10 mg/mL) ETBr: v temno stekleničko natehtamo 0,3 g ETBr (SIGMA), dodamo 30 mL destilirane vode, dobro premešamo in shranjujemo zavito v aluminijasto folijo v hladilniku na $T = 4^{\circ}\text{C}$. Ko pripravljamo raztopino, delamo v digestoriju in nosimo ustrezno zaščito (maska in nitrilne rokavice).

- destilirana voda

Pribor in aparature:

- tehtnica EXACTA 300 EB (TEHTNICA, Železniki, Slovenija)
- 200 mL erlenmajerica
- 100 mL merilni valj

- urno steklo
- mikrovalovna pečica
- polavtomatska pipeta 2-20 μL
- nastavki za pipeto (SARSTEDT)
- mali nosilec za vlivanje gela (10 cm x 15 cm x 0,5 cm)
- glavniček za tvorbo žepkov v gelu (BioRad)
- digestorij
- rokavice

Izvedba elektroforeze produktov PCR:

Ustrezno velik del gela – število žepkov je enako vsoti številu vzorcev, ki jim prištejemo žepke za slepi vzorec in žepke za označitev velikosti, smo potopili v elektroforezno kadičko z $1\times\text{TAE}$ pufrom. Na parafilm smo s polavtomatsko pipeto nanesli po 2 μL nanašalnega puфра XC, mu primešali 2 μL vzorca in vse skupaj nanesli v žepke agaroznega gela. To smo naredili z vsakim vzorcem, s slepimi vzorci in z označevalcem velikosti. Pri tem smo pazili na pravilni vrsti red nanašanja vzorcev.

Nanašalni pufer vsebuje barvilo ksilen cianol, ki zaradi obarvanosti olajša nanašanje vzorcev v žepke in omogoča spremljanje hitrosti potovanja v električnem polju. Glicerol v nanašalnem pufru pa omogoča boljše usedanje vzorcev v žepke gela.

Po nanosu vseh vzorcev smo kadičko pokrili in sistem povezali z električnim tokom. Elektroforeza je trajala 20 minut pri napetosti 100 V.

Reagenti:

- $1\times\text{TAE}$ pufer
- nanašalni pufer ksilen cianol – XC (priprava: natehtamo 0,025 g ksilen cianola, 3,78 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:

- mala kadička za elektroforezo Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA)

- usmernik TITAN Plus (Helena Laboratories Corp., Beaumont, TX, ZDA)
- usmernik Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA)
- usmernik Power Pas Basic (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA)
- polavtomatska pipeta 2-20 μ L
- nastavki za pipete, sterilizirani z avtoklaviranjem (SARSTEDT)
- parafilm
- rokavice

3.2.4. Detekcija PCR produktov

Po končani elektroforezi smo vir napetosti izklopili in gel previdno prenesli v komoro, povezano z UV lučjo in računalniškim sistemom. Po zažnitvi programa UVItec smo gel osvetlili z UV svetlobo ($\lambda=302$ nm), ga slikali z dokumentacijskim sistemom za slike in sliko primerno označili ter jo shranili pod določenim imenom.

Detekcijo fragmentov omogoča ETBr, ki se vloži med baze DNA preko hidrofobnih interakcij, deloma pa tudi z vodikovimi vezmi in ionskimi privlaki. Ob ekscitaciji pod UV svetlobo DNA zato fluorescira.

Pribor in aparature:

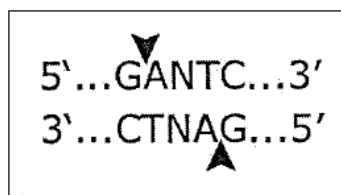
- dokumentacijski sistem za slikanje gelov UVItec in program UVI Photo
- transluminator (žarnica $\lambda=302$ nm)
- rokavice

3.3. Analiza dolžin restrikcijskih fragmentov

RFLP: (Random Fragment Length Polymorphism) je metoda, kjer s specifičnimi endonukleazami oziroma restrikcijskimi encimi režemo DNA odseke pomnožene DNA. Specifične endonukleaze prepoznavajo točno določena DNA zaporedja. Na mestih, kjer pričakujemo točkovno mutacijo in ob uporabi prave endonukleaze, ki bo to mesto prepoznala, lahko nastane ali pa se odstrani mesto cepitve za restrikcijsko endonukleazo. V

prvem primeru encim cepi odsek DNA, v drugem primeru pa je nezmožnost cepitve znak, da je na preiskovanem odseku DNA prisotna mutacija.

Polimorfizem gena za MTHFR na mestu 677 uvede cepitveno mesto za encim *Hinf*I. Encim, ki so ga pridobili iz bakterije *Haemophilus influenzae* I, značilno prepozna zaporedje na preiskovanem genu in cepi fosfodiesterne vezi med nukleotidi.



Slika 12: Slika zaporedja, ki ga cepi *Hinf*I. N je katerakoli dušikova baza.

3.3.1. Pogoji in izvedba restrikcije

Za serijo vzorcev smo pripravili skupno reakcijsko zmes za analizo *Hinf*I-RFLP. Reakcijska zmes, ki je bila pripravljena v 1,5 ml epici za $n -$ vzorcev, je vsebovala vse reagente razen PCR produkta (preglednica VIII). Po 10,0 μ L dobro premešane zmesi smo odpipetirali v naprej označenih epic. V slednje smo dodali še po 5 μ L ustreznega PCR produkta. Ena izmed epic v seriji je imela vlogo pozitivne kontrole, kar pomeni, da smo v slednjo dodali PCR produkt z znanim genotipom (TT). Vse epice smo dobro zaprli, še enkrat premešali in jih centrifugirali 30 sekund. Nato smo epice vstavili v plavajoči nosilec in jih postavili v vodno kopel, nastavljeno na temperaturo 37°C. Inkubacija je potekala 12 ur oz. čez noč. Po končani inkubaciji smo epice z restrikcijsko zmesjo ponovno centrifugirali 30 sekund, da se je vsebina zbrala na dnu, in izvedli analizo produktov restrikcije.

Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za analizo *HinfI*-RFLP

| Komponenta | Volumen za posamezni vzorec | Volumen reakc. zmesi za n – vzorcev |
|------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Ultra čista voda | 8,4 μL | 8,4 $\mu\text{L} \times n$ |
| 10 \times pufer NEB2 | 1,5 μL | 1,5 $\mu\text{L} \times n$ |
| <i>HinfI</i> (10U/ μL) | 0,1 μL | 0,1 $\mu\text{L} \times n$ |
| PCR produkt | 5,0 μL | / |
| Končni volumen | 15,0 μL | 10,0 $\mu\text{L} \times n$ |

Reagenti:

- pufer NEB2 (pH=7,9 pri T=25°C; 10mM TRIS-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM ditiotritol; New England Biolabs Inc., Beverly, MA, ZDA)
- restrikcijski encim *HinfI* (10U/ μL ; New England Biolabs Inc., Beverly, MA, ZDA); hranimo pri T= - 20°C
- ultra čista voda (aparatus ELGA, Purelab Classic, Ransbach-Baumbach, Nemčija), sterilizirana z avtoklaviranjem

Pribor in aparatura:

- 1,5 mL epice, sterilizirane z avtoklaviranjem (SARSTEDT)
- polavtomatske pipete 0,1-2,5 μL , 2-20 μL , 20-200 μL (Biohit)
- nastavki za pipete, sterilizirani z avtoklaviranjem (SARSTEDT)
- avtoklav A-21 (Kambič, Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija)
- centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija)
- termostatorirana vodna kopel MEMMERT, T = 37°C
- plavajoči nosilec
- 3 % hipoklorit
- rokavice

Posebna opozorila:

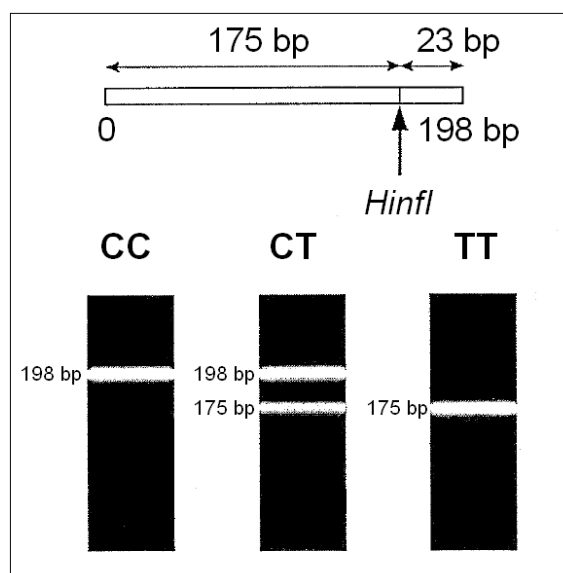
! Pred začetkom dela delovne površine ter ves pribor, ki ga bomo uporabili, očistimo s 3 % hipokloritom.

! Vse reagente za restrikcijo hranimo v zamrzovalniku pri T = - 20°C, PCR produkte v hladilniku pri T = 4°C!

! Encim *HinfI* vzamemo iz zamrzovalnika tik pred dodatkom v reakcijsko zmes in ga takoj po uporabi damo spet nazaj v zamrzovalnik!

3.3.2. Analiza produktov restrikcije z elektroforezo

Naš preiskovani fragment DNA je dolžine 198 bp. Če restrikcijska endonukleaza *HinfI* ne prepozna restrikcijskega mesta, ne pride do restrikcije. Odsotnost restrikcijskega mesta označimo z veliko črko C. V primeru točkovne mutacije C>T encim cepi fragment dolžine 198 bp na dva dela, prvi dolžine 175 bp in drugi dolžine 23 bp. Prisotnost restrikcijskega mesta tako označimo s črko T (slika 13).



Slika 13: Prikaz cepitvenega mesta DNA fragmenta s *HinfI* in elektroforetske slike različnih restrikcijskih produktov: CC genotip, CT genotip in TT genotip

Genotip CC predstavlja homozigotno osebo, ki nima restrikcijskega mesta na nobenem alelu, zato po restrikciji dobimo le en odsek dolžine 198 bp.

Genotip CT predstavlja heterozigotno osebo z mutacijo na enem od obeh alelov. Po restrikciji v tem primeru dobimo tri odseke dožin: 198 bp, 175 bp ter 23 bp. To vidimo na elektroforezni sliki kot dve lisi: produkt dolžine 198 bp in pod njim produkt dolžine 175 bp. Manjši odsek se na elektroforezni sliki ne opazi, ker je pri danih pogojih EF že zapustil gel.

Genotip TT predstavlja homozigotno osebo z mutacijo na obeh alelih. Na elektroforezni sliki takrat vidimo le eno intenzivno liso na mestu 175 bp. Manjši odsek se na elektroforezni sliki ne opazi, ker je pri danih pogojih EF že zapustil gel.

Priprava elektroforeznega gela brez ETBr:

4 % agarozni gel smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico natehtali 3 g agaroze za RFLP v prahu in dodali 75 mL 1×TAE pufra. Priprava gela je enaka kot pri 2 % gelu (glej 3.2.3.), le da raztopini agaroze ne dodamo ETBr. Gel smo spravili v plastično vrečko in ga do uporabe hranili v hladilniku pri $T = 4^{\circ}\text{C}$.

Reagenti:

- agarozna RFLP (A 7431, 100 g, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Nemčija)
- 1×TAE pufer, pripravljen z 1:50 redčenjem 50×TAE pufra (sestava 50×TAE pufra: 242,0 g Tris baze, 57,1 g 100% očetne kisline in 100 mL 0,5 M raztopine Na_2EDTA s pH 8,0. Zmes dopolnimo z bidestilirano vodo do končnega volumna 1000 mL.)
- destilirana voda

Pribor in aparature:

- tehtnica EXACTA 300 EB (TEHTNICA, Železniki, Slovenija)
- 200 mL erlenmajerica
- 100 mL merilni valj
- urno steklo
- mikrovalovna pečica
- mali nosilec za vlivanje gela (10 cm x 15 cm x 0,5 cm)
- glavniček za tvorbo žepkov v gelu (BioRad)
- digestorij
- rokavice

Izvedba elektroforeze produktov RFLP:

Epice s produkti restrikcije smo najprej centrifugirali. Elektroforeza po restrikciji se izvaja na ledu, kar pomeni, da smo pred samo izvedbo elektroforeze, v plastično kadičko napolnjeno z zdrobljenim ledom postavili elektroforezno kadičko. Ustrezno velik del gela – število žepkov je enako vsoti številu vzorcev, ki jim prištejemo žepek za negativno kontrolo, žepek za pozitivno kontrolo in žepek za označitev velikosti, smo potopili v elektroforezno kadičko z $1\times$ TAE pufrom. V epice s produkti restrikcije smo odpipetirali po 3 μ L nanašalnega pufra Blue Orange in vso vsebino posamezne epice prenesli v ustrezen žepek na gelu. Na parafilm smo s polavtomatsko pipeto nanesli po 3 μ L nanašalnega pufra Blue Orange, mu primešali 3 μ L označevalca velikosti fragmentov in vse skupaj nanesli v žepek agaroznega gela. To smo naredili še z negativno kontrolo (nerazcepljen produkt PCR).

Po nanosu vseh vzorcev smo sistem povezali z električnim tokom. Elektroforeza je trajala 90 minut pri napetosti 85 V.

Reagenti:

- $1\times$ TAE pufer za kadičko
- nanašalni pufer Blue/Orange (6x Loading Dye G190A, Promega Corporation, Madison, WI, ZDA)
- PCR marker, ki vsebuje DNA odseke dolžin 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 baznih parov (PCR Markers G316A, Promega Corporation, Madison, WI, ZDA)
- zdrobljen led

Pribor in aparature:

- centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija)
- mala kadička za elektroforezo Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA)
- usmernik TITAN Plus (Helena Laboratories Corp., Beaumont, TX, ZDA)
- usmernik Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA)
- usmernik Power Pas Basic (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA)
- polavtomatska pipeta 2-20 μ L

- nastavki za pipete, sterilizirani z avtoklaviranjem (SARSTEDT)
- plastična kadička za led
- parafilm
- rokavice

Barvanje gela in detekcija

Ker smo uporabili agarozni gel brez vgrajenega barvila, smo morali po končani elektroforezi gel naknadno barvati, da smo lahko detektirali produkte restrikcije.

Gel smo skupaj z nosilcem prenesli v digestorij, v ustrezno plastično kadičko, in ga prelili s 150 mL 0,5 µg/mL raztopine ETBr za barvanje gelov. Zaprto kadičko smo ovili z aluminijasto folijo, jo postavili na stresalnik in vse skupaj rahlo stresali 20 minut.

Po končanem barvanju smo gel previdno prenesli v komoro, povezano z UV lučjo in računalniškim sistemom. Po zažnitvi programa UVItec smo gel osvetlili z UV svetlobo ($\lambda=302$ nm), ga slikali z dokumentacijskim sistemom za slike in sliko primerno označili ter jo shranili pod določenim imenom.

Reagenti:

- raztopina etidijevega bromida (ETBr) za barvanje
- Raztopino ETBr za barvanje (0,5 µg/mL) pripravimo tako, da 12,5 µL osnovni raztopini ETBr (10 mg/mL) dodamo 250 mL destilirane vode.

Pribor in aparature:

- stresalnik Vibromix 314 EVT (TEHTNICA, Železniki, Slovenija)
- polavtomatska pipeta 2-20 µL
- nastavki za pipeto (Sarstedt)
- digestorij
- plastična kadička s pokrovom za raztopino ETBr
- aluminijasta folija
- dokumentacijski sistem za slikanje gelov UVItec in program UVI Photo
- transluminator (žarnica $\lambda=302$ nm)
- rokavice

Posebna opozorila:

! Etidijev bromid je mutagen in toksičen, zato je pri rokovanju z njim potrebna velika previdnost. Z njim rokujemo le v digestoriju in za to uporabljamo namenske pipete in nastavke ter vedno nosimo nitrilne rokavice.

! Etidijev bromid je občutljiv na toploto in svetlobo, zato vse raztopine in gele z dodatkom ETBr hranimo na hladnem in v temnem prostoru.

3.4. Statistične metode

Klinični pomen polimorfizma C677T v MTHFR genu smo ovrednotili s pomočjo naslednjih statističnih metod oz. testov:

- normalnost porazdelitve posameznih spremenljivk smo testirali s testom Kolmogorov-Smirnov;
- Hi-kvadrat test (χ^2) in Fisherjev natančni test smo uporabili za primerjanje porazdelitve genotipov med različnimi skupinami preiskovancev;
- za ugotavljanje razlik v vrednosti MKG med različnimi genotipskimi skupinami smo uporabili test ANOVA in test ANCOVA (test kovariance);
- za oceno vpliva polimorfizma na uspešnost zdravljenja z bifosfonati (alendronat, Fosamax®, MSD) in s SERM (raloksifen, Elly Lilly, Evista®) smo uporabili test ANOVA (analiza variance) pri normalni porazdelitvi, v primeru nenormalni porazdelitve pa bi uporabili 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 16.0 for Windows, INC, USA.

3.4.1. Genotipske in alelne frekvence

Genotipska frekvenca je razmerje med številom preiskovancev z določenim genotipom in celotnim številom preiskovancev in tako predstavlja delež omenjenega genotipa v populaciji preiskovancev.

Alelna frekvenca oz. delež posameznega alela v populaciji preiskovancev pa je razmerje med številom določenih alelov (npr. z neko mutacijo) in številom vseh alelov v populaciji preiskovancev (31).

Izračunamo ju po formulah:

$$f_A = \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N} \quad f_a = \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N}$$

Slika 14: Obrazca za izračun alelne frekvence posameznega alela v populaciji preiskovancev (31).

f_Afrekvenca alela A v populaciji

f_afrekvenca alela a v populaciji

n_{aa} , n_{Aa} , n_{AA}število posameznikov z genotipi aa, Aa in AA

N.....število vseh posameznikov

3.4.2. Hardy-Weinbergovo ravnotežje

Hardy-Weinbergov princip predpostavlja, da se v neskončno veliki, evolucijsko se nerazvijajoči populaciji, v kateri ne prihaja do naključnih genetskih odmikov, do nenaključnega parjenja, do novih mutacij, naravne selekcije in genskih tokov zaradi preseljevanja, ostaja relativna frekvenca različnih genotipov (alelov) konstantna skozi generacije (29,30).

V konkretnem primeru genskega lokusa z dvema aleloma A in a, kjer p predstavlja alelno frekvenco A in q alelno frekvenco a, smo izračunali pričakovano število posameznikov za vsakega od teh možnih genotipov (AA, aA/Aa in aa). Uporabili smo enačbe, ki izhajajo iz Punnettovega diagrama (29,30):

pričakovano število (AA) = p^2N

pričakovano število (aA/Aa) = $2pqN$

pričakovano število (aa) = q^2N

p...frekvenca alela A;

q...frekvenca alela a;

N...število preiskovancev.

3.4.3. Kolmogorov-Smirnov test

Kolmogorov-Smirnov test se uporablja, ko preverjamo ničelno hipotezo, ki pravi, da se vzorci porazdeljujejo po določeni distribuciji (npr. normalni porazdelitvi). V našem primeru nas zanima, ali so spremenljivke, ki opisujejo značilnost proučevane populacije, normalno porazdeljene. Če je vrednost p večja od stopnje tveganja $\alpha = 0,05$, sprejmemo ničelno hipotezo in pri nadaljnji statistični obdelavi za primerjanje srednjih vrednosti med genotipskimi podskupinami uporabimo parametrične statistične teste (ANOVA, ANCOVA). V nasprotnem primeru, ko je p manjša od $0,05$, pa ničelno hipotezo zavržemo in pri nadaljnji statistični obdelavi uporabimo neparametrične statistične teste (Kruskal-Wallis test).

3.4.4. Hi-kvadrat test (chi-square)

Test hi-kvadrat (χ^2) se pogosto uporablja pri statistični obdelavi podatkov, kadar želimo vedeti, ali se ugotovljene frekvence razlikujejo od frekvenc, ki bi jih pričakovali na temelju hipoteze. Uporablja se, ko so vzorci dovolj veliki in ima vsaj 80 % kategorij pričakovano frekvenco pet ali več. Če ni tako, moramo opraviti popravek za zveznosti t.i. Yatesov popravek. Njegova nujnost je tudi v primeru, da imamo podatke z eno samo stopinjo prostosti. Bistvo tega popravka je, da razliko med ugotovljeno in pričakovano frekvenco zmanjšamo za 0,5 (27).

3.4.5. Fisherjev natančni test

Fisherjev natančni test je neparametrični statistični test, ki se uporablja za analizo dveh neodvisnih vzorcev s podatki, ki so dani s številom oz. z absolutno frekvenco kategorije. Z

njim neposredno izračunamo natančno verjetnost povezave (p) med dvema spremenljivkama z dvema ali več kategorijami v kontingenčnih tabelah. Fisherjev natančni test uporabimo, kadar so primerjane vrednosti neenakomerne ali pa imamo v posamezni celici kontingenčne tabele vrednost manjšo od 5. Za razliko od χ^2 testa, ki nam v takem primeru lahko poda netočen približek prave vrednosti, s Fisherjevim natančnim testom izračunamo natančno vrednost p (28).

3.4.6. Analiza variance (ANOVA)

Kadar primerjamo več vzorcev, katerih vrednosti se porazdeljujejo normalno, lahko uporabimo parametrični test analiza variance. Varianca je povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Neenakost varianc se lahko pojavi, ko so skupine zelo različnih velikosti.

Pri analizi variance ugotavljamo, ali vzorci izhajajo iz populacij z istimi povprečji (ničelna hipoteza). Analiziramo variance med skupinami in v vsaki skupini posebej. Če je varianca med skupinami večja od variance znotraj teh skupin, zavrnilo ničelno hipotezo in sprejmemo hipotezo, da vzorci izhajajo iz različnih populacij (25,27).

3.4.7. Analiza kovariance (ANCOVA)

Pri analizi variance se večkrat zgodi, da so razlike med obravnavanji posledica vpliva nezaželenih, motečih dejavnikov, ne pa vpliva dejavnikov, ki jih proučujemo. Številskim spremenljivkam, katerih vpliv želimo v poskusu izločiti, pravimo kovariate (kovariable, sospremenljivke), statističnemu postopku pa analiza kovariance (ANCOVA). Ker gre za kombinacijo ANOVA-e in regresije, so tudi predpostavke tega testa kombinacija predpostavk, ki veljajo za ta dva testa. Predpostavlja pa se prav tako homogenost regresije, t.j. da je povezanost med odvisno spremenljivko in kovariato v vseh skupinah enaka.

Vključitev kovariate v analizo lahko poveča ali zmanjša razlike med obravnavanji; slednje se praviloma zgodi, če je kovariata začetno stanje odvisne spremenljivke. S tem lahko neznačilne razlike med obravnavanji postanejo značilne in obratno (25).

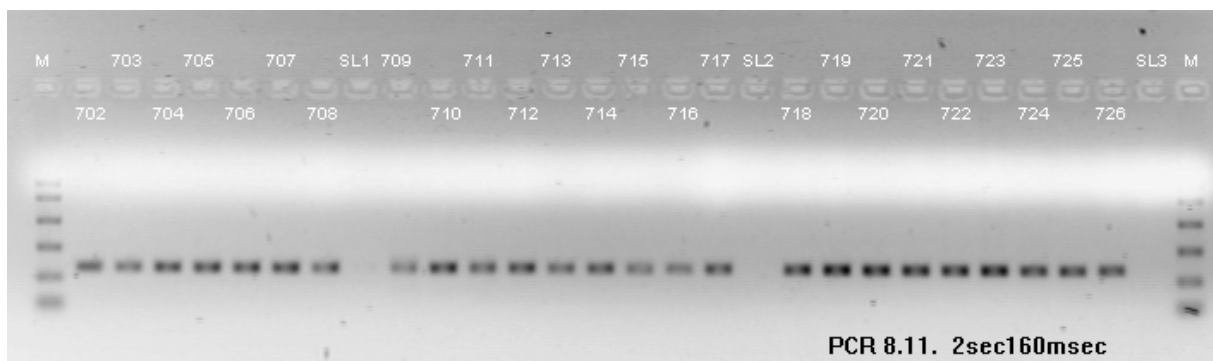
4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Elektroforeza PCR produktov

Rezultate PCR reakcije 719 vzorčkov smo preverjali z elektroforezo produktov na 2 % agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. ETBr v gelu se interkalira med molekule DNA in tvori kompleks, ki pod vplivom UV svetlobe fluorescira, kar zaznamo kot trak ali liso na gelu (slika 15).

Poleg produktov PCR smo nanesti še slepi vzorec in označevalec velikosti. Slepi vzorec nam služi kot kontrola, da ni prišlo do kontaminacije reagentov ali delovnega pribora ali predhodnih PCR produktov. V slepem vzorcu ne sme priti do reakcije (negativna kontrola).

Označevalec velikosti je tovarniško pripravljena zmes šestih fragmentov DNA velikosti 50 bp, 150 bp, 300 bp, 500 bp, 750 bp in 1000 bp v enakih masnih količinah. Z njim si pomagamo pri potrditvi nastanka pravega produkta.



Slika 15: 2% agarozni gel po elektroforezi s PCR produkti (3 serije)

Okrajšave: M – označevalec velikosti (50-1000 bp); 702-726 – številke vzorcev; SL1-SL3 – slepi vzorci ; 2sec160msec – čas osvetlitve z UV svetlobo

Na podlagi vidnih lis na sliki elektroforeznega gela smo ugotavljali, ali je reakcija pomnoževanja s PCR bila uspešna. Lege lis so morale biti znotraj pričakovane dolžine (med 300 bp in 150 bp markerja). Ker se ETBr kvantitativno veže na DNA pomeni, da z jakosti obarvanja lise lahko sklepamo na količino prisotnega PCR produkta v vzorčku.

4.1.1. Uspešnost pomnožitve

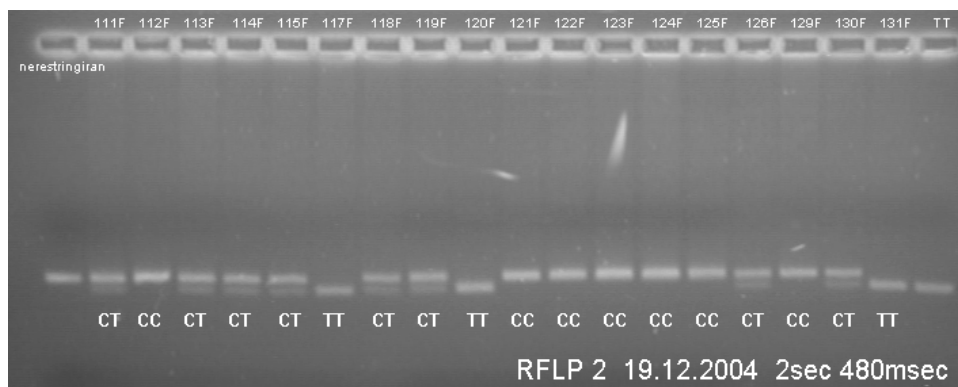
Količina nastalega PCR produkta pri vseh vzorcih ni bila enaka (razlog je najverjetneje različna kakovost in količina izhodne DNA). PCR produkte smo potem analizirali z RFLP, zato je pomembna tako količina nastalega produkta (dosežena npr. s povečanjem volumna dodane DNA), kot tudi kakovost nastalega PCR produkta (npr. prisotnost nespecifičnih produktov).

Dve seriji vzorcev, pri katerima je bila slepa pozitivna (prišlo je do kontaminacije), smo uspešno ponovili. Pri 30 vzorcih DNA PCR produkt ni nastal ali pa je bil po naši oceni prešibak za RFLP analizo. Po vsej verjetnosti je bila kakovost DNA v delovni raztopini slaba. Za te vzorce smo pripravili nove delovne raztopine ter PCR reakcijo ponovili pri spremenjenih pogojih, in sicer smo povečali volumen dodane DNA posameznega vzorca v reakcijsko zmes za PCR reakcijo. PCR reakcija je uspela pri 10 vzorcih. Pri 20 vzorcih, kjer PCR produkt tudi pri tem pogoju 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. Pogoji za PCR reakcijo so ostali enaki. Tako je bilo uspešno pomnoženih 19 vzorcev, medtem ko nam enega vzorca (vzorec št. 1023) tudi po večkratnih ponovitvah ni uspelo pomnožiti in smo ga izločili iz genotipizacije. Uspešnost pomnožitve je torej 99,86 %.

Glede na to, da so pogoji za izvedbo reakcije in količinsko razmerje reakcijske zmesi optimizirani in predpisani, lahko neuspešno pomnožitev pripišemo vprašljivi kvaliteti vzorca in hkrati dopuščamo tudi možnost napak preiskovanja pri delu.

4.2. Elektroforeza produktov restrikcije

Restriksijski encim *HinfI* prepozna zaporedje GANTC (N je katerakoli baza). Če gre za zaporedje GAGTC ga encim cepi, tako da dobimo dva odseka dolžin 175 bp in 23 bp. Odsek z zaporedjem GAGCC pa se ne cepi in ostane dolžine 198 bp.



Slika 16: 4% agarozni gel po elektroforezi s produkti restrikcije (negativ)

Okrajšave: 111F-131F – številke vzorcev; TT – vzorec z znanim genotipom ; 2sec480msec – čas osvetlitve z UV svetlobo; CC/CT/TT – na podlagi produktov restrikcije vzorcem določeni genotipi

Rezultat restrikcije je vizualno prikazan v obliki lis na sliki elektroforeznega gela (slika 16). S pomočjo nerazcepljenega produkta PCR (negativna kontrola) in vzorca z znanim genotipom (pozitivna kontrola) smo ocenili, ali je restrikcija uspešno potekla. *HinfI* cepi fragment dolžine 198 bp na dva odseka dolžine 175 bp in 23 bp. Preiskovanci brez mutacije imajo CC genotip, ki je na gelu viden kot ena lisa pri dolžini 198 bp. Preiskovanci z mutacijo na enem od dveh alelov (heterozigoti) imajo CT genotip, ki ga na gelu prepoznamo kot vzorec z dvema lisama, ena dolžine nerazcepljenega fragmenta (198 bp) in pod njo ena dolžine 175 bp. Manjši odsek (23 bp) se na elektroforezni sliki ne opazi, ker je pri danih pogojih EF že zapustil gel. Bi ga pa lahko videli, če bi za detekcijo produktov restrikcije uporabili večji elektroforezni gel. Preiskovanci z mutacijo na obeh alelih (homozigoti z mutacijo) imajo genotip TT, ki ga prepoznamo kot enojno liso na dolžini 175 bp (lisa je intenzivneje obarvana kot 175 bp dolg fragment pri heterozigotih). Manjši odseki (23 bp) niso vidno.

Vseh 718 PCR produktov smo uspešno genotipizirali (glej priloga 1, preglednica XV in preglednica XVI).

4.2.1. Problematika RFLP

Eden izmed pogostih problemov restrikcije je, da restrikcijski encim ne cepi mesto mutacije in posledično lahko pride do napačne določitve genotipa. Ker pri homozigotih CC in pri nerazcepljenem odseku produkta PCR dobimo le en odsek dolžine 198 bp, obstaja

možnost da postopek RFLP ni bil uspešen. Kot rešitev tega problema smo uvedli pozitivno kontrolo tako, da smo poleg preiskovanih vzorcev nanegli tako nerazcepljen produkt PCR, kot tudi vzorec z znanim genotipom, s TT genotipom, katerega lisa je bila opazna pri dolžini 175 bp.

Pri izbiri ustrezne metode za detekcijo produktov restrikcije je prav tako pomembno, kakšne dolžine so restrikcijski fragmenti in kakšna je razlika med nerazcepljenim in razcepljenim odsekom. V našem primeru je ta dovolj velika, tako da smo za detekcijsko metodo lahko izbrali agarozno gelsko elektroforezo. V primeru, če ta razlika ne bi bila dovolj velika, bi morali spremeniti koncentracijo gela ali uporabiti drug način detekcije restrikcijskih fragmentov, npr. poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE).

4.3. Alelne in genotipske frekvence

V populacijski genetiki se izraza alelna in genotipska frekvenca uporabljata namesto relativne alelne in relativne genotipske frekvence, in torej pomenita delež posameznega alela oz. genotipa v populaciji preiskovancev. V statistični obdelavi pa izrecno operiramo le z njunimi absolutnimi vrednostmi oz. frekvencami.

Za celotno populacijo in vse podskupine naše obravnavane populacije smo izračunali tako genotipsko kot tudi alelno frekvenco. Hkrati smo za vsako skupino izračunali tudi pričakovane genotipske frekvence po Hardy-Weinberg-ovi enačbi (preglednica XI, priloga 2) in jih primerjali med posameznimi skupinami. Še enkrat poudarjamo, da smo pri teh statističnih analizah (hi kvadrat testu, Fisherjevem natančnem testu) uporabili absolutne frekvence t.j. število javljanj za izračun verjetnosti.

4.3.1. Alelne frekvence

Po skupinah izračunane frekvence alela C in T smo vstavili v tabelo za Fisherjev natančni test na spletu (SISA) (19). Med drugim smo primerjali frekvence alelov med skupino vseh preiskovancev skupaj in med skupino preiskovank z osteoporozo (preglednica IX).

Preglednica IX: Alelne frekvence za C in T alel pri skupini vseh preiskovancev in skupini preiskovank z osteoporozo

| MTHFR alel | Vsi preiskovanci skupaj | | Preiskovanke z osteoporozo | |
|---------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| | število alelov | alelna frekvenca (%) | število alelov | alelna frekvenca (%) |
| C | 955 | 66,50 | 354 | 63,90 |
| T | 481 | 33,50 | 200 | 36,10 |
| skupaj | 1436 | 100 | 554 | 100 |

Izračunana verjetnost za dano kombinacijo je $p = 0,29$. Ob upoštevanju 5 % tveganja smo zavrnilo ničelno hipotezo in zaključili, da razlika v porazdelitvi alelov med tema dvema skupinama ni statistično značilna oz. je zgolj naključna. Pri nobeni izmed vseh možnih kombinacij primerjanja med skupinami nismo dokazali statistično značilno porazdelitev alelov med skupinami.

S pomočjo Fisherjevega natančnega testa smo nato primerjali še alelne frekvence C in T alela med našo populacijo (Slovenci) in objavljenimi rezultati za ostale evropske narode (preglednica X) (20).

Preglednica X: Alelna frekvenca T alela mutacije C677T v genu za MTHFR pri različnih populacijah v Evropi in primerjava s Slovenci.

| Populacija | Št. Preiskovancev | Alelna frekvenca T alela (v %) | Fisher Exact Test (p) |
|------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| <i>Slovenci</i> | 718 | 33,5 | / |
| <i>Britanci</i> | 1046 | 35,4 | 0,292 |
| <i>Nizozemci</i> | 503 | 32,2 | 0,512 |
| <i>Francozi</i> | 133 | 36,1 | 0,438 |
| <i>Nemci</i> | 257 | 24,5 | < 0,001 |
| <i>Irci</i> | 1309 | 32,5 | 0,529 |
| <i>Italijani</i> | 2053 | 43,8 | < 0,001 |
| <i>Norvežani</i> | 391 | 28,0 | 0,008 |
| <i>Švedsi</i> | 126 | 30,2 | 0,310 |
| <i>Hrvati</i> | 298 | 30,5 | 0,212 |

Alelne frekvence med Slovenci in večino evropskih narodov (z izjemo Italijanov, Nemcev in Norvežanov) se statistično značilno ne razlikujejo. Italijani imajo med obravnavanimi narodi najvišjo pojavnost T alela. Medtem ko je med Nemci in Norvežani pojavnost T alela najnižja v Evropi. Eden izmed vzrokov, ki naj bi vodil v povišano prisotnost frekvence alela T pri mediteranskih narodih, naj bi bilo uživanje zadostnih količin folne kisline, katere vsebnost je visoka v njihovi prehrani. Visoke koncentracije folatov v celici namreč nevtralizirajo morebitne škodljive učinke alela T (22,23).

4.3.2. Primerjava genotipskih frekvenc med skupinami

Že v splošnem se predpostavlja, da je večina populacij v ravnovesju za večino genetskih obolenj, kljub množici faktorjev, ki na to ravnotežje vplivajo. Odstopanja so izjema in so najpogosteje posledica analiznih napak, torej nepravilne genotipizacije.

Tudi pri naši mutaciji se je izkazalo, da je populacija oz. izbrani vzorci znotraj populacije v Hardy-Weinberg-ovem ravnotežju. Vsi vzorci so torej reprezentativni, tako da jih lahko uporabimo v nadaljnjih študijah (preglednica XI, ostalo v prilogi 2).

Statistično značilnost ugotovljenih frekvenc genotipov v primerjavi s pričakovanimi vrednostmi po Hardy-Weinberg-ovem načelu smo preverili s Fisherjevim natančnim testom (SISA) in s hi-kvadrat testom (χ^2) (19).

Preglednica XI: Ugotovljene in pričakovane genotipske frekvence pri premenopavznih preiskovankah.

| Vse preiskovanke v premenopavzi | | | | |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| Genotip MTHFR C677T | Ugotovljene vrednosti | | Pričakovane vrednosti* | |
| | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 49 | 48,52 % | 45 | 44,55 % |
| CT | 37 | 36,63 % | 45 | 44,55 % |
| TT | 15 | 14,85 % | 11 | 10,90 % |
| Skupaj | 101 | 100 % | 101 | 100 % |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi ($p=0,457$)

Glede na predpostavke, da je le TT genotip povezan s pomembnimi biološkimi spremembami, smo z zanimanjem primerjali skupini z najnižjo in najvišjo frekvenco genotipa TT. Pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovank na zdravljenju z alendrolati, je pojavnost genotipa TT najvišja (15,25 %) (glej prilogo 2, preglednica XXIV), pri moških preiskovancih pa je pojavnost genotipa TT najnižja (6,72 %) (glej prilogo 2, preglednica XVIII). V kontingenčno tabelo smo vstavili število preiskovancev iz določene skupine z določenim genotipom. S pomočjo programa SPSS smo izračunali verjetnost pri 5% tveganju. Ničelne hipoteze, ki predpostavlja enakost v pogostosti genotipov pri obeh primerjanih skupinah, nismo mogli zavreči ($\chi^2 = 3.512$, $p = 0,1727$). Kar pomeni, da se razporeditev genotipov med skupinama statistično značilno ne razlikuje.

Najbolje lahko klinični pomen in vpliv polimorfizma C677T v MTHFR genu na pojavnost osteoporoze ovrednotimo s primerjavo zdravih pomenopavznih (CC: 47,6%, CT: 41%, TT: 11,5%) in osteoporoznih pomenopavznih (CC: 40,8%, CT: 47,2, TT: 12%) 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 ($\chi^2 = 2.375$, $p = 0,3050$). Razporeditev genotipov med skupinama se torej ne razlikuje statistično značilno. Zaključimo lahko, da polimorfizem nima vpliva na pojavnost osteoporoze pri Slovenkah.

Ker v nobenem primeru ni prišlo do statistično značilne razlike v razporeditvi genotipov, lahko zaključimo, da ni razlik v genotipskih frekvencah znotraj slovenske populacije.

Kar nekaj študij je že bilo objavljenih, v katerih so obravnavali polimorfizem C677T v MTHFR genu. Vendar samo v nekaj primerih je bil ovrednoten vpliv tega polimorfizma na mineralno kostno gostoto.

Villadsen in sodelavci so v svoji študiji proučevali povezanost polimorfizma z MKG v danski populaciji. Primerjali so 388 osteoporoznih bolnikov s 336 normalnimi posamezniki. Distribucija genotipov CC, CT in TT pri pacientkah z osteoporoznimi zlomi vretenc se ni statistično razlikovala od distribucije v normalni kontrolni skupini (43,5%/42,2%/14,3% in 52,0%/42,0%/8,0%). So pa dokazali med slednjima skupinama

večjo pogostost TT genotipa nasproti z CC in CT genotipom ($p=0,04$) (33). Rezultate genotipiziranja te analize ne moremo v našem primeru neposredno primerjati, ker nimamo podatkov o prisotnosti osteoporoznih zlomov. Se pa v naši populaciji s podobno razliko porazdelujeta skupini osteoporoznih žensk (40,6%/46,4%/13%) in zdravih žensk (43%/49%/8%), vendar med njima nismo mogli dokazati statistično značilno večjo pogostost genotipa TT nasproti združeni skupini s CC in CT genotipoma ($p=0,186$). Kot zanimivost, so v tej študiji prav tako dokazali, da je TT genotip signifikantno pogostejši pri zdravih moških, v primerjavi z osteoporoznimi bolniki.

Jorgensen in sodelavci so določili pogostost polimorfizma v populaciji pomenopavznih žensk prav tako iz Danske. 115 žensk z osteoporoznimi zlomi so primerjali z 207 isto starih žensk (kontrolna skupina) (34). Distribucija genotipov TT: 6,5%, CT: 44,1%, CC: 49,4% določena med pomenopavznimi ženskami se statistično značilno ne razlikuje v primerjavi z našo populacijo pomenopavznih žensk. Se pa takoj opazi, da je genotip TT bolj zastopan v naši populaciji, kar lahko takoj povežemo s tezo o večji zastopanosti alela T med mediteranskimi narodi.

4.4. Povezanost polimorfizma C677T v MTHFR genu z mineralno kostno gostoto (MKG)

Zanimalo nas je, ali obstaja med genotipskimi podskupinami CC, CT in TT statistično značilna razlika v vrednostih mineralne gostote kosti na različnih delih skeleta, na vratu stegenice (MKG_vs), v celotnem kolku (MKG_cel) in v predelu ledvenih vretenc (MKG_lv). Mineralna kostna gostota je osnovni kazalec osteoporoze. Na ta način in s statistično analizo najbolje ocenimo vpliv polimorfizma C677T na MKG pri osteoporozi. Za oceno tega vpliva smo uporabili test ANOVA, Post Hoc teste (LSD) in test ANCOVA (analiza kovariance), s katerimi se določa vpliv neodvisne spremenljivke na odvisno spremenljivko, pri tem pa lahko v analizo vključimo še kovariate (ANCOVA). V našem primeru so bile neodvisna spremenljivka genotipske skupine (CC/CT/TT), odvisna spremenljivka vrednosti MKG (vs, cel, lv), kovariati pa starost ter indeks telesne mase (ITM) preiskovancev. S testom ANCOVA smo vpliv kovariat statistično izničili z določitvijo prirejene vrednosti MKG, nato pa testirali vpliv genotipskih skupin na prirejene vrednosti MKG.

Predpogoj za izvedbo vseh treh testov je normalno porazdeljevanje spremenljivk. V nekaj primerih smo morali vrednosti spremenljivk logaritmirati, da smo ugodili tej zahtevi.

Vse preiskovance skupaj (718) smo najprej statistično ovrednotili (glej prilogo 3) in jih nato razdelili v skupine:

- ❖ na skupini razdeljeni po spolu in naprej
 - na osteoporozne bolnice in bolnike ter neosteoporozne preiskovanke in preiskovance
- ❖ na premenopavzne in pomenopavzne preiskovanke ter moške
- ❖ na osteoporozne in neosteoporozne preiskovanke in preiskovance in naprej
 - na moške preiskovance, premenopavzne in pomenopavzne preiskovanke
- ❖ na skupino preiskovank in preiskovancev brez tistih, vključenih v terapijo in te naprej
 - na osteoporozne in neosteoporozne
 - na moške, premenopavzne ter pomenopavzne preiskovanke

Odločili smo se še za razvrstitev vseh skupin in njihovih podskupin v 4 starostne skupine:

- mlajši(e) od 50. leta
- od vključno 50. leta do 60. leta
- od vključno 60. leta do 70. leta
- od vključno 70. leta in starejši(e)

S testom ANOVA smo statistično značilno spremembo odkrili samo v enem samem primeru, in sicer med povprečnimi vrednostmi MKG kolka ($p=0,041$) pri osteoporoznih preiskovankah v starostnem razredu od vključno 60 let do 70 let. Z LSD Post Hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko, in sicer med povprečnimi vrednostmi MKG kolka v genotipskih skupinah 1 in 3 ($p=0,019$). Med povprečnimi vrednostmi MKG kolka v genotipskih skupinah 1 in 2 ($p=0,085$) ter 2 in 3 ($p=0,190$) ni bilo statistično značilne razlike.

Pri osteoporoznih bolnicah starih od vključno 60 do 70 let (menopavza) je pri tistih s TT genotipom vrednost MKG kolka ($0,8012 \text{ g/cm}^2 \pm 0,0858 \text{ g/cm}^2$) statistično višja v primerjavi z genotipom CC ($0,7289 \text{ g/cm}^2 \pm 0,0962 \text{ g/cm}^2$), kar odstopa od pričakovanih rezultatov. Pri preiskovankah s CT genotipom je vrednost MKG kolka nekje vmes ($0,7619 \text{ g/cm}^2 \pm 0,0837 \text{ g/cm}^2$), višja kot pri preiskovankah s CC genotipom in nižja kot pri

preiskovankah s TT genotipom (preglednica XII). Kljub temu da slednja povezava ni statistično značilna, je smer povezave med genotipi tudi v tem primeru v nasprotju s pričakovanji.

Preglednica XII: Vpliv polimorfizma na MGK pri preiskovankah.

| Skupina | MKG | genotip | MGK ± SD | p (ANOVA) | p (ANCOVA) |
|---|---------|---------|-----------------|--------------|-------------------|
| Osteoporozne preiskovanke od vključno 60 do 70 let (N = 100) | MKG_cel | CC | 0,7289 ± 0,0962 | 0,041 | 0,042 |
| | | CT | 0,7619 ± 0,0837 | | |
| | | TT | 0,8012 ± 0,0858 | | |
| Osteoporozne preiskovanke (N = 255) | MKG_vs | CC | 0,6167 ± 0,0745 | 0,076 | 0,086* 0,047** |
| | | CT | 0,6214 ± 0,0923 | | |
| | | TT | 0,6534 ± 0,0596 | | |
| Pomenopavzne preiskovanke z osteoporozo (N = 245) | MKG_vs | CC | 0,6154 ± 0,0747 | 0,087 | 0,091' 0,050'' |
| | | CT | 0,6215 ± 0,0934 | | |
| | | TT | 0,6534 ± 0,0611 | | |
| Pomenopavzne osteoporozne preiskovanke na terapiji z bifosfonati (N = 58) | MKG_vs | CC | 0,5932 ± 0,0959 | 0,082 | 0,216 |
| | | CT | 0,6244 ± 0,0903 | | |
| | | TT | 0,6717 ± 0,0499 | | |

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

* N = 243

** N = 255 (vnos povprečnih vrednosti: ITM=26,1; starost= 65 let)

' N = 233

" N = 245 (vnos povprečnih vrednosti: ITM=26,2; starost=65 let)

V treh primerih pa lahko govorimo o mejni statistični značilni razliki med povprečnimi vrednostmi MKG vratu stegenice v posameznih genotipskih podskupinah ($p_2=0,076$, $p_3=0,087$ in $p_4=0,082$) (Preglednica XII). Zanimivo je, da velja mejna statistična značilnost v vseh treh primerih v genotipskih skupinah 1 in 3 ($p_2=0,025$; $p_3=0,028$; $p_4=0,028$). Pri osteoporoznih preiskovankah je statistično značilna razlika med povprečnimi vrednostmi MKG vratu stegenice tudi v genotipskih skupinah 2 in 3 ($p=0,048$). Tudi tokrat so izmerjene povprečne vrednosti najvišje pri posameznikih s TT genotipom, najnižje pa pri tistih s CC genotipom, kar je zopet v nasprotju s pričakovanji. Odločili smo se oceniti to povezanost še s testom ANCOVA, ki odstrani vpliv kovariat ter s tem omogoči boljše oceno vpliva neodvisne spremenljivke. V vseh treh primerih ni prišlo do statistično značilne spremembe, vendar tu je treba poudariti, da zaradi manjkajočih podatkov o starosti in ITM gre za nezanesljive rezultate. Problem manjkajočih kovariat smo rešili s t.i. imputacijo povprečnih vrednosti posamezne kovariate značilne znotraj

posamezne skupine. V tem primeru so rezultati testa ANCOVA pokazali, da je polimorfizem statistično značilno povezan z mineralno kostno gostoto glave stegenice v dveh primerih.

Villadsen in sodelavci v raziskavi, v katero so vključili 388 osteoporoznih bolnikov (TT) in 336 zdravih oseb (CT in CC), niso dokazali statistično značilne razlike med MKG v posameznih genetskih skupinah. So pa dokazali vpliv starosti in teže v vlogi kovariat na MKG (33). Tudi Gjesdal in sodelavci v svoji obsežni raziskavi (2268 moških in 3070 žensk v starostni skupini 47 do 50 let in 71-75 let) niso našli nobene asociacije med MTHFR in MKG (15). V najnovejši študiji je Yazdanpahan s sodelavci pri populaciji 5035 oseb nad 55 let proučevali morebitni vpliv C677T polimorfizma na nivo homocisteina, na MKG in njegovo spremembo ter na tveganost osteoporoznih zlomov. Na podlagi zbranih podatkov o MKG (vratu stegenice in ledvenih vretenc) pri 4646 posameznikih (2692 žensk) in njihovi genotipizaciji ni bila dokazana nobena povezava med C677T MTHFR različicami (35).

Nasprotno pa je Miyao s sodelavci v svoji raziskavi dokazal statistično značilni vpliv MTHFR polimorfizma na MKG. Pri 307 pomenopavznih zdravih preiskovankah je statistično značilen vpliv na MKG_{lv} in MKG_{cel} (TT genotip z najnižjimi vrednostmi) (36). Riancho in sodelavci so v svoji meta-analizi objavljenih študij s to tematiko prišli do zaključka, da je MTHFR gen povezan z majhnimi spremembami v MKG in to samo pri ženskah (14).

Mi in nekaj drugih študij torej ni dokazalo nobene povezanosti polimorfizma C677T v MTHFR genu z MKG v skladu s pričakovanji. To zglada kot paradoks, saj naj bi prav TT genotip vodil k nižanim vrednostim MKG in s tem k povečanju tveganja za nastanek osteoporoze. Verjetna razlaga za take rezultate je, da naša študija ni imela zadostno statistično moč z vidika velikosti vzorca in smo tako dobili konfliktne rezultate.

Predhodne raziskave omenjajo nekaj možnih vzrokov za nasprotujoče si izsledke. In sicer bi lahko riboflavin bil tisti vzrok, ki preprečuje nizko MKG pri TT genotipu. Tako naj bi ta povezava razložila, zakaj naj bi bil TT genotip povezan z nizkimi vrednostmi MKG pri enih populacijah in pri drugih ne (15). Drugi možni vzrok je v vplivanju folata na vrednosti

MKG. Pomanjkanje folata, in ne polimorfizem C677T, naj bi preko povečane koncentracije plazemskega homocisteina (tHcy) v plazmi znižalo MKG (16).

Najbolj verjetna razlaga asociacije med MTHFR in osteoporozo pa je, da ni polimorfizem C677T tisti, ki zvišuje tveganje osteoporoze, ampak različice v bližnjih genih na kromosomu 1, ki so povezane s stabilnostjo tega polimorfizma (33). Verjeten kandidat bi lahko bil LH1 (lizil hidrolaza 1) gen, ki je le 150 kb oddaljen od MTHFR gena. Vsaj 20 mutacij tega gena je znanih, ki vplivajo na znižano aktivnost LH1, kar se posledično rezultira v slabšem prečnem povezovanju kolagena.

4.5. Vpliv polimorfizma C667T v MTHFR genu na uspešnost zdravljenja z alendronatom ter raloksifenom

Genetski dejavniki imajo veliko vlogo v patogenezi osteoporoze, precej manj pa je raziskana njihova vloga v odzivu na zdravljenje osteoporoze. V naši raziskavi smo ugotavljali, ali je prisotnost polimorfizma C677T v MTHFR genu povezana z uspešnostjo zdravljenja z alendronatom in raloksifenom.

Dve skupini pomenopavznih osteoporoznih preiskovank smo spremljali pri zdravljenju z antiresorptivnima zdraviloma alendronatom (N = 58) ter raloksifenom (N = 52). 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 MKG ledvenih vretenc, kolka in vratu stegenice (preglednica XIII). Ostali klinični podatki obeh skupin preiskovank so navedeni v prilogi 3.

Preglednica XIII: Izmerjene vrednosti MKG in spremembe vrednosti MKG pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom in raloksifenom.

| | raloksifen (52) | | | alendronat (58) |
|------------------------------|-----------------|----------------|--------------|-----------------|
| | X ₀ | X ₁ | dMKG v %* | dMKG v %* |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,631 ± 0,078 | 0,641 ± 0,080 | -0,97 ± 3,46 | / |
| MGK cel (g/cm ²) | 0,731 ± 0,097 | 0,719 ± 0,127 | -0,08 ± 5,67 | 4,09 ± 3,08 |
| MGK lv (g/cm ²) | 0,761 ± 0,070 | 0,776 ± 0,072 | -1,52 ± 3,41 | 6,63 ± 4,43 |

*Sprememba vrednosti MKG med enoletnim zdravljenjem v odstotkih

Na podlagi rezultatov ugotavljamo (preglednica XIII), da se je v povprečju MKG pri skupini preiskovank zdravljenih z raloksifenom, po enoletni terapiji malenkostno povečala na vseh treh delih skeleta. Pri skupini preiskovank zdravljenih z alendronatom, pa se je v povprečju MKG po enoletni terapiji malenkostno znižala.

Zanimalo nas je torej, ali polimorfizem C677T vpliva na uspešnost zdravljenja z omenjenima antiresorptivnima zdraviloma.

Postavljena ničelna hipoteza (H_0): Spremembe vrednosti mineralne gostote kosti med enoletnim zdravljenjem z alendronatom oz. z raloksifenom so enake v vseh genotipskih skupinah. Uporabili smo test ANOVA, saj se vse spremenljivke porazdeljujejo normalno.

Ničelne hipoteze v nobenem primeru nismo zavrgli, saj je vrednost p vedno večja od kritične vrednosti 0,05 (preglednica XIV). Polimorfizem C677T v MTHFR genu torej nima statistično značilnega vpliva na uspešnost enoletnega zdravljenja z antiresorptivnima zdraviloma alendronatom in raloksifenom.

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

| | p (alendronat) | p (raloksifen) |
|----------------|----------------|----------------|
| MGK_vs | --- | 0,665 |
| MGK_cel | 0,939 | 0,575 |
| MGK_iv | 0,615 | 0,114 |

Naših rezultatov ne moremo primerjati z drugimi študijami, saj do sedaj raziskovalci še niso proučili povezanost med polimorfizmom C677T v MTHFR genu in odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom.

Zanimiv pogled v prihodnost na tem področju je v možnosti razvoja protiosteoporoznih zdravil, ki bi neposredno ciljale na gene povezane z regulacijo MKG in metabolizmom kolagena.

5. SKLEP

Starajoča se populacija razvitega sveta se srečuje s tihimi epidemijami nekaterih bolezni, med katerimi je tudi osteoporoza. Ob zmanjšanju kostne mase se povečuje tveganje za zlome ob minimalni poškodbi, kar pomembno zmanjšuje kakovost življenja, bolnikovo pomičnost in samostojnost, ima ekonomske posledice in skrajšuje pričakovano trajanje življenja.

Prevalenca osteoporoze v Sloveniji pri ženskah nad 50. letom je 27,5 odstotka, pri moških nad 60. letom je 14,6 odstotka. S starostjo delež osteoporoze narašča in je v starostnem obdobju 80 – 89 let skoraj 50-odstotna. Obravnava osteoporoze je kompleksna in zdravila v tem sklopu zavzemajo pomembno mesto.

Današnja diagnostika osteoporoze se razvija v smeri odkrivanja vpliva genetskih dejavnikov; osteoporoza je namreč poligenska in polifaktorska bolezen. Polimorfizem gena za 5,10-metilentetrahidrofolat reduktazo (MTHFR) C677T, ki povzroča termolabilnost tega encima, naj bi vodil v povišano raven homocisteina v plazmi oziroma v hiperhomocisteinemijo. Nedavne študije povezujejo omenjen polimorfizem tudi z znižano mineralno kostno gostoto (MKG). Izmerjene vrednosti MKG pa predstavljajo zlati standard za diagnozo osteoporoze. V naši raziskavi smo torej poskušali ugotoviti povezanost polimorfizma C677T v MTHFR genu z osteoporozo.

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnožili želeni odsek promotorja MTHFR, nato pa z analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) določili genotip preiskovancev. Frekvence proučevanega polimorfizma se pri Slovencih (119 moških in 599 ženskah) porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem. Pojavnost posameznih genotipov je v vseh skupinah preiskovancev podobna in je v razmerju CC : CT : TT = 44,4 % : 44,2 % : 11,4 %.

Klinični pomen polimorfizma C677T smo ocenili na podlagi statistične analize ter ugotovili, da:

- polimorfizem je povezan z MKG kolka pri osteoporoznih preiskovankah starih od vključno 60 let do 70 let (ANOVA, $p=0,041$). Pri preiskovankah z genotipom TT je MKG statistično značilno višja v primerjavi s preiskovankami z genotipom CC ($p=0,019$).
- polimorfizem je povezan z MKG vratu stegenice pri osteoporoznih preiskovankah (ANCOVA, $p=0,047$). Pri preiskovankah z genotipom TT je MKG statistično značilno višja v primerjavi s preiskovankami z genotipom CC ($p=0,025$). Statistično značilna razlika med povprečnimi vrednostmi MKG vratu stegenice je tudi v genotipskih skupinah CT in TT ($p=0,048$).
- polimorfizem je povezan z MKG vratu stegenice pri pomenopavznih preiskovankah z osteoporozo (ANCOVA, $p=0,050$). Pri preiskovankah z genotipom TT je MKG statistično značilno višja v primerjavi s preiskovankami z genotipom CC ($p=0,028$).
- polimorfizem nima statistično značilnega vpliva na uspešnost enoletnega zdravljenja pomenopavznih osteoporoznih preiskovank z alendronatom in raloksifenom ($p > 0,05$).

Genotip 677 TT ima ohranjene le 35 % aktivnosti encima glede na normalni genotip 677 CC, kar pri TT homozigotih lahko privede do hiperhomocisteinemije. Slednja izzove oksidativni stres in predstavlja neodvisni dejavnik tveganja za različne bolezni, med drugim tudi osteoporozo. Na podlagi tega smo pričakovali, da bodo znižane vrednosti MKG povezane s TT genotipom, vendar smo v naši raziskavi prišli prav do nasprotnih rezultatov.

Naša študija je prišla do rezultatov, ki so v konfliktu s pričakovanji. Upoštevajoč dognanja drugih študij zaključujemo, da po vsej verjetnosti ni polimorfizem C677T tisti, ki zvišuje tveganje osteoporoze, ampak različice v bližnjih genih, ki so v vezanem neravnovesju s tem polimorfizmom ali pa vplivajo na njegovo stabilnost. Na podlagi tega predlagamo, da v prihodnje raziskave na tem področju zajamejo večjo populacijo, tudi drugih etničnih skupin, in nujno doženejo povezavo MTHFR gena, plazemskega folata in plazemskega homocisteina z osteoporozo oz. z MKG. Dobrodošla bi bila tudi študija o možni povezavi med plazemskih homocisteinom in metabolizmom kolagena.

6. LITERATURA

1. Pocajt M, Širca A: Anatomija in fiziologija za medicinske šole, DZS, Ljubljana 1990; 277, 17-19.
2. Zorc M in sodelavci: Histologija, Ljubljana: Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, 2005; 247; 35-42.
3. Kocijančič A; Osteoporoza; Posebne edicije Feniks, Ljubljana 1989; 111; 11-15.
4. Komadina R in sodelavci; Zlomi zaradi osteoporoze; Služba za raziskovalno delo in izobraževanje SB; Društvo travmatologov Slovenije; Celje 1999; 138; 16-24.
5. Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Clifford JR: Osteoporosis, 3. izdaja, Elsevier Academic Press, London, 2008.
6. Simonič J: Osteoporoza ogroža tudi moške. Dostopno na internetu avgusta 2009: <http://www.finance.si/40913>
7. Preželj J: Obravnava bolnika z osteoporozo: praktična priporočila za splošnega zdravnika. Merck Sharp & Dohme, Ljubljana, 2007.
8. Kocijančič A: Osteoporoza: diagnostika in zdravljenje. Farmaceutski vestnik, 1999; 50: 1-6.
9. Tranah G et al.: Genetic Variation in Candidate Osteoporosis Genes, Bone Mineral Density, and Fracture Risk: The Study of Osteoporotic Fractures. Calcif Tissue Int 2008; 83: 155-166.
10. Ralston SH, Benoit de Crombrughe: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. Genes & Dev. 2006; 20: 2492-2506.
11. Albagha OME, Ralston SH: Genetics and Osteoporosis. Rheum Dis Clin N Am 32, 2006; 659-680.
12. Arve Ulvik and Per Magne Ueland; Madame Curie Bioscience Database: Assays for Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms; Madame Curie Bioscience Database. Dostopno septembra 2009 na internetu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A32735>
13. Daniel Leclerc, Sahar Sibani, and Rima Rozen: Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms; Madame Curie Bioscience Database. Dostopno septembra 2009 na internetu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A52350>

14. Riacho JA, Valero C, Zarrabeitia MT: MTHFR Polymorphism and Bone Mineral Density: Meta Analysis of Published Studies. *Calcified Tissue International*. 2006; 79: 289-293.
15. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM et al.: Plasma Total Homocystein Level and Bone Mineral Density: the Hordaland Homocystein Study. *Archives of internal medicine*. 2006; 166(1):88-94.
16. Golbahar J., Hamidi A., Aminzadeh M.A., Omrani G. R.: Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorfism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women: across-sectional study. *Bone*. 2004; 35: 760-765.
17. Johansson M, Guelpen BV, Hultdin J et al.: The MTHFR 677C→T polymorphism and risk of prostate cancer: results from the CAPS study. *Cancer Causes Control*. 2007; 18: 1169-1174.
18. Périer MA, Gineyts E, Munoz F et al.: Homocystein and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. *Osteoporosis int*. 2007; 18: 1329-1336.
19. SISA: Simple Interactive Statistical Analysis. Dostopno septembra 2009 na internetu:
<http://www.quantitativeskills.com/sisa/index.htm>
20. Plazar N, Ostanek B: Primerjava alelnih frekvenc mutacij ključnih encimov presnove homocisteina med vzorci Slovencev in drugih narodov. *Farm vestn* 2008; 143-149.
21. Robien, Ulrich CM: 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism and Leukemia Risk: A HuGE Minireview. *Am J Epidemiol* 2003; 157(7):571-82
22. Chiusolo P, Reddicono G, Cimino G, Sica S et al.: Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes do not play a role in acute lymphoblastic leukemia pathogenesis in Italian population. *Haematologica* 2004; 89(2):139-44.
23. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G: Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *JNephrol* 2000; 13:20-33.
24. Botto LD, Yang Q: 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenial anomalies: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151(9):862-77
25. Peat J, Barton B: *Medical Statistics; A Guide to Data Analysis and Critical Appraisal*. Blackwell Publishing Ltd, 2005: 110-148.

26. Voet D, Voet JG, Pratt CW: Fundamentals of biochemistry. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1999: 631-771.
27. Adamič Š: Temelji biostatistike (2. izdaja). Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani, 1989: 92-94, 103-104.
28. Jones D: Pharmaceutical Statistics, 1st edition, Pharmaceutical Press, UL, 2002: 261-271.
29. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF: Thompson & Thompson Genetics in medicine, 6th edition, Saunders, Pennsylvania, 2001; Chapter 7: Genetics Variation in Populations: 95-109.
30. Wikipedia, The free encyclopedia: Hardy – Weinberg principle. Dostopno na internetu avgusta 2009:
http://en.wikipedia.org/wiki/Hardy%E2%80%93Weinberg_principle
31. Wikipedia, The free encyclopedia: Allele frequency. Dostopno na internetu avgusta 2009: http://en.wikipedia.org/wiki/Allele_frequency
32. Žorž G: Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. Isis 2006; 3: 34-36.
33. Villadsen MM, Bürger MH et al.: Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. Osteoporos Int. 2005; 16: 411-416.
34. Jorgensen HL, Madsen JS, Madsen B et al: Association of a Common Allelic Polymorphism (C677T) in the Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene with a Reduced Risk of Osteoporotic Fractures. A Case Control Study in Danish Postmenopausal Women. Calcif Tissue Int. 2002; 71: 386-392.
35. Yazdanpanah N, Uitterlinden AG et al.: Low Dietary Riboflavin but Not Folate Predicts Increased Fracture Risk in Postmenopausal Women Homozygous for the MTHFR 677 T Allele. Journal of Bone and Mineral research. 2008; 23: 86-94.
36. Miyao M, Morita H et al: Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. Calcif Tissue Int 66: 190-194.

7. PRILOGE

7.1. Priloga 1: Rezultati genotipizacije

Preglednica XV: Rezultati genotipizacije preiskovank.

| št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip |
|------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| 666 | CC | 744 | CT | 812 | CC | 982 | CT | 1066 | CT |
| 667 | TT | 745 | CT | 813 | CC | 983 | CT | 1067 | CT |
| 669 | CT | 747 | CC | 815 | CT | 987 | CT | 1070 | CT |
| 670 | CT | 748 | CT | 816 | TT | 988 | TT | 1071 | CC |
| 671 | CC | 749 | CT | 817 | CC | 989 | CC | 1072 | CT |
| 673 | TT | 750 | CT | 818 | CC | 990 | CC | 1075 | CT |
| 674 | CC | 752 | CT | 819 | CT | 991 | CC | 1076 | CC |
| 675 | CC | 753 | TT | 820 | CT | 995 | CC | 1079 | CT |
| 676 | TT | 754 | CT | 822 | CC | 997 | CC | 1080 | TT |
| 677 | CT | 755 | CT | 824 | CT | 999 | CC | 1081 | CC |
| 678 | TT | 756 | CC | 825 | CT | 1000 | CT | 1084 | CT |
| 679 | CT | 757 | CC | 826 | TT | 1002 | CT | 1085 | CT |
| 681 | CT | 758 | CT | 827 | CT | 1004 | CT | 1086 | TT |
| 682 | CC | 759 | CT | 915 | CT | 1005 | CC | 1087 | TT |
| 684 | CT | 761 | CT | 916 | CC | 1006 | CC | 1088 | CC |
| 685 | CT | 763 | CC | 917 | CT | 1007 | CC | 1089 | CT |
| 687 | CC | 764 | CT | 918 | CC | 1008 | CC | 1092 | CT |
| 688 | CT | 766 | CC | 920 | CC | 1009 | CC | 1093 | CC |
| 690 | CT | 767 | CT | 921 | CT | 1010 | CT | 1095 | CC |
| 691 | CC | 768 | CT | 923 | CT | 1012 | CT | 1096 | CC |
| 695 | CC | 769 | CT | 925 | CC | 1014 | CT | 1097 | TT |
| 696 | CC | 770 | CC | 926 | CC | 1015 | TT | 1098 | CC |
| 697 | CT | 771 | CT | 927 | CC | 1016 | CC | 1099 | CC |
| 698 | CC | 772 | CT | 928 | CC | 1018 | CT | 1100 | CC |
| 701 | CT | 774 | CC | 929 | CC | 1020 | CC | 1101 | CT |
| 703 | CC | 775 | TT | 930 | CC | 1021 | CC | 1103 | CT |
| 704 | CC | 776 | CT | 932 | CT | 1022 | CC | 1104 | CC |
| 705 | CT | 777 | CT | 933 | CT | 1025 | CC | 1107 | TT |
| 706 | CC | 778 | CT | 934 | CC | 1026 | CT | 1110 | CT |
| 708 | CT | 779 | TT | 936 | CC | 1027 | CC | 1111 | CC |
| 709 | TT | 780 | CC | 938 | CC | 1029 | CC | 1112 | CT |
| 710 | CT | 781 | CT | 939 | CT | 1030 | TT | 1113 | CC |
| 711 | CC | 782 | CC | 942 | CC | 1031 | CC | 1115 | CC |
| 713 | CC | 783 | CC | 945 | CT | 1033 | CT | 1116 | CT |
| 715 | TT | 785 | CC | 947 | CC | 1035 | CT | 1117 | CC |
| 717 | CT | 787 | TT | 949 | CC | 1038 | CT | 1118 | TT |
| 718 | CC | 788 | CT | 950 | TT | 1039 | CT | 1121 | CC |
| 719 | CT | 789 | CT | 954 | TT | 1041 | CT | 1123 | CC |
| 720 | CC | 790 | CC | 955 | CT | 1042 | CC | 1126 | CC |
| 721 | TT | 791 | CC | 956 | CC | 1043 | CT | 1127 | CC |
| 722 | CT | 793 | CT | 959 | CC | 1044 | CT | 1128 | CT |
| 723 | TT | 794 | CC | 960 | CT | 1045 | TT | 1129 | CC |
| 724 | TT | 795 | TT | 961 | CC | 1046 | CC | 1130 | CC |
| 725 | CC | 796 | CT | 962 | CT | 1047 | CT | 1131 | CT |
| 726 | CT | 797 | CT | 963 | CC | 1050 | CC | 1132 | CT |
| 727 | CC | 798 | CT | 964 | CC | 1054 | CC | 1133 | CC |
| 728 | CC | 800 | CC | 966 | TT | 1055 | CT | 1134 | CT |
| 729 | CC | 801 | CT | 967 | CC | 1057 | CC | 1135 | CC |
| 730 | CC | 802 | CC | 968 | TT | 1058 | CC | 1136 | CC |
| 732 | CC | 803 | CC | 969 | CC | 1059 | CC | 1138 | TT |
| 733 | TT | 804 | CC | 970 | CT | 1060 | CT | 1139 | TT |
| 734 | CT | 808 | CC | 971 | CT | 1061 | CT | 1140 | CC |
| 738 | CT | 809 | CC | 976 | CT | 1062 | CT | 1141 | CT |
| 741 | CC | 810 | CT | 977 | CT | 1064 | CC | 1142 | CT |
| 743 | CC | 811 | CC | 978 | TT | 1065 | CC | 1143 | TT |

| št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip |
|------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| 1145 | CT | 3opg | CT | 69opg | CT | 605r | TT | 1038z | CC |
| 1146 | CC | 4opg | CC | 70opg | CC | 606r | CT | 1039z | CT |
| 1147 | CC | 5opg | CT | 71opg | CC | 607r | CC | 1040z | CT |
| 1149 | CC | 6opg | CC | 72opg | CT | 608r | CC | 1041z | CT |
| 1150 | TT | 7opg | CC | 73opg | CC | 609r | CT | 1042z | CC |
| 93f | CT | 8opg | TT | 74opg | CT | 610r | CT | 1043z | CC |
| 94f | CT | 9opg | CC | 75opg | TT | 611r | TT | 1045z | CT |
| 95f | CC | 10opg | CT | 76opg | CT | 612r | CT | 1049z | CC |
| 96f | CC | 11opg | CC | 77opg | CT | 613r | CT | 1051z | CC |
| 97f | CC | 12opg | CC | 78opg | CT | 614r | CC | 1052z | CT |
| 98f | CT | 13opg | TT | 79opg | CT | 615r | CT | 1053z | CC |
| 99f | TT | 14opg | CC | 80opg | CT | 616r | CC | 1054z | CC |
| 100f | CC | 15opg | CT | 81opg | CT | 617r | CT | 1055z | CC |
| 101f | CT | 16opg | CT | 82opg | CC | 618r | CT | 1056z | CT |
| 102f | CC | 17opg | CC | 83opg | CC | 619r | CT | 1057z | CC |
| 103f | CT | 18opg | CT | 84opg | CC | 620r | CC | 1058z | CT |
| 106f | CC | 19opg | TT | 85opg | CC | 621r | CC | 1059z | CC |
| 108f | CT | 20opg | CC | 86opg | CT | 622r | CC | 1060z | CT |
| 109f | CT | 21opg | CC | 87opg | CT | 623r | CT | 1061z | CT |
| 110f | CC | 22opg | CT | 88opg | CT | 624r | CC | 1062z | CC |
| 111f | CT | 23opg | CC | 89opg | CT | 625r | TT | 1064z | CT |
| 112f | CC | 24opg | CC | 90opg | TT | 626r | CT | 1065z | CT |
| 113f | CT | 25opg | CT | 91opg | CT | 627r | CC | 1066z | CC |
| 114f | CT | 26opg | CC | 92opg | CC | 628r | CC | 1067z | CC |
| 115f | CT | 27opg | CT | 93opg | CT | 629r | TT | 1068z | CC |
| 117f | TT | 28opg | CC | 94opg | TT | 630r | CC | 1069z | CC |
| 118f | CT | 29opg | CT | 95opg | CT | 631r | CT | 1070z | CT |
| 119f | CT | 30opg | CC | 96opg | CC | 632r | TT | 1071z | CC |
| 120f | TT | 31opg | CC | 97opg | CC | 633r | CT | 1072z | CC |
| 121f | CC | 32opg | CT | 98opg | CT | 634r | CT | 1074z | CC |
| 122f | CC | 33opg | CC | 99opg | CC | 635r | CT | 1075z | CT |
| 123f | CC | 34opg | CC | 100opg | CT | 636r | CC | 1076z | CT |
| 124f | CC | 35opg | CC | 101opg | TT | 637r | CC | 1077z | CT |
| 125f | CC | 36opg | CC | 102opg | CT | 638r | CT | 1078z | CT |
| 126f | CT | 37opg | CC | 103opg | CC | 639r | CT | 1079z | CT |
| 129f | CC | 38opg | TT | 104opg | CT | 640r | CT | 1081z | CC |
| 130f | CT | 39opg | CC | 105opg | CT | 659r | CC | 1082z | CT |
| 131f | TT | 40opg | CC | 106opg | TT | 660r | CC | 1083z | CC |
| 134f | CC | 41opg | CT | 107opg | TT | 661r | CC | 1085z | CC |
| 135f | CT | 42opg | CT | 108opg | CT | 662r | CC | 1087z | CC |
| 136f | CT | 43opg | CC | 110opg | TT | 663r | CT | 1088z | CT |
| 137f | CT | 44opg | CC | 111opg | CT | 664r | CT | 1089z | TT |
| 138f | CC | 45opg | TT | 112opg | CT | 665r | CC | 1090z | CT |
| 139f | CT | 46opg | CC | 113opg | CC | 666r | CT | 1091z | CC |
| 140f | TT | 47opg | CC | 114opg | CC | 667r | CT | 1092z | CT |
| 141f | CC | 48opg | CT | 115opg | CT | 1002z | CC | 1093z | CC |
| 142f | CT | 49opg | TT | 116opg | CC | 1003z | CT | 1094z | CC |
| 146f | TT | 50opg | CT | 117opg | CT | 1004z | CT | 1095z | CT |
| 148f | CT | 51opg | TT | 587r | CT | 1005z | CT | 1097z | TT |
| 149f | CT | 52opg | CT | 588r | CC | 1006z | CC | 1098z | CC |
| 155f | CT | 53opg | CT | 589r | CC | 1007z | TT | 1100z | CC |
| 156f | CC | 54opg | CT | 590r | CC | 1008z | CT | 1101z | CC |
| 158f | CC | 55opg | CC | 591r | CC | 1009z | CC | 1102z | CT |
| 159f | CC | 56opg | CT | 592r | CC | 1010z | CC | 1103z | CT |
| 160f | CT | 57opg | CC | 593r | CT | 1011z | CC | 1104z | CT |
| 161f | TT | 58opg | TT | 594r | CT | 1012z | CT | 1105z | CC |
| 163f | CT | 59opg | CT | 595r | CC | 1021z | CC | 1106z | CT |
| 167f | CC | 60opg | CC | 596r | CC | 1028z | CC | 1107z | CT |
| 168f | TT | 61opg | CC | 597r | CT | 1030z | TT | 1108z | CT |
| 169f | TT | 62opg | CT | 598r | TT | 1031z | TT | 1110z | CT |
| 170f | CT | 63opg | CC | 599r | TT | 1032z | CT | | |
| 174f | CT | 64opg | CC | 600r | CT | 1033z | CT | | |
| 175f | CC | 65opg | TT | 601r | TT | 1034z | CT | | |
| 176f | CT | 66opg | CT | 602r | CT | 1035z | CC | | |
| 1opg | CC | 67opg | CC | 603r | CC | 1036z | CT | | |
| 2opg | CC | 68opg | CT | 604r | CT | 1037z | CC | | |

Preglednica XVI: Rezultati genotipizacije preiskovancev.

| št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip | št. vzorca | genotip |
|------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| 668 | CT | 751 | CT | 941 | CT | 996 | CC | 1073 | CT |
| 672 | CT | 760 | CT | 943 | CT | 998 | CC | 1074 | CT |
| 680 | CT | 762 | CT | 944 | CC | 1001 | CT | 1077 | CT |
| 683 | CC | 765 | CC | 946 | CT | 1003 | TT | 1078 | CC |
| 686 | CT | 773 | TT | 948 | CT | 1011 | CC | 1082 | CT |
| 689 | CT | 784 | CC | 951 | CC | 1013 | CT | 1083 | CC |
| 692 | CC | 786 | CT | 952 | CT | 1017 | CT | 1090 | CC |
| 693 | TT | 792 | CT | 953 | CC | 1019 | CT | 1091 | TT |
| 694 | CC | 799 | CC | 957 | CT | 1024 | CC | 1094 | CC |
| 699 | CC | 805 | CC | 958 | CT | 1028 | CC | 1102 | CC |
| 700 | CT | 806 | CC | 965 | CC | 1032 | CC | 1105 | CT |
| 702 | CC | 807 | CC | 972 | CT | 1034 | CC | 1106 | CT |
| 707 | TT | 814 | CC | 973 | CC | 1036 | CT | 1108 | CT |
| 712 | CC | 821 | CC | 974 | CT | 1037 | CC | 1109 | CT |
| 714 | CC | 823 | CC | 975 | CC | 1040 | CT | 1114 | CC |
| 716 | CT | 913 | CT | 979 | CT | 1048 | CC | 1119 | CT |
| 731 | CC | 914 | CC | 980 | TT | 1049 | CT | 1120 | CC |
| 735 | CT | 919 | CT | 981 | CT | 1051 | CT | 1122 | CT |
| 736 | CT | 922 | CC | 984 | CC | 1052 | CT | 1124 | TT |
| 737 | CT | 924 | CT | 985 | CT | 1053 | CC | 1125 | CT |
| 739 | TT | 931 | CC | 986 | CT | 1056 | CT | 1137 | CC |
| 740 | CC | 935 | CC | 992 | CC | 1063 | CT | 1144 | CT |
| 742 | CT | 947 | CC | 993 | CT | 1068 | CC | 1148 | CT |
| 746 | CC | 940 | CC | 994 | CC | 1069 | CT | | |

7.2. Priloga 2: Genotipske frekvence

Preglednica XVII: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri slovenski populaciji.

| Vsi preiskovanci in preiskovanke | | | | |
|---|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | <i>Ugotovljene vrednosti</i> | | <i>Pričakovane vrednosti*</i> | |
| Genotip MTHFR C677T | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 319 | 44,43 % | 317 | 44,15 % |
| CT | 317 | 44,15 % | 320 | 44,57 % |
| TT | 82 | 11,42 % | 81 | 11,28 % |
| Skupaj | 718 | 100 % | 718 | 100% |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi ($p=0,987$)

Preglednica XVIII: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri moških.

| Vsi preiskovanci (moški) | | | | |
|---------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | <i>Ugotovljene vrednosti</i> | | <i>Pričakovane vrednosti*</i> | |
| Genotip MTHFR C677T | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 53 | 44,54 % | 57 | 47,9 % |
| CT | 58 | 48,74 % | 51 | 42,86 % |
| TT | 8 | 6,72 % | 11 | 9,24 % |
| Skupaj | 119 | 100 % | 119 | 100% |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi ($p=0,586$)

Preglednica XIX: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri ženskah.

| Vse preiskovanke (ženske) | | | | |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | <i>Ugotovljene vrednosti</i> | | <i>Pričakovane vrednosti*</i> | |
| Genotip MTHFR C677T | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 266 | 44,41 % | 261 | 43,57 % |
| CT | 259 | 43,24 % | 269 | 44,91 % |
| TT | 74 | 12,35 % | 69 | 11,52 % |
| Skupaj | 599 | 100 % | 599 | 100% |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi ($p=0,814$)

Preglednica XX: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri pomenopavznih ženskah.

| Vse preiskovanke v menopavzi | | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | <i>Ugotovljene vrednosti</i> | | <i>Pričakovane vrednosti*</i> | |
| Genotip MTHFR C677T | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 217 | 43,75 % | 215 | 43,35 % |
| CT | 220 | 44,35 % | 223 | 44,96 % |
| TT | 59 | 11,90 % | 58 | 11,69 % |
| Skupaj | 496 | 100 % | 496 | 100 % |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi ($p=0,981$)

Preglednica XXI: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri zdravih premenopavznih ženskah.

| Vse zdrave preiskovanke v premenopavzi | | | | |
|---|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | <i>Ugotovljene vrednosti</i> | | <i>Pričakovane vrednosti*</i> | |
| Genotip MTHFR C677T | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 43 | 50,00 % | 41 | 47,68 % |
| CT | 33 | 38,37 % | 37 | 43,02 % |
| TT | 10 | 11,63 % | 8 | 9,30 % |
| Skupaj | 86 | 100 % | 86 | 100 % |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi ($p=0,779$)

Preglednica XXII: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri osteoporoznih ženskah.

| Vse preiskovanke z osteoporozo | | | | |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | <i>Ugotovljene vrednosti</i> | | <i>Pričakovane vrednosti*</i> | |
| Genotip MTHFR C677T | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 113 | 40,79 % | 113 | 40,79 % |
| CT | 128 | 46,21 % | 128 | 46,21 % |
| TT | 36 | 13 % | 36 | 13 % |
| Skupaj | 277 | 100 % | 277 | 100 % |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi ($p=1,000$)

Preglednica XXIII: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri ženskah, ki se zdravijo z raloksifenom.

| RALO | | | | |
|---------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | <i>Ugotovljene vrednosti</i> | | <i>Pričakovane vrednosti*</i> | |
| Genotip MTHFR C677T | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 26 | 41,27 % | 26 | 41,27 % |
| CT | 29 | 46,03 % | 29 | 46,03 % |
| TT | 8 | 12,7 % | 8 | 12,7 % |
| Skupaj | 63 | 100 % | 63 | 100% |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi (p=1,000)

Preglednica XXIV: Ugotovljena in pričakovana genotipska frekvenca pri ženskah, ki se zdravijo z alendronatom.

| FOSAMAX | | | | |
|---------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | <i>Ugotovljene vrednosti</i> | | <i>Pričakovane vrednosti*</i> | |
| Genotip MTHFR C677T | N | Genotipska frekvenca | N | Genotipska frekvenca |
| CC | 22 | 37,29 % | 22 | 37,29 % |
| CT | 28 | 47,46 % | 28 | 47,46 % |
| TT | 9 | 15,25 % | 9 | 15,25 % |
| Skupaj | 59 | 100 % | 59 | 100% |

*pričakovane vrednosti po Hardy-Weinbergovi enačbi (p=1,000)

7.3. Priloga 3: Klinični podatki preiskovancev po genotipskih skupinah

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

| | CC | CT | TT | skupno |
|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| starost | 61,02 ± 9,42 (261) | 61,24 ± 9,80 (249) | 59,64 ± 9,90 (70) | 60,95 ± 9,64 (580) |
| ITM | 27,13 ± 4,87 (262) | 26,81 ± 4,38 (251) | 26,39 ± 4,43 (69) | 26,91 ± 4,61 (582) |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,712 ± 0,132 (252) | 0,696 ± 0,122 (239) | 0,712 ± 0,088 (68) | 0,705 ± 0,123 (559) |
| MGK cel (g/cm ²) | 0,854 ± 0,151 (250) | 0,837 ± 0,137 (238) | 0,845 ± 0,118 (67) | 0,846 ± 0,142 (555) |
| MGK lv (g/cm ²) | 0,883 ± 0,161 (259) | 0,858 ± 0,163 (250) | 0,883 ± 0,175 (73) | 0,872 ± 0,164 (582) |

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

| | CC | CT | TT | skupno |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| starost | 49,51 ± 4,89 (49) | 48,24 ± 6,34 (37) | 48,60 ± 5,68 (15) | 48,91 ± 5,55 (101) |
| ITM | 25,24 ± 4,35 (49) | 25,14 ± 4,80 (36) | 24,33 ± 3,78 (15) | 25,07 ± 4,41 (100) |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,767 ± 0,095 (48) | 0,777 ± 0,108 (36) | 0,757 ± 0,091 (14) | 0,769 ± 0,098 (98) |
| MGK cel (g/cm ²) | 0,923 ± 0,141 (47) | 0,921 ± 0,128 (36) | 0,880 ± 0,118 (13) | 0,916 ± 0,133 (96) |
| MGK lv (g/cm ²) | 0,971 ± 0,116 (49) | 0,953 ± 0,147 (36) | 0,962 ± 0,142 (15) | 0,963 ± 0,131 (100) |

Preglednica XXVII: Klinični podatki za pomenopavzne preiskovanke po genotipskih skupinah.

| | CC | CT | TT | skupno |
|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| starost | 63,67 ± 8,13 (212) | 63,51 ± 8,44 (212) | 62,65 ± 8,58 (55) | 63,48 ± 8,31 (479) |
| ITM | 27,56 ± 4,88 (213) | 27,09 ± 4,26 (215) | 29,96 ± 4,46 (54) | 27,29 ± 4,56 (482) |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,699 ± 0,137 (204) | 0,682 ± 0,119 (203) | 0,700 ± 0,084 (54) | 0,691 ± 0,124 (461) |
| MGK cel (g/cm ²) | 0,838 ± 0,149 (203) | 0,822 ± 0,134 (202) | 0,836 ± 0,117 (54) | 0,831 ± 0,139 (459) |
| MGK lv (g/cm ²) | 0,862 ± 0,163 (210) | 0,842 ± 0,160 (214) | 0,863 ± 0,177 (58) | 0,853 ± 0,164 (482) |

Preglednica XXVIII: Klinični podatki za osteoporozne preiskovanke po genotipskih skupinah.

| | CC | CT | TT | skupno |
|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| starost | 64,50 ± 8,01 (108) | 65,19 ± 8,65 (120) | 62,56 ± 8,27 (32) | 64,58 ± 8,35 (260) |
| ITM | 26,26 ± 4,47 (109) | 26,16 ± 3,25 (124) | 25,21 ± 3,45 (31) | 26,09 ± 3,82 (264) |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,617 ± 0,075 (104) | 0,620 ± 0,092 (117) | 0,653 ± 0,060 (33) | 0,623 ± 0,082 (254) |
| MGK cel (g/cm ²) | 0,746 ± 0,096 (104) | 0,755 ± 0,103 (116) | 0,771 ± 0,069 (33) | 0,752 ± 0,097 (253) |
| MGK lv (g/cm ²) | 0,752 ± 0,107 (107) | 0,741 ± 0,088 (124) | 0,749 ± 0,085 (35) | 0,746 ± 0,096 (266) |

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

| | CC | CT | TT | skupno |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| starost | 67,92 ± 6,04 (52) | 67,86 ± 6,41 (58) | 68,38 ± 9,23 (8) | 67,92 ± 5,94 (118) |
| ITM | 27,43 ± 3,58 (52) | 28,06 ± 3,44 (58) | 29,82 ± 6,72 (8) | 27,90 ± 3,80 (118) |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,812 ± 0,149 (48) | 0,807 ± 0,162 (48) | 0,912 ± 0,166 (8) | 0,818 ± 0,157 (104) |
| MGK cel (g/cm ²) | 1,012 ± 0,149 (48) | 1,032 ± 0,180 (49) | 1,089 ± 0,137 (8) | 1,027 ± 0,163 (105) |
| MGK lv (g/cm ²) | 1,057 ± 0,184 (52) | 1,041 ± 0,169 (58) | 1,160 ± 0,185 (8) | 1,056 ± 0,178 (118) |

Preglednica XXX: Klinični podatki za moške preiskovance z osteoporozo po genotipskih skupinah.

| | CC | CT | skupno |
|------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| starost | 68,89 ± 6,70 (9) | 68,78 ± 4,15 (9) | 68,83 ± 5,40 (18) |
| ITM | 26,34 ± 2,77 (9) | 24,93 ± 2,27 (9) | 25,63 ± 2,56 (18) |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,670 ± 0,088 (9) | 0,602 ± 0,063 (6) | 0,643 ± 0,084 (15) |
| MGK cel (g/cm ²) | 0,869 ± 0,112 (9) | 0,972 ± 0,357 (6) | 0,910 ± 0,235 (15) |
| MGK lv (g/cm ²) | 0,861 ± 0,059 (9) | 0,855 ± 0,126 (9) | 0,858 ± 0,096 (18) |

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

| | CC | CT | TT | skupno |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| starost | 67,10 ± 5,54 (21) | 64,73 ± 7,12 (26) | 63,17 ± 4,67 (6) | 65,49 ± 6,34 (53) |
| ITM | 25,48 ± 3,31 (21) | 27,22 ± 3,52 (26) | 27,41 ± 4,86 (6) | 26,56 ± 3,64 (53) |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,593 ± 0,096 (22) | 0,637 ± 0,084 (27) | 0,672 ± 0,050 (9) | 0,620 ± 0,090 (58) |
| MGK cel (g/cm ²) | 0,712 ± 0,117 (22) | 0,747 ± 0,077 (27) | 0,790 ± 0,087 (9) | 0,738 ± 0,105 (58) |
| MGK lv (g/cm ²) | 0,686 ± 0,066 (22) | 0,718 ± 0,078 (28) | 0,732 ± 0,091 (9) | 0,708 ± 0,076 (59) |
| dMGK cel (%)* | 4,16 ± 3,83 (22) | 3,60 ± 1,84 (27) | 3,75 ± 2,56 (9) | 4,09 ± 3,08 (58) |
| dMGK lv (%)* | 6,45 ± 4,07 (22) | 8,51 ± 4,46 (27) | 5,49 ± 5,93 (9) | 6,63 ± 4,43 (58) |

* Sprememba vrednosti spremenljivke med enoletnim zdravljenjem v odstotkih.

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

| | CC | CT | TT | skupno |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| starost | 60,23 ± 5,46 (22) | 61,39 ± 5,60 (23) | 60,14 ± 6,82 (7) | 60,73 ± 5,62 (52) |
| ITM | 25,43 ± 3,60 (23) | 26,06 ± 3,20 (27) | 24,87 ± 2,86 (7) | 25,66 ± 3,30 (57) |
| MGK vs (g/cm ²) | 0,609 ± 0,072 (20) | 0,648 ± 0,083 (25) | 0,637 ± 0,066 (7) | 0,631 ± 0,078 (52) |
| MGK cel (g/cm ²) | 0,702 ± 0,079 (20) | 0,749 ± 0,114 (25) | 0,750 ± 0,060 (7) | 0,731 ± 0,097 (52) |
| MGK lv (g/cm ²) | 0,756 ± 0,087 (20) | 0,760 ± 0,058 (25) | 0,776 ± 0,064 (7) | 0,761 ± 0,070 (52) |
| dMGK vs (%)* | - 0,87 ± 3,43 (20) | - 0,73 ± 3,63 (25) | - 2,07 ± 3,29 (7) | - 0,97 ± 3,46 (52) |
| dMGK cel (%)* | - 1,17 ± 4,46 (20) | 0,73 ± 7,59 (25) | 0,16 ± 1,70 (7) | - 0,08 ± 5,67 (52) |
| dMGK lv (%)* | - 2,63 ± 3,47 (20) | - 1,13 ± 3,06 (25) | 0,26 ± 3,85 (7) | - 1,52 ± 3,41 (52) |

* Sprememba vrednosti spremenljivke med enoletnim zdravljenjem v odstotkih.