

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
Visokošolski študij laboratorijske biomedicine

ALEKSANDRA TINTA

**VPLIV POLIMORFIZMOV V GENU TNFSF11 NA
KONCENTRACIJE OSTEOPROTEGERINA IN RANKL V SERUMU
PRI BOLNIKI OKUŽENIH S HIV**

**INFLUENCE OF POLYMORPHISMS IN TNFSF11 GENE ON
OSTEOPROTEGERIN AND RANKL SERUM CONCENTRATIONS
AT HIV INFECTED PATIENTS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za Farmacijo na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec.med.biokem.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici izr.prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec.med biokem. za strokovno pomoč in vzpodbudo pri izvajanju in izdelavi diplomske naloge. Hvala tudi Majdi Osredkar, dipl.ing.lab.biomed., Manji Cedilnik dipl.ing.lab.biomed. in asist. Karmen Teskač, mag.farm., ter vsem ostalim na Katedri za klinično biokemijo, za praktične nasvete in tehnično pomoč.

Zahvaljujem se tudi svojim domačim in sodelavcem, ki so mi stali ob strani in me vzpodbujali pri doseganju zastavljenega cilja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag.farm., spec.med.biokem.

Aleksandra Tinta

Predsednik diplomske komisije: izr.prof. dr. Samo Kreft, mag.farm.

Član diplomske komisije: izr.prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

Ljubljana, junij 2009

Kazalo vsebine

Seznam okrajšav
seznam preglednic
seznam slik

1. UVOD	1
1.1. HIV IN AIDS	1
I. NAČINI OKUŽBE Z VIRUSOM HIV	2
II. EPIDEMIOLOGIJA	3
Svet	3
Evropa	3
Slovenija	4
III. ZAPLETI PRI OKUŽBI S HIV	4
Najpogostejše bakterijske okužbe pri bolnikih okuženih s HIV	4
Najpogostejše virusne okužbe pri bolnikih okuženih s HIV	5
Najpogostejše glivične okužbe pri bolnikih okuženih s HIV	5
Najpogostejše parazitske okužbe pri bolnikih okuženih s HIV	6
Najpogostejša rakava obolenja pri bolnikih okuženih s HIV	6
Drugi zapleti pri bolnikih okuženih s HIV	6
1.2. ZGRADBA KOSTININE IN REMODELACIJA	7
Funkcije kosti	7
Mikroskopska struktura kostnine	8
Makroskopska struktura kostnine	9
Kostna remodelacija	9
1.3. OSTEOPOROZA	10
Definicija osteoporoze	10
Etiopatogeneza osteoporoze	11
Incidenca in prevalenca osteoporoze	12
Oblike osteoporoze	13
Diagnoza osteoporoze	13
Preprečevanje in zdravljenje osteoporoze	14
Genetika pri osteoporozi	14
1.4. OPG / RANK / RANKL SISTEM	15
I. ODKRITJE IN ZNAČILNOSTI OPG/RANK/RANKL SISTEMA	15
II. DELOVANJE OPG/RANK/RANKL SISTEMA V PROCESU REMODELACIJE	16
III. REGULACIJA SISTEMA OPG/RANK/RANKL	18

IV. RANKL	18
Struktura RANKL	19
Gen TNFSF11	20
Promotor TNFSF11 gena	20
1.5. INFEKCIJA S HIV IN TVEGANJE ZA OSTEOPOROZO.....	21
2. NAMEN DELA.....	23
3. METODE IN MATERIALI	24
3.1. SPLOŠNA OPOZORILA.....	24
3.2. PREISKOVANCI	24
3.3. IZOLACIJA DNA IN PRIPRAVA DELOVNE RAZTOPINE DNA	24
3.4. MERJENJE SERUMSKIH KONCENTRACIJ RANKL IN OPG	25
3.5. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO - POMNOŽEVANJE 2. ODSEKA PROMOTORJA TNFSF11 GENA	27
3.6. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV	33
I. BsaJI – RFLP ANALIZA	33
II. TspRI – RFLP ANALIZA	37
3.7. STATISTIČNE ANALIZE	41
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	43
4.1. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	43
4.2. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV IN DOLOČANJE GENOTIPOV	45
I. ANALIZA POLIMORFIZMA -693G>C	45
II. ANALIZA POLIMORFIZMA -643C>T	47
4.3. UGOTAVLJANJE POGOSTNOSTI POLIMORFIZMOV	49
4.4. OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV S KONCENTRACIJAMI OPG, RANKL V SERUMU IN RAZMERJEM MED NJIMA.....	50
I. RAZLIKE V KONCENTRACIJI OPG MED GENOTIPI.....	51
II. RAZLIKE V KONCENTRACIJI RANKL MED GENOTIPI	53
III. RAZLIKE V RAZMERJU KONCENTRACIJ RANKL/OPG MED GENOT	54
4.5. KORELACIJSKA ANALIZA GENOTIPOV S SERUMSKIMI KONCENTRACIJAMI OPG, RANKL IN RAZMERJU MED NJIMA.....	55
4.6. PRIMERJAVA HAPLOTIPOV S SERUMSKIMI KONCENTRACIJAMI OPG, RANKL IN NJUNIM RAZMERJEM	56
I. ZDRUŽITEV V HAPLOTIPE IN PRIMERJAVA SREDNJIH VREDNOSTI PODSKUPIN HAPLOTIPOV	56
II. RAZLIKE V KONCENTRACIJI OPG MED PODSKUPINAMI HAPLOTIPOV	57

III. RAZLIKE V KONCENTRACIJI RANKL MED PODSKUPINAMI HAPLOTIPOV	58
IV. RAZLIKE V RAZMERJU KONCENTRACIJ RANKL/OPG MED PODSKUPINAMI HAPLOTIPOV	58
4.7. ZAKLJUČEK K RAZPRAVI	59
5. SKLEP	62
6. LITERATURA	64

Priloga 1

POVZETEK

Gen TNFSF11, ki kodira protein RANKL je eden izmed kandidatnih genov za razvoj osteoporoze in polimorfizmi prisotni v promotorju tega gena lahko vplivajo na izražanje tega proteina. Zato je bil naš namen ugotoviti pogostost polimorfizmov -643C>T in -693G>C v promotorju gena TNFSF11 in njuno povezanost s serumskimi koncentracijami RANKL, OPG in razmerjem RANKL/OPG, pri bolnikih okuženih z virusom HIV.

V raziskavo je bilo vključenih 114 bolnikov okuženih z virusom HIV, ki se zdravijo na Infekcijski kliniki. Bolnikom so bile predhodno izmerjene koncentracije OPG in RANKL v serumu, izolirana je bila DNA. S PCR reakcijo smo pomnožili DNA potrebno za nadaljnje analize.

Z metodama BsaJI-RFLP in TspRI-RFLP smo določili genotipe dveh mononukleotidnih polimorfizmov pri vseh bolnikih vključenih v raziskavo. S statistično analizo smo ugotovili, da se frekvence le teh porazdeljujejo v skladu z Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem.

Z nadaljnjo statistično analizo smo ugotavljali vpliv polimorfizmov na serumske koncentracije OPG, RANKL in razmerje med njima. Za primerjavo koncentracij OPG smo uporabili parametrične teste (normalna porazdelitev spremenljivke): ANOVA in Post hoc test ter t-test. Za primerjavo koncentracij RANKL in razmerja RANKL/OPG pa smo uporabili neparametrične teste (nenormalna porazdelitev spremenljivke): Kruskal-Wallis in Mann-Whitney test. V vseh primerih so bile vrednosti $p > 0,05$ in zato razlike med srednjimi vrednostmi koncentracij glede na genotip niso bile statistično značilne, iz česar sklepamo da polimorfizma -643C>T in -693G>C ne vplivata na serumske koncentracije RANKL, OPG in razmerje RANKL/OPG. S korelacijsko statistično analizo (Spearmanov koeficient korelacije) smo ugotavljali moč in značilnost povezave med polimorfizmoma ter koncentracijami OPG, RANKL in razmerjem RANKL/OPG. Ugotovili smo, da je v vseh primerih korelacija šibka ($p < 0,2$) in neznčilna ($p > 0,05$). Ugotovili pa smo, da je zelo močna ($p > 0,9$) in značilna ($p < 0,01$) korelacija med preiskovanima polimorfizmoma, zato smo se odločili za nadaljnjo haplotipsko analizo. Alele genotipa posameznega polimorfizma smo združili v haplotipa CG in TC (s pripadajočimi podkupinami: 0 kopij CG oziroma TC, 1 kopija CG oziroma TC in 2 kopiji CG oz. TC). Z ANOVA in Post hoc testom za OPG ter Kruskal-Wallis testom za RANKL in razmerje RANKL/OPG smo primerjali srednje vrednosti glede na haplotip. V vseh primerih so bile vrednosti $p > 0,05$ in

razlike med njimi zato neznailne. Iz tega smo sklepali, da haplotipa ne vplivata na serumske koncentracije RANKL, OPG in razmerje RANKL/OPG.

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da polimorfizma -643C>T in -693G>C ne vplivata pomembno na serumske koncentracije OPG, RANKL oziroma na razmerje med njima pri bolnikih okuženih s HIV.

SEZNAM OKRAJŠAV

AA	- akrilamid
AIDS	– sindrom pridobljene imunske pomankljivosti (<i>angl.</i> Acquired Immunodeficiency Sindrom)
bAA	- N,N'-metilenbisakrilamid
c-Fms	– receptor za M-CSF
dATP	– deoksiadenozin trifosfat
dCTP	– deoksicitidin trifosfat
dGTP	– deoksigvanozin trifosfat
DNA	– deoksiribonukleinska kislina
dNTP	– deoksinukleozid trifosfat
dTTP	– deoksitimidin trifosfat
EF	– elektroforeza
ELISA	- Encimskoimunski test (<i>angl.</i> Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
HIV	- virus človeške imunske pomanjklivosti (<i>angl.</i> Human Immunodeficiency virus)
M-CSF	– makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (<i>angl.</i> Macrophage colony – stimulating factor)
MKG	– mineralna kostna gostota (<i>angl.</i> BMD – bone mineral density)
NF- κB	– jedrni factor - kapa B (<i>angl.</i> Nuclear factor κB)
OPG	- osteoprotegerin (<i>angl.</i> Osteoprotegerin)
PAGE	– elektroforeza na poliakrilamidnem gelu
PCR	– verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> Polymerase Chain Reaction)
RANK	– receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (<i>angl.</i> Receptor activator of nuclear factor κB)
RANKL	– ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (<i>angl.</i> Receptor activator of nuclear factor κB ligand)
RFLP	– analiza plimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (<i>angl.</i> Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	– ribonukleinska kislina
SNP	– mononukleotidni polimorfizem (<i>angl.</i> single nucleotide polymorphism)
sRANKL	- topni RANKL
SZO	– Svetovna zdravstvena organizacija
TNF	– faktor tumorske nekroze (<i>angl.</i> Tumor necrosis factor)
TNFSF PR2	– drugi odsek promotorja gena TNFSF11
TNFSF11A	– naddružina dejavnikov tumorske nekroze, član 11 (<i>angl.</i> tumor necrosis factor superfamily, member 11)
TRAIL	– ligand, ki povzroči apoptozo z delovanjem na TNF (<i>angl.</i> TNF related apoptosis-inducing ligand)

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Podatki UNAIDS o okuženosti in umrlih zaradi HIV	3
Preglednica II: Notranji in zunanji dejavniki tveganja za osteoporozo.....	12
Preglednica III: Tipi osteoporoze	14
Preglednica IV: Zdravila namenjena zdravljenju osteoporoze	15
Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje TNFSF11-PR2	30
Preglednica VI: Pogoji za potek reakcije pomnoževanja TNFSF11-PR2	31
Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za RFLP z BsaJI	36
Preglednica IX: Sestava reakcijske zmesi za RFLP z TspRI.....	40
Preglednica IX: Frekvence posameznih genotipov	51
Preglednica X: Prikaz eksperimentalnih in izračunanih relativnih frekvenc posameznih genotipov za oba polimorfizma.	51
Preglednica XI: Pregled srednjih vrednosti po genotipih za oba polimorfizma.....	52
Preglednica XII: Povezanost genotipov posameznega polimorfizma s serumskimi koncentracijami OPG - pregled statističnih testov in rezultati.....	53
Preglednica XIII: Testiranje razlik med variancami za oba polimorfizma in izbira t-testa	54
Preglednica XIV: Povezanost genotipov posameznega polimorfizma s serumskimi koncentracijami RANKL -pregled statističnih testov in rezultati	55
Preglednica XV: Povezanost genotipov posameznega polimorfizma z razmerjem RANKL/OPG -pregled statističnih testov in rezultati.....	56
Preglednica XVI: Neparametrična korelacija – Spermanov korelacijski koeficient (ro)	57
Preglednica XVII: Pregled frekvenčne porazdelitve in srednjih vrednosti koncentracij OPG, RANKL in razmerja za posamezne podskupine haplotipov CG in TC.....	58
Preglednica XVIII: Povezanost podskupin posameznega haplotipa s koncentracijami OPG - pregled statističnih testov in rezultati.....	59
Preglednica XIX: Povezanost haplotipov s serumskimi koncentracijami RANKL - pregled statističnih testov in rezultati	60
Preglednica XX: Povezanost haplotipov z razmerjem RANKL/OPG - pregled statističnih testov in rezultati	60

SEZNAM SLIK

Slika 1: Zgradba virusa HIV	1
Slika 2: Funkcije kostnine.....	8
Slika 3: Makroskopska razdelitev kostnine	9
Slika 4: Shematski prikaz poteka remodelacije	11
Slika 5: Shematski prikaz normalne in osteoporotične kosti	11
Slika 6: Merjenje BMD z DXA	14
Slika 7: Shematski prikaz delovanja sistema OPG/RANK/RANKL.....	18
Slika 8: Prikaz reakcij v celici preosteoklasta po aktivaciji RANK z RANKL.....	19
Slika 9: Shematski prikaz RANKL proteina	21
Slika 10: Shematski prikaz structure cDNA in razmerja ekson/intron v genu TNFSF11	22
Slika 11: Zaporedje nukleotidov in označena polimorfizma -643C>T in -693G>C	23
Slika 12: Shematski prikaz razdelitve promotorja (pr) gena TNFSF11 na odseke.....	45
Slika 13: Rezultati pomnoževanja 2.odseka promotorjagena TNFSF11	46
Slika 14: Rezultati pomnoževanja ponovljenih	46
Slika 15: Rezultati pomnoževanja	47
Slika 16: Shematski prikaz cepitve TNFSF11-PR2 z encimom BsaJI	48
Slika 17: Rezultat analize RFLP 18 vzorcev na 2% agaroznem gelu.....	48
Slika 18: Shematski prikaz cepitve TNFSF11-PR2 z encimom TspRI	49
Slika 19: Rezultat RFLP analize 13 vzorcev na 10% poliakrilamidnem gelu.....	50

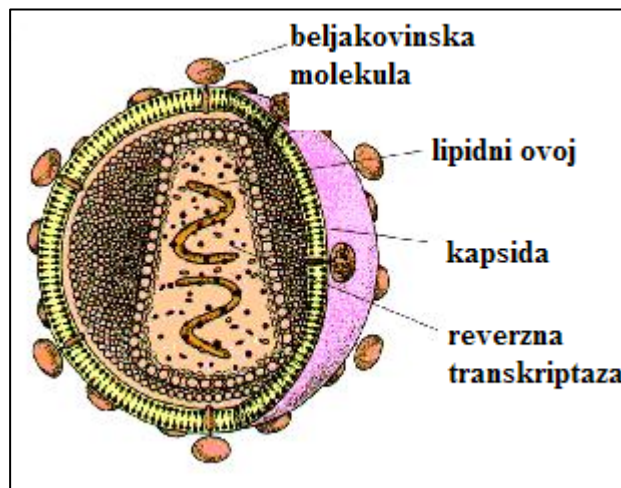
1. UVOD

Osteoporoza je v zadnjih letih dokazan in opisan zaplet pri pacientih okuženih z virusom HIV, čeprav vzroki in razvoj bolezni še niso povsem razjasnjeni. Za osteoporozo je značilno zmanjšanje mineralne kostne gostote, neravnovesje kostnega tkiva, ki se lahko odraža v zmanjšani kostni trdnosti in posledično večji verjetnosti zlomov. Ti zapleti so opaženi pri pacientih okuženih z virusom HIV, problem pa je še bolj izražen pri pacientih, ki se zdravijo z antiretrovirusno terapijo (1,2).

Ker je danes že dosti znanega na področju kostne remodelacije, njene regulacije in prav tako na področju genetike, je vse več raziskav usmerjenih v iskanje povezav med različnimi genotipi (na področju kostne remodelacije) pri ljudeh in obolevnostjo za osteoporozo.

1.1. HIV IN AIDS

HIV - virus človeške imunske pomanjkljivosti – spada v družino **retrovirusov** in rod **lentivirusov** (slika1)(3). Za te je značilno, da imajo dolgo inkubacijsko dobo od okužbe do izbruha bolezni, ki ji sledi fatalen konec. Značilen zanje je tudi tropizem za hematopoetski in živčni sistem ter imunosupresija (4). HIV je RNA virus, ki za svoje razmnoževanje potrebuje gostiteljsko celico, kjer s pomočjo



Slika 1: Zgradba virusa HIV

encima reverzne transkriptaze prepíše svojo RNA v DNA. Ta se lahko vključi v gostiteljevo (človekovo) DNA (5). Primarno virus okuži vitalne celice človeškega imunskega sistema, celice T pomagalk (posebno CD4+ T), makrofage in dendritične celice (3). Virus lahko v gostiteljski celici ostane latenten in celica normalno deluje. Lahko

pa se aktivira, se začne razmnoževati, sproščati iz primarne gostiteljske celice in inficira nove celice.

Ko virus HIV vstopi v telo okuži veliko število celic CD4⁺ in se razmnožuje hitro – **akutna ali primarna faza infekcije**. V tej fazi se virus širi s krvjo po telesu v različne organe, posebno v limfatične. 2-4 tedne po okužbi se pri večjem delu okuženih ljudi pojavijo simptomi podobni gripi. Imunski sistem se odzove in brani telo z aktivacijo T celic ubijalk (CD8⁺) in limfociti B, ki proizvajajo protitelesa, kar drastično zniža nivo virusa v krvi. To pomeni začetek **latentne faze**. V tej fazi lahko oseba ostane leta brez kakršnihkoli simptomov povezanih z okužbo virusa HIV. **AIDS** (sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti) je **zadnja faza**. Za njen začetek je značilen upad števila celic CD4⁺ pod 200/mL krvi. Posledica je pomanjkanje celično posredovanega imunskega odziva, kar vodi v številne oportunistične okužbe in pojavljanje tumorjev.

I. NAČINI OKUŽBE Z VIRUSOM HIV

Trije glavni načini okužbe:

- **spolni odnosi** – najpogostejši način prenosa so nezaščiteni spolni odnosi, med katerimi pridejo v stik z okuženimi spolnimi izločki mukoza genitalne, oralne ali rektalne sluznice zdravih ljudi. Možnost okužbe povečujejo faktorji, ki prizadenejo sluznico (npr. ostale spolno prenosljive bolezni, ki povzročajo razjede in vnetja).
- **S krvjo in krvnimi pripravki** – najpogostejši vzrok je souporaba igel in brizg med intravenoznimi uživalci drog. Možnost okužbe pri hemofilikih in prejemnikih transfuzije in krvnih pripravkov, je v razvitem svetu majhna (rutinsko testiranje na HIV).
- **prenos z matere na otroka** – lahko že med nosečnostjo ali med porodom. Če je prisotno zdravljenje nosečnice in možnost carskega reza se ta možnost okužbe lahko zmanjša iz 25% okuženih otrok na 1%. Možna je tudi okužba z mlekom doječe matere.

Kljub temu, da **slina** okuženih vsebuje HIV, pa možnost za **okužbo ob kontaktu z njo ni dokazana**. Laboratorijske študije so dokazale, da ima slina naravno sposobnost omejiti infektivnost HIV in je njegova količina v njej zelo majhna. Prav tako **ni nobenega dokaza**, da bi se HIV prenašal z **znojem, solzami, urinom in blatom**.

Študije na družinah katerih posamezni družinski člani so HIV pozitivni, so jasno pokazale, da se virus **ne širi z vsakodnevnimi stiki** kot so souporaba kuhinjske posode, brisač, posteljnine, bazenov, telefonov in straniščnih pokrovov.

Prav tako se **ne prenaša s piki insektov** (komarjev, stenic)(3,6,7).

II. EPIDEMIOLOGIJA

SVET

Do decembra leta 2006, ko je naša raziskava potekala, je bilo po podatkih UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) stanje naslednje (preglednica I) (8).

Preglednica I: Podatki UNAIDS o okuženosti in umrlih zaradi HIV

Vsi živeči judje okuženih s HIV v 2006	39,5 milijonov
odrasli	94,2%
ženske	44,8%
otroci pod 15 let	5,8%
Novookuženi s HIV v 2006	4,3 milijonov
odrasli	88,4%
otroci pod 15 let	12,3%
Umrli zaradi AIDS-a v 2006	2.9 milijonov
odrasli	89,7%
otroci pod 15 let	13,1%

Glavni delež svetovne epidemije nosi predel Podsaharske Afrike. Tu živi največ ljudi okuženih s HIV (63%), največ je na novo okuženih (65%) in prav tako je v tem delu največji delež umrlih za AIDS-om (72%).

Od leta 2004 - 2006 se je število živečih okuženih s HIV povečalo v vseh svetovnih regijah, najbolj pa je narastlo v državah Vzhodne Azije in na področju Vzhodne Evrope in Centralne Azije, kjer je število živečih okuženih s HIV kar za petino večje kot leta 2004.

V mnogih svetovnih regijah je največ novih okužb med mladostniki (15-24 let), kar zavzema 40% v skupini novih okužb pri odraslih v letu 2006 (8).

EVROPA

Na področju Evrope je bilo v letu 2005 (48 evrop. držav) prijavljenih največje število novih okužb iz Vzhodne Evrope (186/milijon prebivalcev), 2 krat manj iz Zahodne Evrope

in 20 krat manj iz Centralne Evrope. V Vzhodni Evropi je še vedno glavni način prenosa souporaba za injiciranje prepovedanih drog, medtem ko je v Centralni in Zahodni Evropi glavni način širjenja z nezaščitenimi heteroseksualnimi spolnimi odnosi (8).

SLOVENIJA

Slovenija je ena redkih držav, kjer je še relativno malo število okuženih s HIV (<1/1000 prebivalcev). Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja RS je bilo leta 2006 na novo prijavljenih okužb s HIV 28 (26 moških in 2 ženski). Od tega se je 21 moških okužilo pri istospolnih spolnih odnosih, 2 moška pri heteroseksualnih spolnih odnosih, 1 pa z injiciranjem prepovedanih drog. Od 2 novookuženih žensk se je ena okužila s heteroseksualnimi spolnimi odnosi. Ostali 3 niso bili razvrščeni v nobeno izmed skupin z višjim tveganjem.

Za AIDS-om je v letu 2006 zbolelo 5 oseb (vsi moški), umrl pa ni nihče.

Tako je v Sloveniji najbolj ogrožena skupina moških, ki imajo spolne odnose z moškimi.

Glede na relativno zanesljivo sliko o razvoju epidemije AIDS-a, so podatki o prijavljenih primerih okužb s HIV manj zanesljivi, ker niso odvisni le od števila okužb med prebivalstvom ampak tudi od obsega testiranja. Testiranje pa je v Sloveniji v primerjavi s številnimi drugimi evropskimi državami relativno majhno. To nakazuje, da je pri nas zagotovo precej več okuženih s HIV, kot je prijavljenih primerov (8,9).

III. ZAPLETI PRI OKUŽBI S HIV

Simptomi AIDS-a so posledica oslabljenega imunskega sistema. Zaradi infekcije z virusom HIV so ti ljudje podvrženi številnim bakterijskim, virusnim, glivičnim okužbam ter okužbam s paraziti. Oboleli za AIDS-om so podvrženi tako imenovanim številnim **oportunističnim infekcijam**, ki se jih neprizadet imunski sistem, pri zdravih ljudeh, obrani. Pri ljudeh obolelih za AIDS-om je večja tudi možnost za razvoj različnih **rakavih obolenj**. HIV prizadene večino organskih sistemov.

NAJPOGOSTEJŠE BAKTERIJSKE OKUŽBE PRI BOLNIKI OKUŽENIH S HIV

- **bakterijske pljučnice** – ene od najpogostejših oportunističnih infekcij, ki jih lahko povzročijo različne bakterije

- **Mycobacterium Aviumcomplex (MAC)** – ponavadi povzroča infekcijo zgornjih dihalnih poti, pri imunsko oslabljenih pa se lahko razvije sistemska okužba, ki lahko prizadene skoraj vse notranje organe, vključno s kostnim mozgom.
- **tuberkuloza** – je najpogostejša oportunistična infekcija v revnih deželah in glavni vzrok smrti med obolelimi za AIDS-om. Problem je v tem da bolezní pospešujeta ena drugo. Prvotno prizadene pljuča, lahko pa se razširi po krvi in skozi limfne

žleze v druge organe.

- **salmoneloze** – okužba s kontaminirano hrano ali vodo. Povzroča hudo diarejo, vročino, bruhanje, abdominalne krče,... Okužbe pri bolnikih z AIDS-om so pogostejše.
- **bacilarna angiomatoza** – je poseben tip neoplastične proliferacije malih krvnih žil v koži, limfnih vozlih in notranjih organih pri bolnikih okuženih s HIV. Pri zdravih ljudeh zelo redka (10,11,12,13).

NAJPOGOSTEJŠE VIRUSNE OKUŽBE PRI BOLNIKI OKUŽENIH S HIV

- **Citomegalovirus (CMV)** – je virus, ki lahko povzroči infekcijo skoraj vseh organskih sistemov. Ob okužbi z njim ga zdrav imunski sistem inaktivira, vendar ostane neaktiven v telesu. Ob padcu imunske odpornosti pride do izbruha infekcije, ki prizadene oči (lahko vodi v slepoto), pljuča, prebavni trakt,...
- **virusni hepatitis** – je virusna okužba jeter. Najbolj pogosti A, B in C. Pogosta okužba s HBV/HCV in hkrati s HIV je posledica podobnega načina prenašanja virusov.
- **Herpes simplex virus (HSV)** – ponavadi povzroča genitalni herpes in se prenaša z nezaščitenimi spolnimi odnosi. Pri okuženih z virusom HIV so razjede na koži in sliznicah hujše in trajajo dalj časa, lahko pa pride tudi do hudih sistemskih okužb.
- **Humani papiloma virus (HPV)** – je med najpogostejšimi spolno prenosljivimi virusi. Okuženi s HIV so infekcijam bolj podvrženi in prav tako reinfekcijam. Posebno nevaren je za ženske, ker povečuje tveganje za nastanek raka materničnega vratu, kar pa je pri bolnicah okuženih s HIV še bolj izraženo.
- **Progresivna multifokalna leukoencefalopatija (PML)** – je zelo resna okužba možganov, ki jo povzroča humani polyoma virus JCV. Pojavi se le kadar je imunski sistem izredno prizadet (10,11,12,13,14).

NAJPOGOSTEJŠE GLIVIČNE OKUŽBE PRI BOLNIKI OKUŽENIH S HIV

- **kandidaze** – kandidaze so med najpogostejšimi glivičnimi infekcijami v povezavi s HIV. Prizadenejo ustno votlino, požiralnik in genitalije. Kandidaze bronhijev, sapnic, pljuč in požiralnika pa so opisane kot AIDS definirajoče bolezni.
- **kriptokokni meningitis** – je najpogostejša okužba, ki prizadene centralni živčni sistem pri bolnikih okuženih s HIV. Povzročajo ga glive prisotne v zemlji. Je

vnetje možganskih membran, obdajajoče tekočine in hrbtenjače. Posledice okužbe so lahko zelo resne, celo smrtne (10,11,12).

NAJPOGOSTEJŠE PARAZITSKE OKUŽBE PRI BOLNIKI OKUŽENI S HIV

- **pneumocistična pljučnica (PCP)** – je ena izmed najpogostejših oportunističnih infekcij pri ljudeh z AIDS-om v ZDA. Prizadane predvsem pljuča.
- **toksoplazmoza** – je potencialno smrtna okužba, ki jo povzroča *Toxoplasma gondii*. Širi se z mačke na človeka. Pri ljudeh z normalnim imunskim odzivom ponavadi okužba ni nevarna in je niti ne zaznamo. Nevarno pa je, če se ženska okuži med nosečnostjo, saj okužba preide na plod, kar ima lahko resne posledice. Okužba je prav tako nevarna za bolnike z AIDS-om saj vodi v encefalitis – okužbo možganov.
- **kriptosporidioza** – okužba preko kontaminirane hrane in vode. Povzroča jo intestinalni parazit *Cryptosporidium parvum*, ki je najbolj razširjen povzročitelj črevesnih okužb po svetu. Pri bolnikih z AIDS-om povzroča zelo hude kronične diareje (10,11,12).

NAJPOGOSTEJŠA RAKAVA BOLENJA PRI BOLNIKI OKUŽENI S HIV

- **Kaposijev sarkom** – je najbolj pogosta oblika raka pri bolnikih okuženih z virusom HIV. Povzroča ga humani herpesvirus 8 v prisotnosti drugih dejavnikov (oslabljen imunski sistem, oksidativni stres). Gre za rakavo obolenje limfatičnega endotelija, pri katerem se tvorijo žilni kanali, zapolnjeni s krvnimi celicami, kar daje tumorju videz modrice. Ponavadi se lezije pojavijo na koži, lahko pa prizadenejo tudi usta, prebavni trakt in pljuča. Izboljšanje lahko nastopi ob antiretrovirusni terapiji, ki jo prejemejo HIV bolniki.
- **Ne-Hodgkinovi limfomi** – so novotvorbe limfatičnega tkiva. Vzniknejo ponavadi v skupini bezgalk in se razširijo po organizmu nepredvidljivo, na druge skupine bezgalk, vranico, jetra, kostni mozeg in druge organe (10,11,12).

DRUGI ZAPLETI PRI BOLNIKI OKUŽENI S HIV

- **sindrom izgube telesne teže** – definiran je z izgubo najmanj 10% telesne teže. Vzroki so lahko različna vnetja, diareje, izguba apetita, vročina in mnogi drugi povezani z AIDS-om. Lahko privedejo do anoreksije.
- **nevrolški zapleti** – kljub temu, da AIDS ne inficira živčnih celic, pa vseeno lahko

povzroča nevrološke simptome kot so pozabljivost, zmedenost, spremembe v obnašanju, depresijo, tesnobo in težave s hojo. eden najpogostejših nevroloških zapletov je demenca. Stanje se lahko izboljša z agresivno antiretrovirusno terapijo.

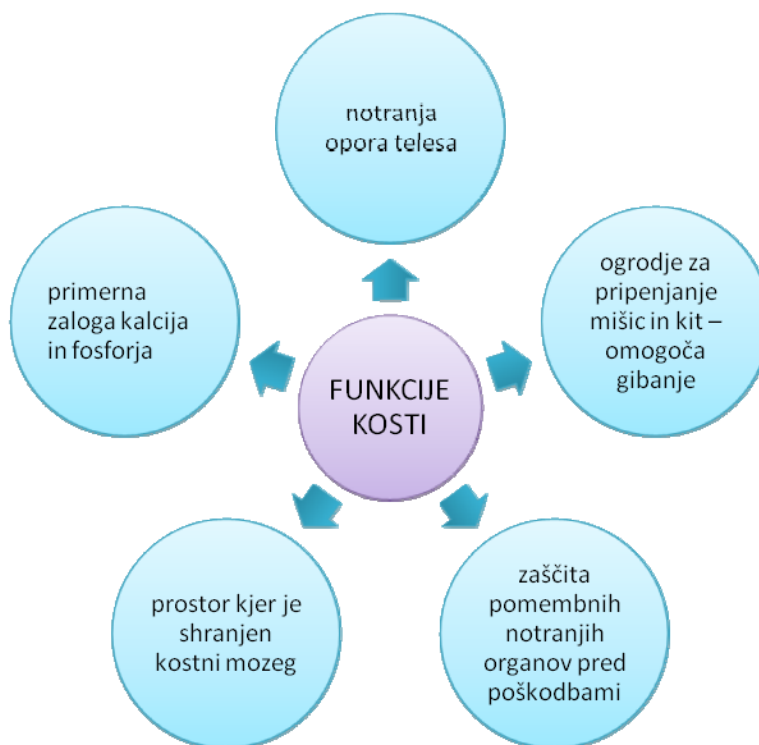
➤ **lipodistrofija** – nepravilen metabolizem maščob in kopičenje in/ali izguba maščobnega tkiva na različnih delih telesa. Izraža se pri bolnikih zdravljenih z antiretrovirusno terapijo.

➤ **osteoporoza** – zmanjšana telesna aktivnost, daljša ležalna doba zaradi bolezni, velika izguba teže, podhranjenost, motnje v delovanju paratiroidnega hormona, hipogonadizem so vsi rizični faktorji za osteoporozo in so prisotni pri napredovanju HIV infekcije (10,11,12,15).

1.2.ZGRADBA KOSTINE IN REMODELACIJA

Kosti so organi sestavljeni pretežno iz tkiva kostnine, ki se nenehno spreminja in v telesu opravlja številne naloge. Vse kosti v telesu so združene v okostje ali skelet.

FUNKCIJE KOSTI

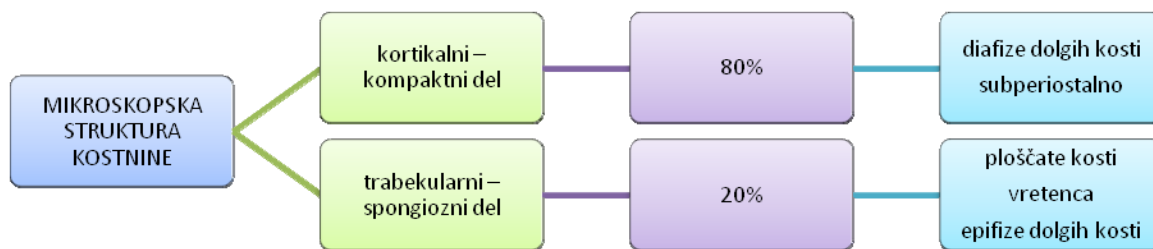


Slika 2: Funkcije kosti

MIKROSKOPSKA STRUKTURA KOSTNINE

- **medceličnina (zunajcelični matriks)** – 90% **organskega dela** kostnine predstavlja kolagen tipa I (kosti daje prožnost). Organski matriks sestavlja še amorfna osnova v kateri ležijo kolagenska vlakna in je sestavljena iz sulfatiranih glikozaminoglikanov (hondroitin-4-sulfata, hondroitin-6-sulfata, keratan sulfata) in različnih kostnih proteinov (kostnega sialoproteina, osteokalcina). **Anorganski del** medceličnine (kosti daje trdnost) predstavljajo anorganske soli. Najpogostejši so fosfati in kalcijeve soli, najdemo pa tudi bikarbonatne, citratne, magnezijeve, kalijeve in natrijeve ione. Kalcij je v kosti vezan s fosforjem v dve obliki - amorfni kalcijev fosfat (izmenjava kalcija z okolico in vzdrževanje normalnega notranjega okolja) in kristale hidroksiapatita (vezava kristalov s kolagenskimi vlakni; sproščanje kalcija samo med procesom remodelacije - med fazo resorpcije) (16,17,18).
- **celice – osteoprogenitorne celice** izvirajo iz mezenhimskih celic in se nahajajo v periostu in endostu. Imajo veliko mitotsko sposobnost in sposobnost diferenciacije v osteoblaste. **Osteoblasti** tvorijo osteoid – nekalcificiran kostni matriks sestavljen pretežno iz kolagena. Odgovorni so tudi za mineralizacijo osteoida, s pomočjo encima alkalne fosfataze, ki ga vsebujejo. V predelu nastajajoče kostnine tvorijo osteoblasti epiteliju podobno plast izoprizmatških celic. Ko se aktivni osteoblasti obdajo z medceličnino, postanejo manj aktivni in se preoblikujejo v osteocite. **Osteociti** se nahajajo v lakunah in imajo manjšo sintetsko aktivnost. Odgovorni so za vzdrževanje medceličnine s hitrim sproščanjem kalcija iz kosti. **Osteoklasti** so največje kostne celice in vsebujejo številna jedra (4-20). Predstopnje osteoklastov nastanejo iz hemopoetske matične celice monocitno-makrofagne vrste, se izplavijo iz kostnega mozga in s krvjo pridejo do kostnine, kjer se preoblikujejo v osteoklaste. Ti so odgovorni so za kostno resorpcijo (17,19,20).

MAKROSKOPSKA STRUKTURA KOSTNINE



Slika 3: Makroskopska razdelitev kostnine

Procesi metabolizma in prenove potekajo samo na površini kosti in ker je ravne kortikalne površine le ena tretjina, se spremembe najprej pokažejo na trabekularni kosti.

Bistveno vlogo pri uravnavanju kostne presnove in uravnavanju nivoja kalcija v plazmi imajo **parathormon, kalcitonin in vitamin D₃**. Ostali hormoni, ki sodelujejo pri remodelaciji kosti so: **rastni hormon, insulin, glukokortikoidi, ščitnični in spolni hormoni**. Poleg hormonov imajo pomembno vlogo tudi **lokalni dejavniki in tkivni hormoni (citokini in prostaglandini)** (16,17).

KOSTNA REMODELACIJA

Kostnina je dinamično tkivo, ki se vseskozi pregrajuje (remodelira) in reorganizira na kar vplivajo šteilni dejavniki:

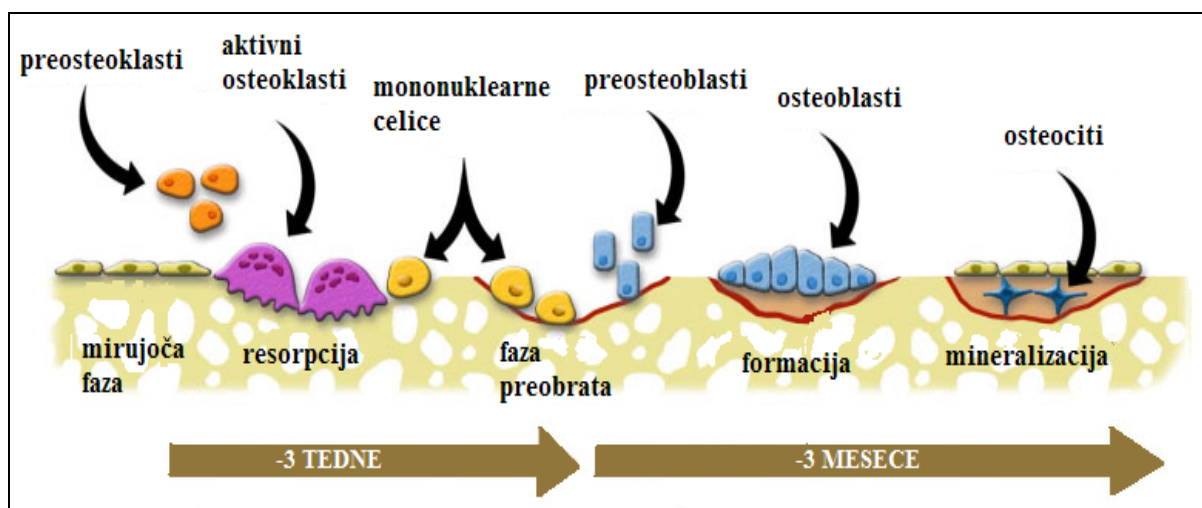
- mehanski dražljaji
- metabolni vzroki (pomanjkanje vnosa kalcija, bolezen, staranje)
- endokrine spremembe
- vpliv zdravil

Predvideva se, da cikel remodelacije traja približno 4 mesece, od tega traja razgradnja 2-3 tedne, izgradnja pa približno 3 mesece (slika 4)(21). Proces poteka v večih fazah:

- **faza mirovanja** – kostno površino pokrivajo sploščeni, neaktivni osteoblasti
- **faza razgaljenja** – razmik neaktivnih osteoblastov in razgaljenje kostne površine
- **faza aktivacije** – kaže se v prisotnosti večjedrnih osteoklastov, ki jih privabi razgaljena kostna površina. Obseg in hitrost razgradnje kostnine sta odvisna od števila aktivnih mest na kostni površini.
- **faza resorpcije** – pritrjeni osteoklasti razgrajujejo kostnino s pomočjo ustvarjanja

kislega okolja (lizosomska karboanhidraza), kar omogoča, da se hidroksiapatit raztopi, kolagenska vlakna pa so izpostavljena delovanju kisle fosfataze in katepsina K. Proteolitično delovanje osteoklastov ima za posledico vdolbino imenovano Howshipova lakuna. Razgradni produkti se v osteoklastih predelajo in izločijo v krvni obtok.

- **faza preobrata** – osteoklasti se odmaknejo in pustijo za seboj prazne Howshipove lakune, ki jih očistijo mononuklearni fagociti in jih obložijo s cementno oblogo
- **faza tvorbe novega osteoida** – aktivni osteoblasti zapolnijo Howshipove lakune z osteoidom (nekalificiran kostni matriks pretežno iz kolagena)
- **faza mineralizacije** – osteoblasti s pomočjo lastnega encima, alkalne fosfataze, omogočajo mineralizacijo osteoida. Pri mineralizaciji pomagajo tudi drugi proteini kostnega matriksa (osteokalcin, osteonektin).
- **faza mirovanja** – po končani mineralizaciji se osteoblasti spet sploščijo, postanejo neaktivni in prekrijejo novo nastalo kostnino.



Slika 4: Shematski prikaz poteka remodelacije

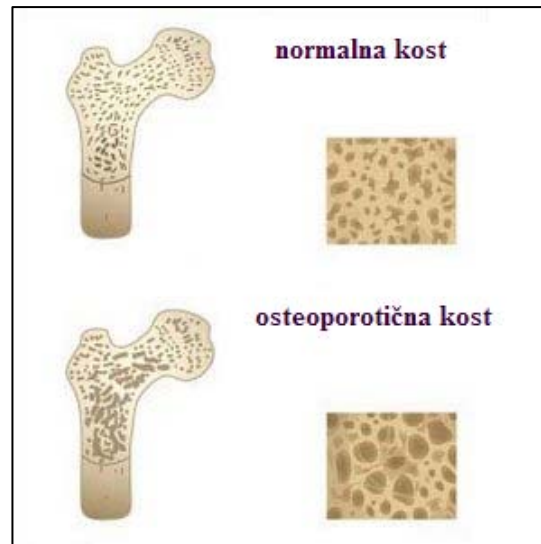
1.3. OSTEOPOROZA

DEFINICIJA OSTEOPOROZE

Osteoporoza je sistemska bolezen okostja, za katero je značilna zmanjšana trdnost kosti in posledično povečano tveganje zlomov. Trdnost kosti odraža povezavo dveh njenih glavnih lastnosti: gostote kosti (grami mineralov na površinsko ali prostorninsko enoto) in

kakovosti kosti, ki se nanaša na arhitekturo, premeno, kopičenje poškodb in mineralizacijo (slika 5).

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne gostote kosti. Po tej definiciji je osteoporozo zmanjšanje mineralne kostne gostote za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso (22).



Slika 5: Shematski prikaz normalne in osteoporotične kosti

ETIOPATOGENEZA OSTEOPOROZE

V obdobju odraščanja se več kosti zgradi kot razpade – zato se količina kostne mase večja. Količina kortikalnega dela kosti se večja približno do 30. leta, trabekularnega pa približno do 25. leta. Po obdobju odraščanja sta procesa izgradnje in razpadanja uravnotežena in v tem obdobju se dodatno poveča kostna gostota. To obdobje traja tja do 40. leta, ko pri obeh spolih nastopi fiziološko postopno propadanje kostnega tkiva. Nekaj let je proces pri obeh spolih enako intenziven, po menopavzi pa je izguba kostne mase pri ženskah mnogo večja kot pri moških.

Dejavniki, ki določajo nivo maksimalne količine kostne mase in nanje ne moremo vplivati so genska pogojenost, rasa in spol (preglednica II). Poleg teh pa deloma vpliva tudi pravilna prehrana zmerna telesna dejavnost v dobi odraščanja (16, 18).

Prizadet je predvsem trabekularni del kosti (velika površina). Vse življenje se kost neprenehoma dograjuje na periostalni strani, medtem ko poteka pospešena resorpcija endostalno. Končni rezultat propadanja kostne mase pri dolгих kosteh je večji zunanji premer kosti in manjša debelina korteksa kot v zreli dobi. Trabekule se s staranjem tanjšajo, fenestrirajo, prekinejo in izginejo. Prostori med še preostalimi trabekulami se večajo.

Preglednica II: Notranji in zunanji dejavniki tveganja za osteoporozo

NOTRANJI DEJAVNIKI TVEGANJA na katere nimamo vpliva	ZUNANJI DEJAVNIKI na katere lahko vplivamo
• dednost • bela rasa • ženski spol • drobna konstitucija • zapoznela puberteta • prezgodnja menopavza • nekatere bolezni žlez z notranjim izločanjem (ščitnice, obščitnice, trebušne slinavke, spolnih žlez, nadledvične žleze) • bolezni prabavil • kronična ledvična odpoved • stanje po presaditvi organov • imobilizacija zaradi bolezni ali poškodb • dolgotrajno jemanje nekaterih zdravil (kortikosteroidov, heparina, antiepileptikov, antiacidov, ciklosporina)	• zdrava prehrana z zadostno količino kalcija in proteinov • zmerna telesna aktivnost • zadostna izpostavljenost soncu • opustitev kajenja • opustitev prekomernega pitja alkoholnih pijač • zmerno uživanje kave

INCIDENCA IN PREVALENCA OSTEOPOROZE

Tipični osteoporotični zlomi so zlom zapestja, vretenc in kolka. Razporejeni so glede na starost in njihovo število strmo narašča po 75 letu (50 – 60 let zlomi zapestja, 60 – 70 let zlomi vretenc, po 75. letu zlomi kolka). Največ je zlomov vretenc. Število osteoporotičnih zlomov je v vseh obdobjih vsaj enkrat večje pri ženskah kot pri moških. Gledano v celoti, pa je število zlomov pri ženskah nekajkrat večje (tudi zaradi daljše življenske dobe žensk). Osteoporozo je najpogostejša metabolna bolezen kosti in ocenjeno je, da jo ima med 50. in 80. letom vsaka 3. ženska in vsak 6. moški. Življenska doba tistih, ki so utrpeli osteoporotični zlom vretenca ali kolka je krajša kot pri ostalih. Smrtnost zaradi zapletov, ki sledijo zlomu kolka je 10-20% (najpogostejše zaradi pljučnice). Prav tako pomembno je tudi, da osteoporozo zmanjša kvaliteto življenja starostnikov.

OBLIKE OSTEOPOROZE

Poznamo **primarno** ni **sekundarno osteoporozo**. Primarna osteoporozo je pogostejša, predvsem involutivna (preglednica III)(16).

Preglednica III: Tipi osteoporoze

primarna osteoporozo

- juvenilna
- idiopatična
- involutivna: tip I – pomenopavzalna in tip II – senilna

sekundarna osteoporozo

- endokrine bolezni
- bolezni prebavil
- bolezni kostnega mozga
- drugi vzroki

DIAGNOZA OSTEOPOROZE



Slika 6: Merjenje BMD z DXA

Za **diagnozo osteoporoze** in oceno tveganja za zlome se najpogosteje uporablja **meritev mineralne kostne gostote** (MKG ali BMD – bone mineral density), ki kaže vsebnost mineralov v kosteh. Meritve MKG je za osnovno diagnostično merilo tudi po SZO. Meritve MKG opravljamo z **dvoenergijsko rentgensko asorpciometrijo** (DXA)(slika 6), ki velja za zlati standard v diagnozi osteoporoze (22). Merimo lumbalna vretenca in proksimalni del stegenice. Sevanje je zanemarljivo, zato lahko meritve ponavljamo in tako spremljamo učinke zdravljenja.

Kot **presejalno metodo** lahko uporabimo za diagnostiko osteoporoze tudi **ultrazvočno preiskavo petnice**. Napredovano osteoporozo (kostna masa zmanjšana več kot 30%) lahko diagnosticiramo tudi z **rentgenskim slikanjem hrbtenice**.

Z **merjenjem koncentracij biokemičnih kazalcev kostne remodelacije** (gradnje in razgradnje kosti) dobimo vpogled v prenovo kosti, kar nam lahko pomaga pri **izbiri in odmerjanju terapije**. Določamo jih pri zapletenih oblikah osteoporoze pred zdravljenjem in med samim zdravljenjem.

Druge klinične in laboratorijske preiskave opravimo zato, da **izključimo druge bolezni** in ugotovimo, da ne gre morda za **sekundarno osteoporozo**. Zato vsem bolnikom določimo serumski kalcij, fosfat, alkalno fosfatazo, ureo, kreatinin, AST (aspartataminotransferaza), ALT (alaninaminotransferaza), TSH (tireoideo stimulirajoči hormon), prosti testosteron (moški). Napravimo tudi proteinogram, SR (sedimentacija) in hemogram. Pri primarni osteoporozi so vsi naštetе preiskave v mejah normalnih vrednosti. Pomagajo nam tudi meritve vitamina D ter parathormona v serumu (23).

PREPREČEVANJE IN ZDRAVLJENJE OSTEOPOROZE

Za preprečevanje osteoporoze je pomembno, da upoštevamo zunanje dejavnike in na njih vplivamo (preglednica II). Poleg tega pripomore tudi dodajanje kalcijevih pripravkov in nadomeščanje ženskih spolnih hormonov.

Pri zdravljenju gre predvsem za vpliv na zaviranje resorpcije kosti in za pospeševanje tvorbe kosti (preglednica IV) (23).

Preglednica IV: Zdravila namenjena zdravljenju osteoporoze

zaviralci resorpcije kosti	pospeševalci tvorbe kosti
➤ estrogeni ➤ modulatorji estrogenskih receptorjev ➤ kalcitonin ➤ bisfosfonati ➤ kalcijeve soli ➤ vitamin D	➤ natrijev fluorid ➤ parathormon v nizkih odmerkih

GENETIKA PRI OSTEOPOROZI

Podatki številnih laboratorijskih in kliničnih študij nam kažejo, da je osteoporoza **poligenska in multifaktorska bolezen**. Kot poligenska je opredeljena, ker je za njen

nastanek odgovorno večje število genov, pojem multifaktorska pa nam pove, da poleg različnih genov vplivajo na razvoj bolezni tudi številni zunanji dejavniki (24). Kljub številnim študijam različnih kandidatnih genov genetika osteoporoze še ni znana. Zaradi kompleksnosti osteoporoze še niso uspeli identificirati gena, ki bi zagotavljal visoko stopnjo povezanosti s to boleznijo. Med **najbolj preiskovane kandidatne gene** za osteoporozo sodijo geni, ki spadajo v skupino kalcitropnih hormonov in receptorjev (receptor za vitamin D, estrogenski receptor, receptor za kalcitonin, kalcitonin, paratiroidni hormoni, glukokortikoidni receptor, androgenski receptor), geni, ki sodijo v skupino komponent kostnega matriksa (kolagen tipa I $\alpha 1$ in $\alpha 2$, osteokalcin, osteonektin, osteopontin), geni, ki sodijo v skupino lokalnih regulatorjev (TGF- $\beta 1$, IGF1, IL-1, IL-6, RANKL/RANK/OPG sistem) in drugi (kolagenaza, vitaminD-vezujoči protein) (25). Veliko študij navaja dvomljive podatke, predvsem zaradi relativno majhnega števila preiskovancev, ki so bili v študijo vključeni. Zaradi tega so velikokrat zaključki teh študij v prid povezanosti z osteoporozo, česar pa študija na večjem številu preiskovancev ne pokaže (26).

1.4. OPG / RANK / RANKL SISTEM

I. ODKRITJE IN ZNAČILNOSTI OPG/RANK/RANKL SISTEMA

Že pred mnogimi leti je bilo dognano, da imajo osteoblasti bistveno vlogo v osteoklastni diferenciaciji. Odkritje OPG/RANK/RANKL sistema je zaključilo dolgoletno iskanje specifičnega dejavnika, ki ga proizvajajo preosteoblasti in je hkrati potreben in zadosten za razvoj oseklastov. Identifikacija tega sistema kot dominantnega in končnega mediatorja osteoklastogeneze predstavlja v zadnjih 10 letih velik napredek v biologiji kosti (27,28).

Vsi trije dejavniki spadajo v **naddružino receptorjev in ligandov dejavnikov tumorske nekroze** (TNFSF, *angl.* Tumor necrosis factor superfamily).

➤ **OPG** (osteoprotegerin, *angl.* Osteoprotegerin) je bil prvi, ki sta ga leta 1997 odkrili dve neodvisni skupini raziskovalcev z različnimi metodami in pristopom.

- znan tudi kot TNFRSF11B – receptorji naddružine dejavnikov tumorske nekroze, član 11B
- druga imena: OCIF (inhibitorni dejavnik osteoklastogeneze), TR1 (TNF

receptorju podobna molekula 1), FDCR-1 (receptor 1 folikularno dendritnih celic)

➤ **RANK** (receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, *angl.* Receptor activator of nuclear factor κ B)

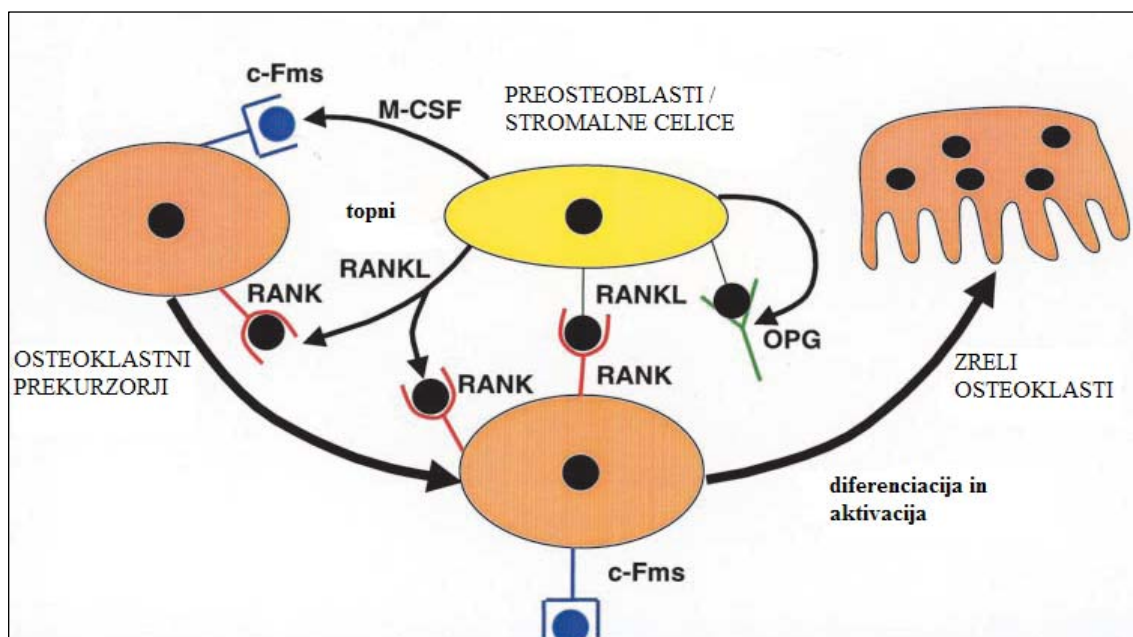
- znan tudi kot TNFRSF11A - receptorji naddružine dejavnikov tumorske nekroze, član11A
- druga imena: ODAR (receptor osteoklastne diferenciacije in aktivacije), TRANCE-R (receptor za citokin, ki inducira aktivacijo odvisno od TNF)

➤ **RANKL** (ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, *angl.* Receptor activator of nuclear factor κ B ligand)

- znan tudi kot TNFSF11 – naddružina dejavnikov tumorske nekroze, član11
- druga imena: OPG-L (ligand za osteoprotegerin), ODF (factor osteoklastne diferenciacije), TRANCE (citokin, ki inducira aktivacijo odvisno od TNF) (29)

II. DELOVANJE OPG/RANK/RANKL SISTEMA V PROCESU REMODELACIJE

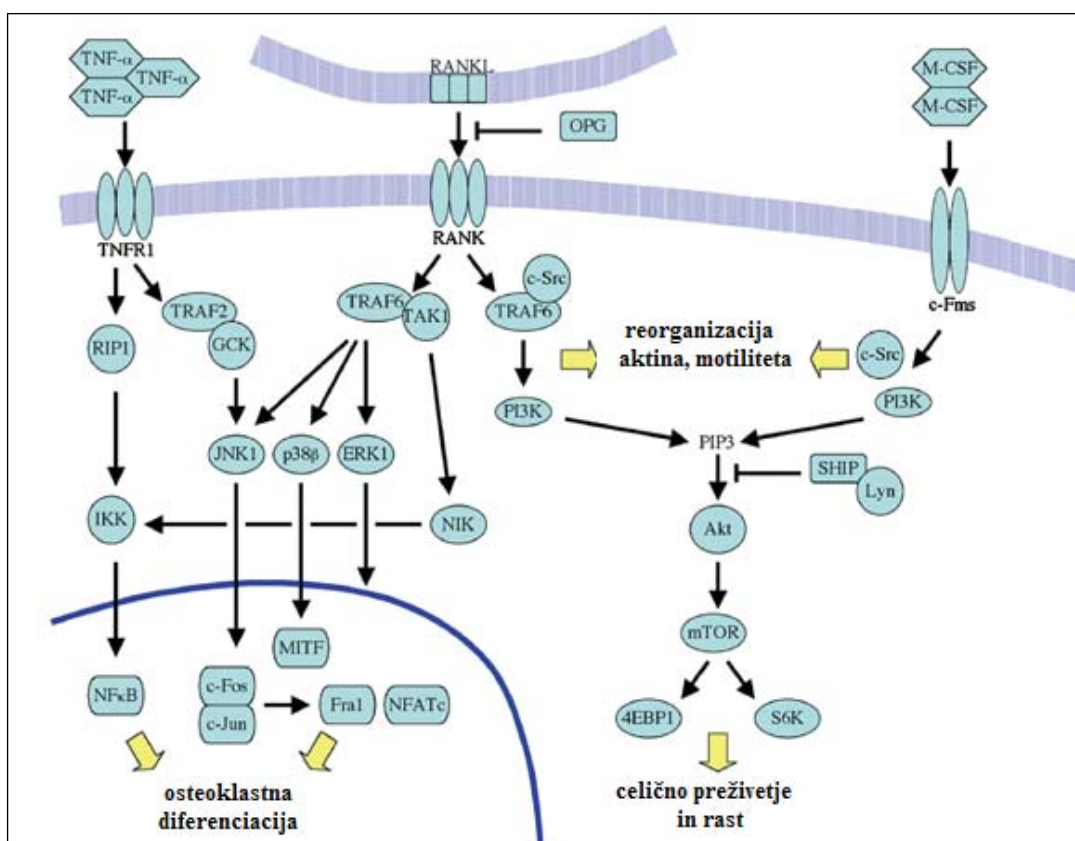
Odkritje teh treh dejavnikov tumorske nekroze nam omogoča razumevanje mehanizma komunikacije med celicami osteoblastne in osteoklastne vrste v procesu osteoklastogeneze, ki je potrebna za nemoten proces remodelacije.



Slika 7: Shematski prikaz delovanja sistema OPG/RANK/RANKL

V začetnih fazah osteoklastogeneze je pomemben dejavnik M-CSF (makrofagne kolonije stimulirajoči factor), ki ga izločajo osteoblasti in se veže na preosteoklastni površinski receptor c-Fms. Ta citokin je pomemben za razmnoževanje in preživetje preosteoklastnih celic (zavira apoptozo preosteoklastov) in je poleg RANKL potreben v začetnih fazah osteoklastogeneze (30). RANKL se nahaja na površini osteoblastov (transmembranski protein) kot receptor za RANK. Prisoten pa je tudi v topni obliki. RANK, ki je prav tako transmembranski protein, je izražen na preosteoklastih in zrelih osteoklastih. Ko pride do vezave RANKL z RANK pride do procesa dozorevanja in fuzije preosteoklastnih celic v zrele multinuklearne osteoklaste. Prav tako je RANKL pomemben za aktivacijo in preživetje osteoklastov. OPG izločajo osteoblasti in je protein v topni obliki. Zavira delovanje celotnega sistema s tem, da blokira delovanje RANKL (veže se na RANKL in mu tako prepreči vezavo z RANK) (slika 7) (27).

Zaradi vezave RANKL z RANK pride do številnih kaskadnih reakcij v celici. Vključeni so dejavniki, ki so pomembni za diferenciacijo, aktivacijo in preživetje osteoklastov (slika 8).



Slika 8: Prikaz reakcij v celici preosteoklasta po aktivaciji RANK z RANKL

Nekateri od dejavnikov, ki sodelujejo v znotrajceličnih interakcijah: TRAF (dejavniki povezani s TNF receptorji), NF-κB (jederni dejavnik κB), JNK (c-Jun N-terminalna

kinaza, transkripcijski dejavnik AP-1, stresna kinaza p38, protoonkogen c-src, in še številni drugi(27,31).

Sistem OPG/RANK/RANKL pa ima pomembno vlogo tudi pri regulaciji delovanja imunskih celic. To pojasnjuje izgubo kostne mase pri nekaterih tovrstnih boleznih. Dendritične celice kot antigeni oziroma avtoantigeni pritegnejo limfocite T in inducirajo izražanje RANKL in protivnetnih citokinov (IL-1, IL-6, IL-11 in TNF α), le ti pa posredno povečajo izražanje RANKL v osteoblastih. Tako pri kroničnih vnetjih sistemska aktivacija limfocitov T poveča obseg osteoklastogeneze, kar vodi do zmanjšanja kostne gostote. Pri akutnih vnetnih procesih pa je povečana tudi tvorba interferona γ (IFN γ), ki preko razgradnje TRAF6 v osteoklastih zavira povečano delovanje RANKL in s tem osteoklastogenezo.

III. REGULACIJA SISTEMA OPG/RANK/RANKL

Izražanje RANK je dokaj konstantno, zato je obseg kostne resorpcije uravnavan indirektno z razmerjem koncentracij OPG/RANKL. To razmerje je regulirano s številnimi sistemskimi hormoni, rastnimi dejavniki in citokini. Nekateri dejavniki, ki pomenijo za enega pozitiven signal, imajo na drugega negativen vpliv (npr. $\downarrow$ RANKL in $\uparrow$ OPG).

Številni preresorptivni citokini (TNF- α , IL-1) vplivajo na sistem s stimulacijo produkcije M-CSF in z direktnim povečanjem izražanja RANKL. Številni drugi citokini in hormoni vplivajo na osteoklastogenezo z delovanjem na osteoblastno produkcijo RANKL in OPG: TGF- β ($\uparrow$ OPG), PGE₂ ($\uparrow$ RANKL / $\downarrow$ OPG), PTH ($\uparrow$ RANKL / $\downarrow$ OPG), 1,25-dihidroksivitamin D₃ ($\uparrow$ RANKL), glukokortikoidi ($\uparrow$ RANKL / $\downarrow$ OPG), estrogen ($\uparrow$ OPG) (27,29,32).

IV. RANKL

Kmalu po identifikaciji OPG kot prvega iz tega sistema so s kloniranjem identificirali tudi ligand za OPG - RANKL. Številne raziskave potrjujejo, da je RANKL protein, ki je odgovoren za diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov. Prisoten je v treh oblikah:

- transmembranski protein tipa II na osteoblastih, ki omogoča direktno medcelično komunikacijo z preosteoklasti
- primarni topni protein, ki je omejen na aktivirane limfocite T in rakave celice
- zunajcelični topni protein, ki nastane po cepitvi transmembranskega proteina in je

del pogojenega medija, ki zagotavlja diferenciacijo in preživetje osteoklastov
Gen TNFSF11 ki kodira RANKL je najbolj izražen v kostnem mozgu, limfatičnih tkivih, vključno s fetalnimi jetri, v limfnih vozlih, vranici in priželjcu. V manjši meri pa je izražen v srcu, pljučih, ščitnici in placenti (29,33).

STRUKTURA RANKL

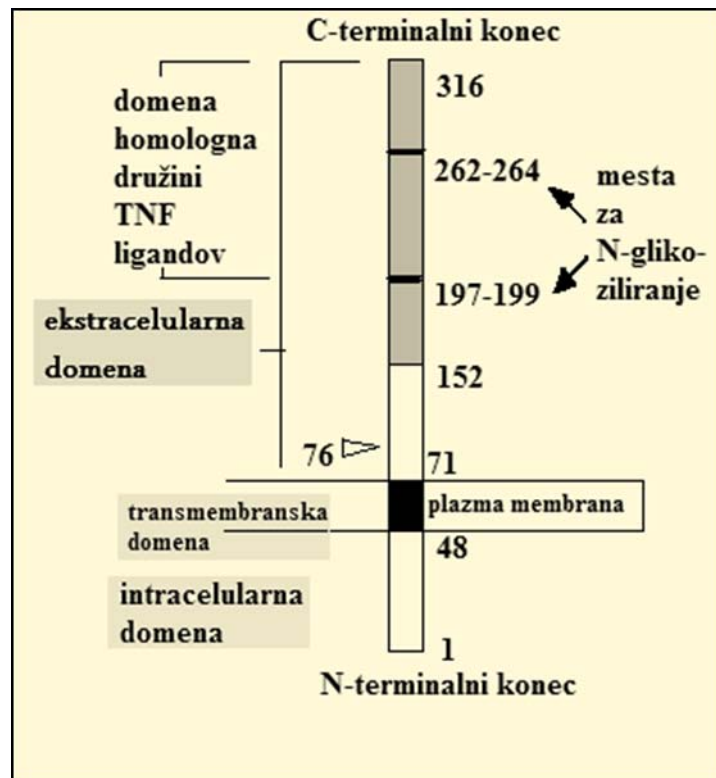
Človeški RANKL je protein sestavljen iz 317 aminokislin in je membranski protein tipa II, ki mu manjka signalni peptid. Kaže 83-87% homolognost s proteinom glodalcev, kar kaže na visoko konzervativnost gena pri evoluciji. Njegova **struktura je podobna ostalim članom naddružine dejavnikov tumorske nekroze:**

- 20-34% homologen z TRAIL
- 28% homologen z ligandom CD40
- 19% homologen s Fas ligandom.

sestava človeškega RANKL:

- **N-terminalna citoplazmatska domena (1-48 AK)**
- **transmembranska domena (49-69 AK)**

- **C-terminalna ekstracelularna domena** (70-317 AK), ki vsebuje **aktivno vezavno mesto** (158-317 AK) (slika 9)(34)



Slika 9: Shematski prikaz RANKL protein

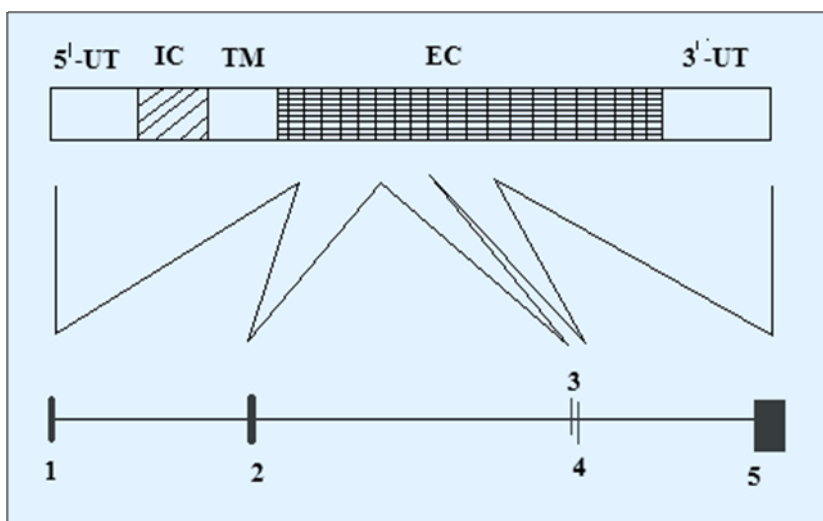
GEN TNFSF11

Gen je sestavljen iz kodirajočega dela, ki je zapis za sintezo mRNA in določenega proteina – **strukturni del**, ter iz **regulatorne regije** (operatorja, promotorja, daljnega regulatorja aktivacije...)

Gen TNFSF11 se pri človeku nahaja **na kromosomu 13 (13q14)** in obsega **36.35 kilobaz** človeškega genoma in šteje **5 eksonov** (slika 10):

- **1. ekson** kodira za neprevedeni del 5' konca (UT) in 47 AK intracelularne domene (IC), 23 AK transmembranske domene ter 5 (TM), AK ekstracelularne domene (EC)
- **2., 3. in 4. ekson** kodirajo naslednjih 54, 15 in 33 AK ekstracelularne domene (EC)

- **5. ekson** kodira za zadnjih 140 AK ekstracelularne domene (EC) in neprevedeni del 3' konca (UT) (34,35)



Slika 10: Shematski prikaz strukture komplementarne DNA in razmerja ekson/intron v genu TNFSF11

PROMOTOR TNFSF11 GENA

Regulacija izražanja gena se vrši na odseku promotorja gena. To je del, ki je v bližini gena, ki kodira zapis za protein (na 5' koncu kodirajočega gena). V promotorju gena se prične prepisovanje mRNA (**vezavno mesto za encim RNA polimerazo**). Poleg vezavnega mesta za polimerazo pa so tu odkrili še **številne elemente za vezavo** (na katere se vežejo molekule, ki zavrejo ali okrepijo izražanje gena):

- glukokortikoidnih receptorjev (GRE)
- ponavljajoča polovična zaporedja za vezavo vitamin D3 receptorjev (VDRE)
- osteoblastnega transkripcijskega faktorja cbfa-1
- ponavljajoča obrnjena zaporedja TATA in CAAT škatel
- drugih transkripcijskih faktorjev (CdxA, SRY, ADR1, AML1a,...)
- HSE (angl. Heat shock factor responsive elements)

Ugotovljeni polimorfizmi v promotorju

S primerjavo zaporedij dveh sekvenc promotorja TNFSF11 gena (GenBank, Accession Number AF54402 (36) in Accession Number AF333234 (37)) so odkrili prisotnost več polimorfizmov. Med temi sta tudi polimorfizma -643C>T in -693G>C (številčenje se nanaša na začetno mesto transkripcije), ki smo ju obravnavali v tem diplomskem delu (slika 11).

-715	tcttattggc	cctcagcata	aggatttctt	aagcagtgag	gcttaactct
-665	gacattagct	ctgctaacag	ctctttctctg	actgttccat	catccccacg

Slika 11: Zaporedje nukleotidov in označena polimorfizma -643C>T in -693G>C

1.5.INFEKCIJA S HIV IN TVEGANJE ZA OSTEOPOROZO

Pri pacientih s HIV infekcijo, tveganje za osteoporozo ni jasno. HIV prizadene številne tipe telesnih celic, kar vodi do spremembe imunoloških in metabolnih učinkov. Domnevni dejavniki tveganja naj bi bili uporaba proteaznih inhibitorjev, daljše trajanje HIV infekcije, visoka koncentracija virusa, visok nivo laktatov, nizek nivo bikarbonatov, povišan nivo alkalne fosfataze in zmanjšanje telesne teže. Mehanizem, ki sproži izgubo kostne mase pri pacientih okuženih s HIV ni znan. Pri HIV-pozitivnih posameznikih so odkrili, da je nastajanje pro-vnetnih citokinov faktorjev tumorske nekroze in interleukina-6 povečano, to pa ima lahko vpliv na aktivacijo osteoklastov in resorpcijo. Koncentracije serumskih markerjev kostne formacije so znižane, kostne resorpcije pa zvišane, pri pacientih z napredovalo boleznijo. Histomorfometrične analize so pokazale spremembe v procesu kostne remodelacije, pri pacientih okuženih s HIV, v primerjavi s kontrolami. Opisane so tudi hipokalcemija, hiperkalcemija in abnormalnosti v delovanju paratiroidnega hormona. Podatki in raziskave o pacientih okuženih z virusom HIV v povezavi z osteoporozo so zelo skromne. Problemu osteoporoze pri HIV bolnikih so se začeli bolj intenzivno posvečati šele, ko se je bolj močno izrazil zaradi zdravljenja z aktivno antiretrovirusno terapijo(38).

Citokini, ki nastanejo v telesu kot odgovor na virusno okužbo, imajo številne pomembne vloge v interakcijah med virusom in gostiteljem, v smislu regulacije razmnoževanja virusa in različne metabolne zaplete pri gostitelju.

Nekatera odkritja ki prikazujejo povezavo med HIV in RANKL:

- med produkcijo RANKL in razmnoževanjem virusa v T celicah in monocitih, obstaja pozitivna povratna zveza, ki je vzajemno pospešena s TNF- α in zavirata z IFN- γ

- membranski glikoprotein zunanje ovojnice virusa HIV gp120 lahko vzpodbudi nastajanje RANKL v T celicah in s tem posredno osteoklastogenezo in resorpcijo (38,39)

2. NAMEN DELA

RANKL, kot eden izmed regulatornih dejavnikov v procesu kostne remodelacije pospešuje proces razgradnje oziroma resorpcije kosti, kar vodi do zmanjšanja kostne mase in do osteoporoze. Dokazali so, da je sinteza RANKL v limfocitih T pri bolnikih okuženih z virusom HIV povišana.

Na izražanje gena vplivajo številni transkripcijski dejavniki, z vezavnimi mesti na promotorju gena. Ti dejavniki so iniciatorji transkripcije mRNA, saj olajšajo vezavo encima RNA polimeraze in na ta način vplivajo na količino sintetiziranega proteina. Spremembe v tem delu gena – promotorju, bi lahko pomenile spremembo v vezavi transkripcijskih dejavnikov in posledično vplivale na količino sintetiziranega RANKL.

Naš namen bo ugotoviti pogostost dveh polimorfizmov v promotorju gena TNFSF11 in njuno povezanost s serumskimi koncentracijami RANKL, OPG in z razmerjem med njima, pri HIV bolnikih. Ocenili naj bi vpliv teh dveh polimorfizmov na razvoj osteoporoze pri bolnikih okuženih s HIV.

S tem namenom bomo:

- v raziskavo vključili 114 preiskovancev – HIV bolnikov, ki jim je bila odvzeta kri in opravljene meritve serumskih koncentracij RANKL in OPG
- predhodno izolirano DNA pomnožili s PCR reakcijo in sicer 552 bp dolg odsek promotorja TNFSF11 gena
- s pomočjo analize RFLP preverjali prisotnost dveh polimorfizmov znotraj 2. odseka promotorja TNFSF11 gena
- določili genotipe preiskovancev
- s statistično obdelavo podatkov ugotavljali ali so razlike med koncentracijami posameznega proteina (RANKL, OPG in njuno razmerje) značilne med posameznimi genotipskimi skupinami in haplotipi (pari genotipov združeni iz obeh polimorfizmov).

3. METODE IN MATERIALI

3.1. SPLOŠNA OPOZORILA

Pri delu v laboratoriju smo se ravnali po predpisanih postopkih in upoštevali varnostne ukrepe.

Obvezno smo uporabljali rokavice iz lateksa, zaradi kužnosti vzorcev in možnosti kontaminacije reagentov in vzorčnih DNA s tujimi.

Pred pričetkom dela smo ves plastični pribor za enkratno uporabo avtoklavirali (škatle s pipetnimi nastavki, epruvete) 20 min pri 121°C in tlaku 0,1MPa. Prav tako smo avtoklavirali ultra čisto vodo uporabljeno v nadaljnjih reakcijah.

Pred pričetkom priprave raztopin za reakcijo pomnoževanja s polimerazo (PCR) smo ves delovni pribor in površine v komori očistili s hipokloritom in za 30 minut prižgali UV svetilko.

Pred pričetkom dela v PCR komori smo vedno oblekli čista zaščitna oblačila, namenjena le za delo v tem prostoru, in vedno uporabili čiste rokavice.

3.2. PREISKOVANCI

V raziskavo je bilo vključenih 114 bolnikov okuženih z virusom HIV, ki se zdravijo na Infekcijski kliniki v Ljubljani in so jim na rednem pregledu odvzeli kri za biokemične in genetske preiskave. Klinični del raziskave je potekal pod vodstvom doc. dr. J. Tomažiča.

Raziskavo je odobrila komisija RS za medicinsko etiko.

3.3. IZOLACIJA DNA in PRIPRAVA DELOVNE RAZTOPINE DNA

Za naše analize je bila DNA že predhodno izolirana v laboratoriju za molekularno diagnostiko na Katedri za klinično biokemijo. Prav tako so tam potekali vsi nadaljnji postopki v zvezi z izolirano DNA. Izolacija DNA je potekala z **FlexiGene DNA kit**-om iz 3 mL EDTA venske krvi. Predhodno so bili opravljeni tudi postopki **preverjanja velikosti**

izolirane DNA (z elektroforezo na agaroznem gelu), **preverjanja čistosti izolirane DNA** (z merjenjem absorbanc, v razredčinah matične DNA, pri dveh valovnih dolžinah: 260 in 280nm in izračunom razmerja $A_{260/280}$). Prav tako je bila pripravljena **delovna raztopina DNA** (redčenje matične DNA z ultra čisto avtoklavirano vodo v razmerju 1:10).

Vsi opisi postopkov, opreme, materialov, reagentov, opis metode in navodila za delo se nahajajo v laboratoriju Katedre za klinično biokemijo.

HRANJENJE DNA

- ! matično DNA hranimo v zamrzovalniku pri -20°C
- ! delovno raztopino DNA hranimo v hladilniku na $+4^{\circ}\text{C}$.

3.4.MERJENJE SERUMSKIH KONCENTRACIJ RANKL IN OPG

Merjenje serumskih koncentracij topnega RANKL (sRANKL) in OPG je bilo opravljeno naknadno, po koncu naših analiz, v laboratorijih Katedre za klinično biokemijo. Meritve koncentracij obeh parametrov so bile opravljene s kvantitativnima encimsko imunskima testoma, specifičnima za človeški sRANKL in OPG. Uporabljeni metodi sta v obeh primerih sendvič ELISA - Free sRANKL ELISA (Biomedica, katal.št.:BI-20422H) in OPG ELISA (Biomedica, katal.št.:BI-20402). Vse meritve so potekale na mikrotitrskem čitalcu SunriseTM (Tecan).

➤ OPIS POSTOPKA ZA PROSTI sRANKL ELISA TEST

V vdolbinicah mikrotitrskega traku je vezan humani rekombinantni OPG. Na mikrotitrski trak v vsako posamezno vdolbinico nanese preiskovane vzorce, standard in kontrolni vzorec. Dodamo enako količino biotiniziranih anti-sRANKL protiteles, narahlo prmešamo, pokrijemo in inkubiramo čez noč pri $2-8^{\circ}\text{C}$. Med inkubacijo se na OPG (vezan na mikrotitrskem traku) veže prosti sRANKL (iz vzorca, kontrole, standarda), nanj pa biotinizirana anti-sRANKL protitelesa. Odsesamo inkubacijsko mešanico in 5x izperemo vdolbinice z razredčenim izpiralnim pufrom in odstranimo ostanke pufr. Dodamo konjugat (streptavidin-hrenova peroksidaza) pokrijemo in inkubiramo 1uro pri sobni temperaturi. Med inkubacijo se streptavidin veže z biotinom. Po inkubaciji odstranimo nevezane sestavine in speremo vdolbinice 5x z razredčenim izpiralnim pufrom.

Odstranimo ves pufer iz vdolbinic. Dodamo substrat (kromogen TMB) in inkubiramo 30 min pri sobni temperaturi, v temi. Med inkubacijo vezana peroksidaza katalizira encimsko reakcijo, pri čemer se kromogen TMB oksidira, spremeni barvo. Po inkubaciji dodamo v vsako vdolbinico STOP raztopino (kislina), ki ustavi reakcijo med substratom in encimom in takoj izmerimo absorbanco pri 450 nm. Vzporedno v eni vdolbinici pripravimo slepi vzorec, v katerega damo le substrat in stop raztopino (predhodne faze postopka izpuščene).

➤ OPIS POSTOPKA ZA OPG ELISA TEST

V vdolbinicah mikrotitrskega traku so vezana monoklonska anti-OPG protitelesa. Na mikrotitrski trak v vsako posamezno vdolbinico nanese pufer, nato preiskovane vzorce, standard in kontrolni vzorec. Dodamo enako količino biotiniziranih anti-OPG protiteles, narahlo prmešamo, pokrijemo in inkubiramo čez noč pri 4°C. Med inkubacijo se na anti-OPG protitelesa (vezana na mikrotitrskem traku) veže OPG (iz vzorca, kontrole, standarda) nanj pa biotinizirana anti-OPG protitelesa. Odsesamo inkubacijsko mešanico in 5x izperemo vdolbinice z razredčenim izpiralnim pufrom in odstranimo ostanke pufra iz vdolbinic. Dodamo konjugat (streptavidin-hrenova peroksidaza) pokrijemo in inkubiramo 1 uro pri sobni temperaturi. Med inkubacijo se streptavidin veže z biotinom. Po inkubaciji odstranimo nevezane sestavine in speremo vdolbinice 5x z razredčenim izpiralnim pufrom. Odstranimo ves pufer iz vdolbinic. Dodamo substrat (kromogen TMB) in inkubiramo 20 min pri sobni temperaturi, v temi. Med inkubacijo vezana peroksidaza katalizira encimsko reakcijo, pri čemer se kromogen TMB oksidira, spremeni barvo. Po inkubaciji dodamo v vsako vdolbinico STOP raztopino (kislina), ki ustavi reakcijo med substratom in encimom in takoj izmerimo absorbanco pri 450 nm. Vzporedno v eni vdolbinici pripravimo slepi vzorec, v katerega damo le substrat in stop raztopino (predhodnje faze postopka izpuščene).

Vsi natančni opisi postopkov, opreme, materialov, reagentov, opis metode in navodila za delo se nahajajo v laboratoriju Katedre za klinično biokemijo.

3.5. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO - POMNOŽEVANJE 2. ODSEKA PROMOTORJA TNFSF11 GENA

PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) je visoko specifična in selektivna in vitro metoda s katero pomnožujemo željeni odsek DNA, pri čemer dobimo veliko število kopij. PCR poteka ciklično (35-45 ciklov), vsak cikel pa je sestavljen iz **treh stopenj**:

- 1.stopnja → **denaturacija** (90-95°C), kjer se pod vplivom toplote dvovijačna DNA razcepi v 2 enovijačni DNA verigi
- 2.stopnja → **prileganje oligonukleotidnih začetnikov** (55-65°C), kjer imamo 2 različna začetnika F (ang.forward) in R (ang.reverse), ki se specifično prilegata začetnemu in končnemu delu odseka DNA, ki ga želimo pomnožiti
- 3.stopnja → **podaljševanje začetnikov** (72°C), kjer poteka sinteza – izgrajevanje komplementarne verige DNA s pomočjo encima Taq polimeraze, ki izgrajuje verigo v smeri 5' proti 3'

Tako po **n številu ciklov** dobimo **2ⁿ** željenih DNA odsekov.

Pred začetkom cikličnega pomnoževanja je še stopnja **začetne denaturacije** (95°C), ki je potrebna za aktivacijo encima in hkrati omogoči popolno denaturacijo. Na koncu pa je dodana še stopnja **zaključnega podaljševanja**, ki omogoča, da se pomnožene kopije DNA odsekov v celoti zgradijo. Na koncu reakcijo prekinemo z ohlajanjem na 4°C (40,41) .

Na 2. odseku promotrorja TNFSF11 gena za RANKL se nahajata pričakovana **polimorfizma -693 G>C** in **-643 C>T**, ki sta ciljna za našo nadaljnjo RFLP analizo. Pomnoževali smo odsek DNA dolg **552 bp** (od -888. do -337. mesta glede na začetno mesto transkripcije). Reakcijo smo izvajali v cikličnem termostatu - pomnoževalniku, ki omogoča natančno spreminjanje temperature v točno določenih časovnih intervalih.

PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI

Za vsako serijo vzorcev in slepi vzorec smo v delovni komori pripravili reakcijsko zmes (master mix), ki je vsebovala vse komponente razen vzorčnih DNA (preglednica V):

- F in R oligonukleotidna začetnika - omejujeta odsek, ki ga želimo pomnožiti

- zmes 4 deoksinukleozid trifosfatov v enakem razmerju (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) – gradniki novo nastajajočih DNA odsekov
- Mg^{2+} ioni – kofaktor encima
- pufer za vzdrževanje potrebnega pH
- termostabilno endonukleazo – Taq polimerazo
- ultra čisto vodo (avtoklavirano)

Preglednica V: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje TNFSF11-PR2

REAGENTI	V(μl) za 1 vzorec
10xPCR pufer II	3,00
raztopina dNTP (2mM)	3,00
raztopina $MgCl_2$ (25mM)	3,60
raztopina RANKL-PR2-F (5mM)	1,00
raztopina RANKL-PR2-R (5mM)	2,50
Taq polimeraza (5U/μL)	0,15
ultra čista voda	15,75
vzorčna DNA / H_2O	1,00
celoten V reakcijske zmesi	30,00

Po vsakem dodatku smo zmes temeljito premešali. V označene epruvete smo odpipetirali 29,00μL reakcijske zmesi in ji dodali 1,00μL vzorčne DNA oz. ultra čiste H_2O (za slepi vzorec). Slep vzorec nam je služil kot negativna kontrola morebitne kontaminacije reagentov z DNA.

POTEK REAKCIJE

Pripravljene vzorce smo dobro zaprli, jih kratko centrifugirali (30s v mikrocentrifugi na 1000 obrat./min) in jih dali v ciklični pomnoževalnik (Biometra). Predhodno nastavljen program (št.26) omogoča določene temperaturne spremembe v točnih časovnih intervalih in željeno št. ponavljajočih se ciklov (preglednica VI).

Preglednica VI: Pogoji za potek reakcije pomnoževanja TNFSF11-PR2; Biometra, prog.št.26

Stopnje reakcije PCR	temperatura (°C)	čas	št.ciklov
začetna denaturacija	95	10 min	1
denaturacija	95	20 s	37
prileganje	60	20 s	
podaljševanje	72	30 s	
končno podaljševanje	72	7 min	1
inkubacija	4	24 h	0-1

Po končani reakciji smo PCR produkte kratko centrifugirali in jih shranili v hladilniku na +4°C.

POSEBNA OPOZORILA

- ! pred začetkom dela očistimo delovne površine, komoro in ves pribor v njej z 3% Na hipokloritom ter za 30min prižgemo UV luč
- ! reagente shranjene na -20°C odtajamo tik pred začetkom dela in jih dobro premešamo (posebno pufer in MgCl₂)
- ! Taq polimerazo vzamemo iz zamrzovalnika tik pred dodajanjem v zmes in jo takoj po uporabi vrnemo nazaj
- ! vzorci delovnih raztopin DNA so shranjeni v hladilniku in jih pred uporabo kratko centrifugiramo
- ! uporabljamo sveže rokavice in čisto haljo

MATERIALI IN OPREMA

Reagenti in kemikalije

- ultra čista voda (aparati ELGA, Purelab Classic), avtoklavirana
- AmpliTaqGold™PCR kit (Applied Biosystems, Roche Molecular System, Inc., Branchburg; New Jersey, ZDA)
 - AmpliTaqGold™ - polimeraza (5U/L)
 - GeneAmp™10×PCR Buffer II
 - MgCl₂ 25mM
- delovna raztopina DNA (matični izolat redčen 1:10)

- 2mM raztopina dNTP - pripravljena iz 4 osnovnih 100mM raztopin dATP, dGTP, dCTP, dTTP (GeneAmp dNTPs, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey; ZDA)(10μL osnovne raztopine posameznega dNTP-ja (40μL) + 460μL ultračiste avtoklavirane vode → alikvotiramo po 100μL in zamrznemo na -20°C)
- raztopina oligonukleotidnih začetnikov, 5mM (QIAGEN Operon GmbH, Hilden, Nemčija)
 - RANKL-PR2-F, 200mM → redčimo 1:40; $T_m=60,4^{\circ}\text{C}$; nukleotidno zaporedje: 5'-TGGTCAGCAACTTCCTTCTG-3'
 - RANKL-PR2-R, 200mM → redčimo 1:40; $T_m=60,4^{\circ}\text{C}$; nukleotidno zaporedje: 5'-GACATTCCTCCTGCATCCAT-3'

Aparature in pribor

- ciklični pomnoževalnik Personal Cycler (Biometra, Goettingen, Nemčija)
- mikrocentrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki)
- polavtomatske pipete Eppendorf
- nastavki za pipete (Sarstedt), avtoklavirani
- 0,5mL plastične epruvete (Sarstedt), avtoklavirane
- delovna komora z UV lučjo (Krom, Ljubljana)
- avtoklav A-21 (Kambič, Laboratorijska oprema)
- vibracijski stresalnik

PREVERJANJE USPEŠNOSTI PCR REAKCIJE

Uspešnost PCR smo preverjali z EF na 2% agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. Preverjali smo specifičnost (dolžino) in koncentracijo (količino) nastalih produktov. DNA imajo negativen naboj, zato se v električnem polju gibljejo proti pozitivni anodi. Hitrost potovanja skozi pore gela je odvisna od velikosti molekul in je glede nanjo obratno sorazmerna.

Priprava 2% agaroznega gela z EtBr

V erlenmajerico smo zatehtali 1,5g agaroze, dodali 75mL 1×TAE pufra, pokrili z urnim steklom in med večkratnim mešanjem segrevali v mikrovalovni pečici do vrelišča, dokler nismo dobili bistre zmesi. Po nekaj minutnem ohlajanju smo v digestoriju dodali 4μL EtBr, dobro premešali in zmes vlili v pripravljen nosilec za vlivanje gelov. Pred vlivanjem smo vstavili 2 glavnička z oznako 30, ki omogočata tvorbo 60 žepkov za nanos vzorcev.

Odstranili smo morebiti nastale zračne mehurčke, zaščitili pred svetlobo (pokrili) in pustili približno 30min, da se je gel strdil. Nato smo odstranili glavnička. Gel smo zaščiten pred svetlobo in izsušitvijo hranili v hladilniku.

Pred EF smo potopili gel v EF kadičko (vodoravno) napolnjeno z 1×TAE pufrom in ga tako pripravili za nanos vzorcev.

POSEBNA OPOZORILA

- ! EtBr je močno mutagen – obvezna uporaba nepropustnih rokavic in delo v digestoriju
- ! EtBr na svetlobi razpada, zato ga moramo pred njo zaščititi – hramba v temnem prostoru

MATERIALI IN OPREMA

Reagenti

- agaroz za PCR (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- 1×TAE pufer → pripravljen z redčenjem 1:50 iz osnovne raztopine 50×TAE pufera (242,0g tris baze + 57,1g očetne kisline + bidestilirana voda do volumna 1000mL)
- EtBr; 10mg/mL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- bidestilirana voda

Aparature in pribor

- tehnica Exacta 300EB (Tehnica, Železniki)
- erlenmajerica 200mL
- urno steklo
- mikrovalovna pečica (Moulinex)
- polavtomatske pipete Eppendorf in pripadajoči nastavki
- nosilec za vlivanje gela 10×15×1,5mm
- glavnički za tvorbo žepkov v gelu z oznako 30

EF in detekcija produktov

PCR produktu (3μL) smo dodali kapljico (2μL) nanašalnega pufera ksilencianola, katerega vloga je, da poveča gostoto vzorca (glicerol) in olajša nanos v žepke gela. Barvilo potuje pri EF z določeno hitrostjo, kar nam omogoča spremljanje potovanja.

Vzorci smo nanašali v žepke gela nameščenega v EF kadički z 1×TAE pufrom. Za kontrolo dolžin dobljenih DNA fragmentov smo uporabili označevalec s točno določenimi dolžinami DNA odsekov, kot slepi vzorec pa zmes barvila in ultra čiste vode.

EF je potekala 30min pri konstantni napetosti 100V. Med EF smo kadičko pokrili in jo tako zaščitili pred svetlobo.

Po končani ločbi smo gel prenesli v komoro za fotografiranje gelov, prižgali UV luč ($\lambda=302\text{nm}$) in s pomočjo dokumentacijskega sistema UVI Photo posneli sliko. Na podlagi položaja lis smo ocenili dolžino PCR produkta, iz intenzitete lis pa smo ocenili njegovo količino.

POSEBNA OPOZORILA

- ! EtBr je močno mutagen – obvezna uporaba nepropustnih rokavic
- ! čas obsevanja gelov z EtBr z UV svetlobo pomembno vpliva na intenziteto lis ločenih odsekov DNA po EF
- ! po slikanju vse gele, ki vsebujejo EtBr za nekaj dni izpostavimo dnevni svetlobi in šele nato zavržemo

MATERIALI IN OPREMA

Reagenti in kemikalije

- nanašalni pufer ksilencianol (pripravljen iz 0,025g ksilencianola + 3mL glicerola + 7mL ultra čiste vode)
- 1×TAE pufer (redčen 1:50 iz osnovne 50×TAE raztopine)
- Označevalec dolžin odsekov DNA – vsebuje enake mase 6 odsekov DNA z dolžinami 50, 150, 300, 500, 750 in 1000bp (PCR Markers G316A, Promega Corp., Madison, WI, ZDA)

Aparature in pribor

- mala kadička za EF (Wide mini sub cell GT, BioRad)
- vir napetosti TITAN Plus (Helena Laboratories Corp., Beaumont, TX, ZDA)
- polavtomatske pipete Eppendorf
- nastavki za pipete (Sarstedt), avtoklavirani
- parafilm
- komora z UV svetilko ($\lambda=302\text{nm}$) in digitalnim fotoaparatom
- dokumentacijski sistem za slikanje gelov UVI TEC in program UVI Photo

3.6. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV

Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, ang. Restriction Fragment Length Polymorphism) nam služi za potrjevanje znanih mutacij v zaporedju DNA in poteka s pomočjo encimov restrikcijskih endonukleaz. Ti encimi prepoznajo 4-8 nukleotidov dolgo zaporedje in ga cepijo. Daljše kot je zaporedje, ki ga encim prepozna bolj je specifičen. To metodo uporabljamo za detekcijo tistih mutacij, ki uvedejo ali odstranijo vezavno mesto za restrikcijsko endonukleazo oziroma uvedejo ali odstranijo restrikcijsko mesto. Na podlagi cepitve dobimo različno število, različno dolgih DNA fragmentov. Tako dobimo pri heterozigotu z restrikcijskim mestom le na enem alelu 3 različno dolge fragmente (daljšega - nerazcepljenega in dva krajša različno dolga-produkta cepitve)(42).

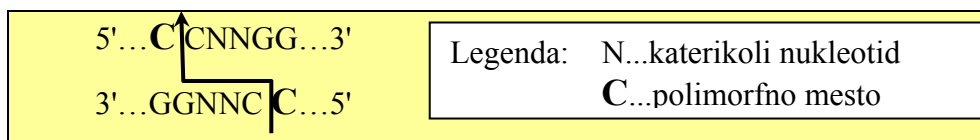
Fragmente ločimo z EF in glede na položaj in število lis določimo genotip preiskovanca.

V nadaljevanju smo izvedli 2 RFLP analizi z BsaJI endonukleazo in TrspI endonukleazo. V obeh primerih nam mutacija uvede restrikcijsko mesto za encim.

I. BsaJI – RFLP ANALIZA

Uporabljena endonukleaza BsaJI prepozna na -693. mestu v promotorju gena TNFSF11 restrikcijsko mesto, če je tam prisoten nukleotid C namesto G – kar pomeni, da mutacija na -693 G>C uvede restrikcijsko mesto.

BsaJI cepi naslednje nukleotidno zaporedje:



Če mutacija ni prisotna in endonukleaza ne prepozna restrikcijskega mesta dobimo samo 1 fragment dolžine 552 bp – homozigot brez restrikcijskega mesta na obeh alelih – genotip GG. V primeru mutacije na eni verigi dobimo 3 framente dolžine 552, 356 in 196 bp – heterozigot z restrikcijskim mestom na enem alelu – genotip GC. Kadar pride do mutacije

na obeh verigah dobimo 2 fragmenta dolžine 356 inb 196 bp – homozigot z restrikcijskim mestom na obeh alelih - genotip CC.

PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI

Za posamezno serijo vzorcev in pozitivno kontrolo (K+) smo pripravili skupno reakcijsko zmes, ki je vsebovala vse sestavine razen PCR produkta (preglednica VII). Po vsakem dodatku smo zmes dobro premešali. Zmes smo razpipetirali v označene epruvete (12 μ L) in ji dodali vzorec - PCR produkt (3 μ L). Kot K+ smo dali v restrikcijo že genotipizirane vzorce in sicer take s popolno restrikcijo – genotip CC.

Preglednica VII: Sestava reakcijske zmesi za RFLP z BsaJI

reagenti	V reagenta (μL) za 1 vzorec
pufer NEB2	1,5
H ₂ O	10,1
BsaJI (2,500 U/mL)	0,4
PCR produkt / K+	3,0
celoten V reakcijske zmesi	15,0

POGOJI RESTRIKCIJE

Po končanem pipetiranju smo epruvete s celotno zmesjo dobro zaprli, kratko centrifugirali, jih namestili na plavajoč nosilec in inkubirali v vodni kopeli pri 60°C čez noč. Pri tej temperaturi ima encim BsaJI optimalno aktivnost. Naslednji dan smo vzorce pobrali iz kopeli in jih centrifugirali, da se je vsebina zbrala na dnu.

POSEBNA OPOZORILA

- ! vse reagente hranimo v zamrzovalniku pri -20°C in jih odtajamo tik pred delom
- ! endonukleaza naj bo na sobni temperaturi čimkrajši čas

MATERIALI IN OPREMA

Reagenti in kemikalije

- bidestilirana voda, avtoklavirana
- pufer NEB2 (pH=7,9 pri T=25°C; New England Biolabs Inc., Beverly, MA, ZDA)

- restrikcijska endonukleaza BsaJI (2,5U/μL; New England Biolabs Inc., Beverly, MA, ZDA)

Aparature in pribor

- centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki)
- polavtomatske pipete Eppendorf
- nastavki za pipete (Sarstedt), avtoklavirani
- 1,5 mL epruvete (Sarstedt), avtoklavirane
- termostatisirana vodna kopel MEMMERT, T=60°C
- plavajoči nosilec

ELEKTROFORETSKA LOČBA PRODUKTOV RESTRIKCIJE NA AGAROSNEM GELU

Po končani restrikciji smo izvedli EF produktov restrikcije na 2% agaroznem gelu.

Priprava 2% agaroznega gela za EF

Postopek za pripravo 2% agaroznega gela je enak kot pri gelu za EF PCR produktov (str.30) s 3 razlikami:

- uporabili smo agarozo za RFLP
- nismo dodali EtBr
- uporabili smo glavnička z oznako 20

MATERIALI IN OPREMA

Glej poglavje materiali in oprema pri pripravi 2% gela za detekcijo PCR produktov (str.31).

Postopek EF

Gel smo namestili vodoravno v EF kadičko napolnjeno z 1×TAE pufrom. V vsako epruveto smo dodali 2,5μL nanašalnega pufra bomfenol modro, dobro premešali in celotni volumen nanесли v žepke gela. Kot negativna kontrola (K-) nam je služil PCR produkt, katerega 3μL smo zmešali s kapljico barvila in nanесли v žepek. Kot K+ nam je služil že genotipiziran vzorec, pri katerem smo pričakovali popolno restrikcijo.

EF je potekala 45min pri konstantni napetosti 90V.

MATERIALI IN OPREMA

Glej poglavje Materiali in oprema pri EF in detekciji PCR produktov (str.32)

Razlika je le v tem, da v gel nismo dodali EtBr in smo namesto ksilencianola uporabili bromfenol modro.

- nanašalni pufer bromfenol modro (pripravljen iz 0,025g bromfenol mod. + 3mL glicerola + 7mL destilirane vode)(Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švica)

BARVANJE GELA IN ODČITAVANJE REZULTATOV

Barvanje gela je potekalo v digestoriju. Po končani EF smo gel prenesli v plastično kadičko z 200mL delovne raztopine Sybr[®]Green I barvila za barvanje gelov. Kadičko smo pokrili s pokrovom, jo z aluminijasto folijo zaščitili pred svetlobo in na horizontalnem stresalniku stresali 45min.

Po barvanju smo gel prenesli v komoro, prižgali UV svetilko in posneli sliko. Na podlagi slike smo genotipizirali vzorce.

POSEBNA OPOZORILA

- ! Sybr[®]Green I barvilo je izredno kancerogeno – obvezna raba nepropustnih rokavic in delo v digestoriju
- ! Sybr[®]Green I barvilo je izredno občutljivo na UV svetlobo zato ga med shranjevanjem in delom z njim zaščitimo pred svetlobo
- ! Čas obsevanja gelov barvanih s Sybr[®]Green I pomembno vpliva na intenziteto lis ločenih odsekov DNA po EF

MATERIALI IN OPREMA

Reagenti

- Sybr[®]Green I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Nemčija)
- 1×TAE pufer (pH8)
- delovna raztopina Sybr[®]Green I → pripravljena iz osnovne raztopine z redčenjem 1:10 000 (20μL Sybr[®]Green I + 200mL 1×TAE pufera)

Aparature in pribor

- plastična kadička
- aluminijasta folija
- stresalnik Vibromix 314 EVT (TEHTNICA, Železniki)

- komora z UV svetilko ($\lambda=302\text{nm}$) in digitalnim fotoaparatom
- dokumentacijski sistem za slikanje gelov UVI TEC in program UVI Photo

II. TspRI – RFLP ANALIZA

V tej reakciji uporabljena endonukleaza TspRI prepozna na -643. mestu v promotorju TNFSF11 gena restrikcijsko mesto, če je tam prisoten nukleotid T namesto C – kar pomeni, da mutacija na -643. mestu uvede restrikcijsko mesto.

TspRI cepi naslednje zaporedje:

5'... NNCASTGNN...3 3'... NNGTSACNN...5'	Legenda: N...katerikoli nukleotid T...polimorfno mesto S...nukleotid C ali G
---	--

Če mutacija ni prisotna in endonukleaza ne prepozna restrikcijskega mesta dobimo samo 1 fragment dolžine 552 bp – homozigot brez restrikcijskega mesta na obeh alelih – genotip CC. V primeru mutacije na eni verigi dobimo 3 framente dolžine 552, 305 in 247 bp – heterozigot z restrikcijskim mestom na enem alelu – genotip CT. Kadar pride do mutacije na obeh verigah dobimo 2 fragmenta dolžine 305 in 247 bp – homozigot z restrikcijskim mestom na obeh alelih - genotip TT.

PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI

Za vsako serijo vzorcev in K^+ smo pripravili skupno reakcijsko zmes, ki je vsebovala vse sestavine razen PCR produkta. Zmes smo dobro premešali, odpipetirali v označene epruvete $13\mu\text{L}$ zmesi in v vsako epruveto dodali $2\mu\text{L}$ PCR produkta. Za K^+ smo dali v restrikcijo že genotipizirane vzorce (genotip TT, 2 fragmenta, popolna restrikcija).

Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za RFLP z TspRI

reagenti	V reagenta (μL) za 1 vzorec
pufer NEB4	1,5
H ₂ O	11,15
TspRI (10 U/ μL)	0,35
PCR produkt / K^+	2,0
celoten V reakcijske zmesi	15,0

POGOJI RESTRIKCIJE

Epruvete s končno zmesjo smo kratko centrifugirali, dobro zaprte zložili na plavajoči nosilec v vodno kopel in jih inkubirali 3 ure pri 65°C. Pri tej temperaturi ima encim TspRI optimalno aktivnost. Po končani inkubaciji smo epruvete centrifugirali, da se je vsebina zbrala na dnu in v vsako dodali 1,65µL raztopine Na lavrisulfata (anionski detergent, ki prekine encim-DNA kompleks in prepreči nadaljnjo cepitev).

POSEBNA OPOZORILA

! encim naj bo na sobni temperaturi čim krajši čas

! ostale reagente odtalimo tik pred uporabo

MATERIALI IN METODE

Reagenti

- bidestilirana voda
- pufer NEB4 (pH=9,7 pri T=25° ; New England Biolabs Inc., Beverly, MA, ZDA)
- restrikcijska endonukleaza TspRI (10,02U/µL; New England Biolabs Inc., Beverly, MA, ZDA)
- 2% raztopina Na lavrisulfata (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, ZDA)

Aparature in pribor

- centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki)
- polavtomatske pipete Eppendorf
- nastavki za pipete (Sarstedt) , avtoklavirani
- 1,5 mL epruvete (Sarstedt) , avtoklavirane
- termostatisirana vodna kopel MEMMERT, T=60°C
- plavajoči nosilec

ELEKTROFORETSKA LOČBA PRODUKTOV RESTRIKCIJE NA POLIAKRILAMIDNEM GELU

Po končani restrikciji smo izvedli ločbo fragmentov z EF na 10% poliakrilamidnem gelu (PAGE), ki je v primerjavi z agaroznim bolj primeren za ločevanje fragmentov z majhno razliko v dolžini.

Priprava 10% poliakrilamidnega gela

Najprej smo distančnika, 2 stekleni plošči, 2× očistili z etanolom in nato notranji strani steklenih plošč še 2× razmastili z acetonom. Za tem smo sestavili model za vlivanje gela tako, da smo med stekleni plošči na vsako stran vstavili distančnik (določa debelino gela), vse skupaj vpeli v prižemo in vstavili v stojalo z gumijasto tesnilno podlago.

V plastično epruveto smo zmešali 1mL 5×TBE pufra, 6,6mL raztopine akrilamida, dopolnili z bidestilirano vodo do skupnega volumna 10mL in dobro premešali. Tik pred vlivanjem gela smo dodali 85μL 10% raztopine APS (amonijev peroksidisulfat) in 4,5μL TEMED-a (N,N,N',N'-tetrametilendiamin), ki omogočata polimerizacijo gela. Vse skupaj smo dobro premešali in takoj s pomočjo pipete vlili med stekleni plošči. Na zgornji rob smo vstavili glavniček (za 15 žepkov) in pri tem pazili, da smo izpodrinili ves zrak in ni prišlo do nastanka mehurčkov.

Po približno 1uri, ko je gel polimeriziral in se strdil, smo odstranili glavniček iz gela.

Žepke smo pred uporabo z injekcijo 3× dobro sprali z 0,5×TBE pufrom.

POSEBNA OPOZORILA

- ! akrilamid in N,N'-metilenbisakrilamid sta nevrotoksična – pri tehtanju se zaščitimo z masko (vdihavanje) in rokavicami (absorpcija skozi kožo)
- ! raztopino akrilamida hranimo v hladilniku zaščiteno pred svetlobo
- ! raztopino APS odmrzujemo neposredno pred uporabo
- ! distančnikov nikoli ne čistimo z acetonom, ker so teflonski in jih aceton poškoduje
- ! pazimo, da na prižemi vijakov preveč ne zatisnemo, saj lahko stekleni plošči med EF počita
- ! žepke gela moramo dobro sprati, da odstranimo nepolimeriziran akrilamid in omogočimo čiste lise
- ! pri spiranju pazimo, da z injekcijsko iglo ne predremo žepkov

MATERIALI IN OPREMA

Reagenti in kemikalije

- 40% m/V akrilamid – AA (FLUKA Chemie GmbH, Buchs, Švica)
- N,N'-metilenbisakrilamid – bAA (FLUKA Chemie GmbH, Buchs, Švica)

- raztopina akrilamida z masnim razmerjem AA:bAA=29:1(1g bAA + 72,5mL 40% raztopine AA + destilirana voda do končnega V 100mL)
- destilirana voda, bidestilirana voda
- Tris baza (1M) (FLUKA)
- Borna kislina (0,83M)
- 0,01M Na₂EDTA
- 5×TBE pufer (tris-borat-EDTA) - osnovna raztopina (60,0g tris baze + 25,65g borne kisline + 1,86g Na₂-EDTA + bidestilirana voda do 1000mL; pH~8,3;avtoklaviramo)
- APS (Fluka)
- 10% raztopina APS (1,0g APS + 10mL bidestilirane vode; alikvotiramo po100μL in zamrznemo)
- TEMED (Sigma)

Aparature in pribor

- model za vlivanje poliakrilamidnega gela (10×7×0,15cm): 2 stekleni plošči, 2 distančnika, prižema, stojalo z gumijasto podložko
- 50mL plastična epruveta s pokrovom
- polavtomatske pipete Eppendorf
- nastavki za pipete (Sarstedt)
- glavniček za tvorbo žepkov z oznako 15
- injekcijska brizga z iglo za spiranje žepkov

Postopek PAGE

Model z 10% poliakrilamidnim gelom smo pokončno vstavili v EF kadičko in jo napolnili s toliko 0,5×TBE pufra, da sta bili vanj potopljeni obe elektrodi.

Pred nanosom vzorcev smo izvedli 5min predelektroforezo – vzpostavitev ravnotežja ionov.

Vzorci smo po inkubaciji centrifugirali in jim dodali 2μL nanašalnega pufra ksilencianola, ki omogoča vsedanje vzorcev v žepke in je indikator potovanja po gelu. Celotne volumne smo nanesti v žepke. Kot K⁺ so nam služili že genotipizirani vzorci z genotipom TT - popolna restrikcija, kot K⁻ pa smo uporabili nerestringiran PCR produkt.

Elektroforeza je potekala 60min pri konstantni napetosti 200V.

MATERIALI IN OPREMA

Reagenti in kemikalije

- 0,5×TBE pufer (iz osnovne raztopine 50×TBE z redčenjem 1:10)
- nanašalni pufer ksilencianol

Aparature in pribor

- elektroforezna kadička MINI PROTEAN IITM (BioRad Laboratories, Hercules, CA, ZDA)
- vir napetosti PowerPac Basic (BioRad Laboratories, Hercules, CA, ZDA)

BARVANJE GELA IN ODČITAVANJE REZULTATOV

Glej celotno poglavje BsaJI-RFLP ANALIZA - BARVANJE GELA IN ODČITAVANJE REZULTATOV, stran 36-37.

3.7.STATISTIČNE ANALIZE

- Najprej smo s χ^2 testom prverili kako se z eksperimentalnim delom dobljene frekvence genotipov razlikujejo od pričakovane genske frekvence izračunane po Hardy-Weinberg-ovem načelu.
- V nadaljevanju smo s Kolmogorov-Smirnov testom preverili porazdeljevanje spremenljivk (koncentracije OPG, RANKL in razmerja RANKL/OPG)
- Ugotavljali smo vpliv genotipov na serumske koncentracije OPG, RANKL in na razmerje RANKL/OPG. Za spremenljivke, ki so se normalno porazdeljevale (koncentracija OPG) smo uporabili za primerjavo srednjih vrednosti parametrične teste: enosmerni ANOVA, Post hoc in t test; za spremenljivke, ki se niso normalno porazdeljevale (koncentracija RANKL, razmerje RANKL/OPG) smo za primerjavo srednjih vrednosti uporabili neparametrične teste: Kruskal-Wallis-ov in Mann-Whitney-jev test.

Pri tem smo vedno postavili :

ničelno hipotezo H_0 - srednje vrednosti serumskih koncentracij OPG (oziroma RANKL oziroma razmerja RANKL/OPG) so pri vseh genotipih enake

alternativno hipotezo H_1 – srednje vrednosti serumskih koncentracij OPG (oziroma RANKL oziroma razmerja RANKL/OPG) so med posameznimi genotipi različne

Če je bila verjetnost manjša od izbrane stopnje tveganja $\alpha=5\%$ ($p \leq 0,05$) smo **H_0 zavrnil**i in **sprejeli H_1** ter sklepali, da se serumske koncentracije med posameznimi genotipi značilno razlikujejo. Če je bila vrednost $p > 0,05$, pa smo **H_0 sprjeli** in sklepali, da je razlika v serumskih koncentracijah med posameznimi genotipi nezn

- S korelacijsko analizo smo ocenili značilnost in moč povezave med posameznim polimorfizmom in koncentracijami OPG, RANKL in razmerjem RANKL/OPG ter med polimorfizmoma samima.
 - Posamezne alele obeh polimorfizmov smo združili v haplotipe in pripadajoče podskupine ter izračunali frekvenco posameznih haplotipov za oba polimorfizma.
 - Ugotavljali smo vpliv podskupin haplotipov na serumske koncentracije OPG, RANKL in na razmerje RANKL/OPG. Za primerjavo srednjih vrednosti koncentracij OPG smo uporabili parametrična enosmerni ANOVA in Post hoc test, za primerjavo srednjih vrednosti koncentracije RANKL in razmerja RANKL/OPG pa neparametrični Kruskal-Wallis-ov test.
- Tudi tu smo postavili H_0 in H_1 in ravnali enako kot pri ugotavljanju vpliva genotipov na serumske koncentracije RANKL, OPG in razmerja RANKL/OPG.

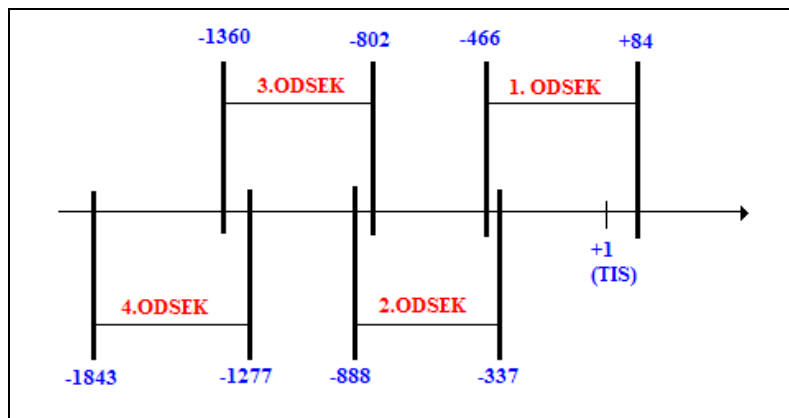
Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili statistični program SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA)

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

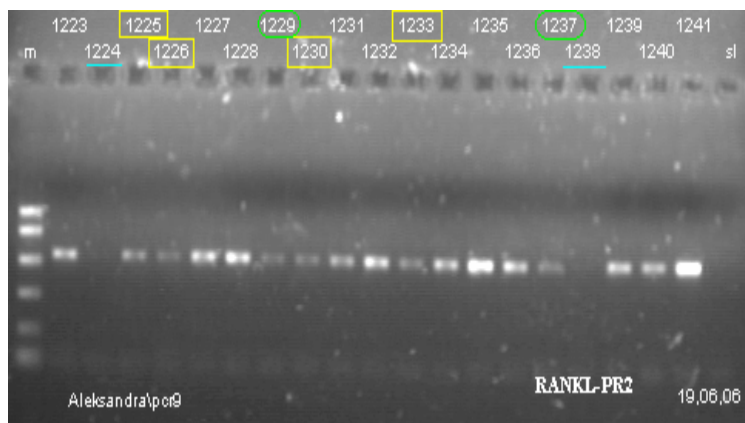
Za doseganje natančnosti, specifičnosti in vitro reakcije PCR in pridobitev ustrezne količine PCR produkta moramo natančno določiti pogoje reakcije. Na potek reakcije vplivajo številni dejavniki, katere moramo natančno preučiti in empirično optimizirati. Pri optimiziranju reakcije spreminjamo sestavo reakcijske zmesi, število ciklov posamezne faze reakcije ter čas trajanja in temperaturo posameznega cikla. Z optimizacijo reakcije izboljšamo kvaliteto in količino PCR produkta.

Pogoji PCR reakcije za pomnoževanje gena TNFSF11 so bili že predhodno določeni v raziskavi novih polimorfizmov v tem genu (43). Promotor gena TNFSF11 so razdelili na štiri odseke (dolge okrog 550 bp) (slika 12). Mi smo pomnoževali drugi odsek (TNFSF11 PR2), ki zajame oba polimorfizma naše raziskave (-643 C>T in -693 G>C).



Slika 12: Shematski prikaz razdelitve promotora (pr) gena TNFSF11 na odseke. TIS - začetno mesto transkripcije, številke označujejo meje odsekov (številčeno po GenBank, Accession number AF333234)

PCR reakcijo smo izvedli za vse vzorce in ustreznost produkta preverili z EF na 2% agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. Na sliki gela po EF smo videli lise, katerih intenzivnost je sorazmerna s količino PCR produkta. Kot kontrolo smo uporabili marker, ki je poleg drugih vseboval tudi odsek dolg 500 bp in je bil malo pod linijo naših PCR produktov. Kot kontrolo morebitne kontaminacije s tujo DNA pa smo uporabili slepi vzorec, brez dodatka DNA (vsaka prisotnost DNA, bi pomenila kontaminacijo) (slika 13).



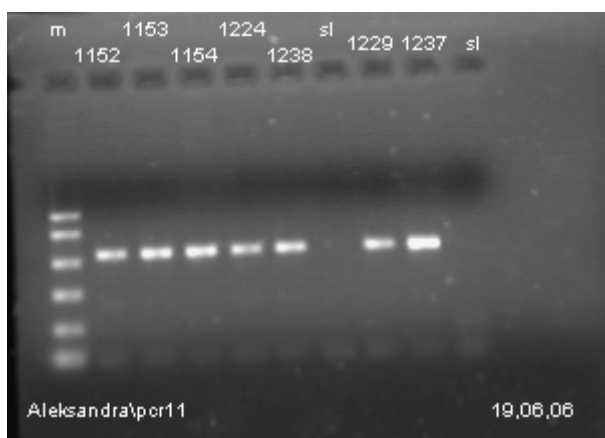
Slika 13: Rezultati pomnoževanja 2.odseka promotorja gena TNFSF11

Slika 13 prikazuje rezultat pomnoževanja, ki v nekaterih primerih ni bil zadovoljiv. Pri dveh vzorcih sploh nismo dobili produkta, pri nekaterih pa smo spremenili pogoje, da bi dobili ustrezno količino PCR produkta.

Primer uspešne PCR reakcije, pri čemer iz intenzivnosti lis sklepamo na zadovoljive količine produkta vidimo pri vzorcih 1227,1228,1235 in1241(slika 13).

m-oznaka za marker (50, 100, 300, 500, 750, 1000 bp)

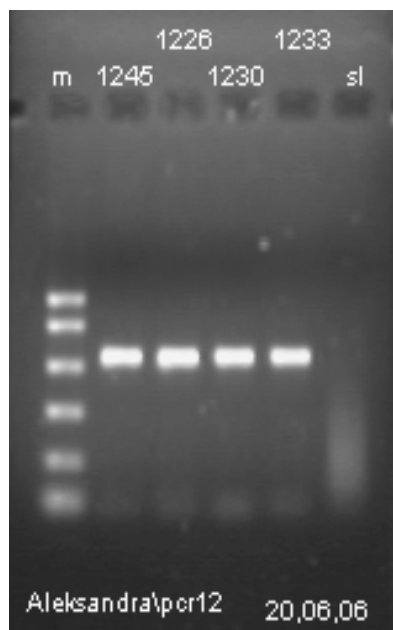
sl-slepi vzorec (brez DNA)



Slika 14: Rezultati pomnoževanja ponovljenih PCR reakcij

Pri vzorcih 1224 in1238, kjer nismo dobili produkta, smo ponovili PCR pri enakih pogojih in dobili zadovoljive rezultate (slika 14).

Pri vzorcih 1229, 1237 smo se zaradi nezadostne količine produkta odločili za ponovitev PCR reakcije z večjo količino DNA dodanega v reakcijsko zmes (namesto 1,0 μ L smo dali v zmes 1,5 μ L vzorca in ustrezno zmanjšali količino ultra čiste vode v reakcijski zmesi) in prav tako dobili zadovoljivo količino produkta (slika 14).



Pri vzorcih 1225, 1226, 1230 in 1233 smo se pri ponovitvi PCR odočili za povečanje števila ciklov pomnoževanja (iz 37 na 40) in dobili zadostne količine PCR produkta (slika 15).

Slika 15: Rezultati pomnoževanja pri spremenjenih pogojih

Enako smo ravnali še pri nekaterih vzorcih, kjer nismo dobili zadostne količine PCR produkta. Tako smo vseh 114 vzorcev uspešno pomnožili in dobili zadostne količine PCR produktov za nadaljnjo analizo.

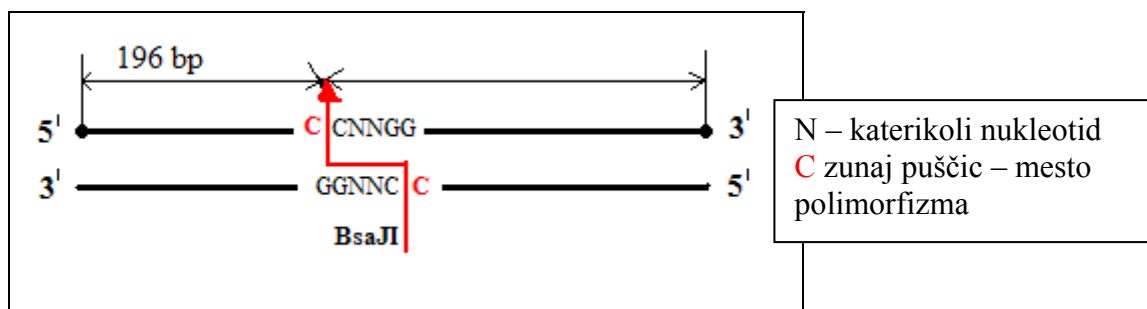
4.2. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV IN DOLOČANJE GENOTIPOV

Za določitev genotipov preiskovancev smo izbrali metodo RFLP. Pri tej metodi uporabimo encim, ki prepozna določeno zaporedje nukleotidov v genskem zapisu in ga razcepi. Nastali fragmenti se ločijo med seboj po dolžini, zato jih lahko identificiramo po ločbi z EF. Vrsto in pogoje EF za določanje polimorfizmov -643C>T in -693G>C so določili v predhodni raziskavi (43) in smo jih uporabili tudi v tem diplomskem delu.

I. ANALIZA POLIMORFIZMA -693G>C

Zaporedje v okolici tega polimorfizma ustreza vezavnemu mestu za encim *BsaII*. Ta encim prepozna zaporedje petih nukleotidov, če je na mestu -693 prisoten C namesto G in

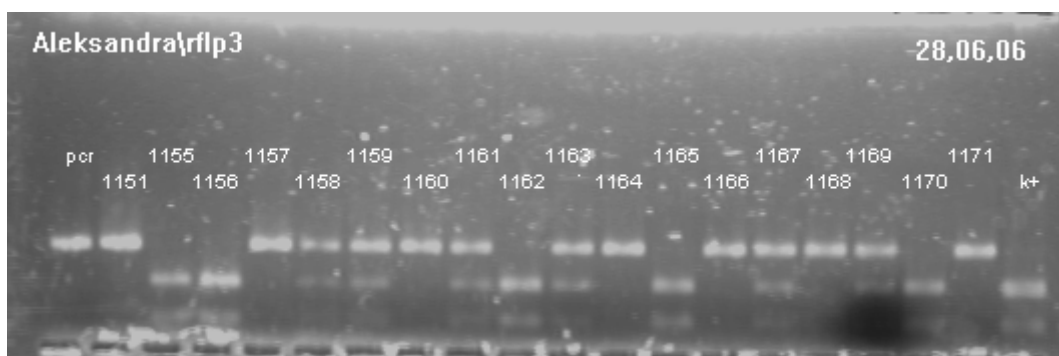
opravi cepitev prav na tem mestu. S to cepitvijo dobimo dva 356 bp in 196 bp dolga fragmenta.



Slika 16: Shematski prikaz cepitve TNFSF11-PR2 z encimom BsaJI

Razlika med tema fragmentoma je kar 160 bp, zato je EF ločitev nastalih fragmentov enostavna in smo lahko uporabili 2% agarozni gel. Po barvanju gela z Syber[®]Green I smo gel slikali pod UV lučko.

Naslednja slika prikazuje primer analize BsaJI-RFLP 18 vzorcev. Na začetku smo kot označevalec uporabili nerestringiran PCR produkt in na koncu pozitivno kontrolo (K+) s popolno restrikcijo (že genotipizirani vzorci druge raziskave). Na sliki spodaj vidimo različne kombinacije rezultatov restrikcije.



Slika 17: Rezultat analize RFLP 18 vzorcev na 2% agaroznem gelu

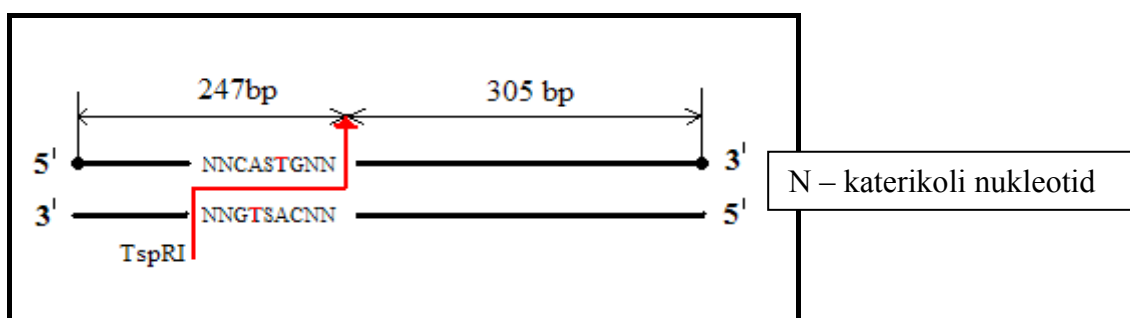
Rezultate restrikcije na gelu (slika 18) smo lahko videli v treh različnih kombinacijah:

- prisotnost enega fragmenta (lise) pomeni homozigotno osebo z odsotno restrikcijo na obeh alelih – **genotip GG**
- prisotnost dveh fragmentov (lis) pomeni homozigotno osebo z restrikcijo na obeh alelih – **genotip CC**
- prisotnost treh fragmentov (lis) pomeni heterozigotno osebo z restrikcijo na enem izmed alelov – **genotip GC**

Pri nekaterih vzorcih smo zaradi slabših produktov PCR podvojili količino vzorca v reakcijski zmesi (na račun ultra čiste vode) in dobili dobre produkte restrikcije.

II. ANALIZA POLIMORFIZMA -643C>T

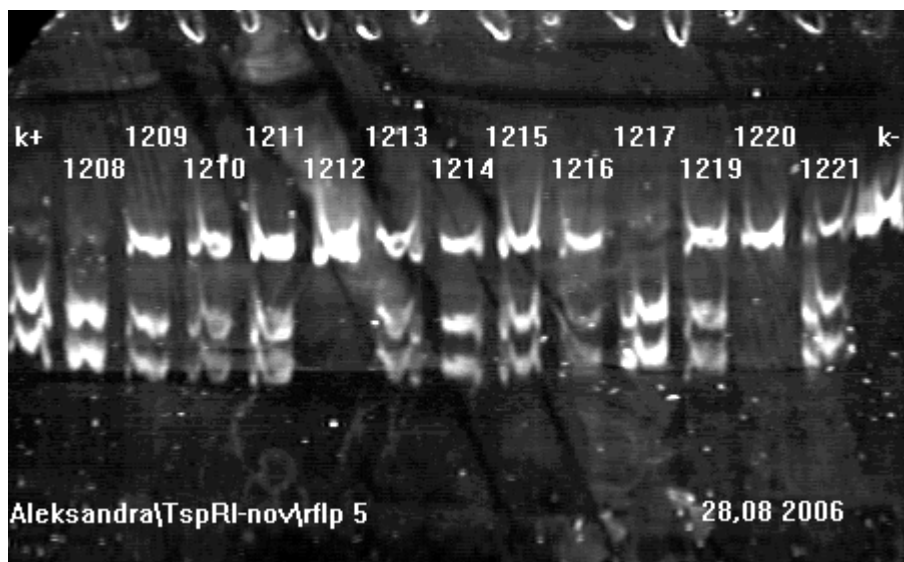
Zaporedje nukleotidov v okolici tega polimorfizma ustreza vezavnemu mestu za encim **TspRI** (ugotovljeno v predhodni raziskavi) (43). Polimorfizem -643C>T leži v bližini polovice pomnoženega odseka RANKL PR2. Po restrikciji ob prisotnosti polimorfizma na obeh alelih dobimo dva 247 bp in 305 bp dolga fragmenta, katerih razlika v dolžini je le 58 bp.



Slika 18: Shematski prikaz cepitve TNFSF11-PR2 z encimom TspRI

Ker se fragmenta le malo razlikujeta po dolžini (58 bp), smo za EF ločbo uporabili 10% poliakrilamidni gel. Premreženost gela določa razmerje AA:bAA (razmerje AA:bAA je bilo 29:1). Premreženost gela je večja pri večji količini prečnega povezovalca (bAA). Gostota in premreženost gela določita velikost por poliakrilamidnega gela. V primerjavi z agaroznim, omogoča boljše ločevanje odsekov, ki se po dolžini ne razlikujejo dosti, saj so pore manjše. Po EF ločbi smo gel barvali s Syber[®]GreenI in ga slikali pod UV lučko.

Spodnja slika prikazuje rezultate TspRI-RFLP analize 13 vzorcev. Na začetku smo uporabili K⁺ - pozitivno kontrolo s popolno restrikcijo (že genotipizirani vzorci druge preiskave), na koncu pa K⁻ - negativno kontrolo brez restrikcije (že genotipizirani vzorci druge preiskave). Med vzorci sta dva s popolno restrikcijo (1208, 1217), dva brez restrikcije (1212, 1220), ostali pa so restringirani le na enem alelu (3 fragmenti).



Slika 19: Rezultat RFLP analize 13 vzorcev na 10% poliakrilamidnem gelu

Rezultate restrikcije na gelu smo lahko videli v treh kombinacijah (slika 19):

- prisotnost enega fragmenta (lise) pomeni homozigotno osebo z odsotno restrikcijo na obeh alelih – **genotip CC**
- prisotnost dveh fragmentov (lis) pomeni homozigotno osebo s prisotno restrikcijo na obeh alelih – **genotip TT**
- prisotnost treh fragmentov (lis) pomeni heterozigotno osebo s prisotno restrikcijo na enem izmed alelov – **genotip CT**

Vseh 114 PCR produktov smo uspešno cepili z obema encimoma (*Bsa*II in *Tsp*RI) ter tako uspešno genotipizirali vse vzorce (priloga 1). Genotipizacijo smo izvedli na originalnih slikah.

4.3. UGOTAVLJANJE POGOSTNOSTI POLIMORFIZMOV

V genetiki pomeni polimorfizem prisotnost dveh ali več različnih genotipov v neki populaciji in se pojavlja pri več kot 1% populacije.

Pri obeh polimorfizmih smo za posamezen genotip na drugem odseku promotorja gena TNFSF11 izračunali frekvence (%) za preiskovano populacijo (preglednica IX).

Preglednica IX: Frekvence posameznih genotipov

	-643C>T			-693G>C		
	CC	CT	TT	GG	GC	CC
frekvenca v %	24,6	52,6	22,8	22,8	51,8	25,4

Ugotovili smo, da je dedovanje proučevanih nukleotidov v obeh primerih enakovredno. Frekvence so blizu značilnega razmerja homozigot1 : heterozigot : homozigot2 = 25% : 50% : 25%.

Frekvence genotipov izračunane iz preiskovane populacije 114 bolnikov okuženih s HIV smo (priloga 1) primerjali z izračunanimi frekvencami po **Hardy-Weinberg-ovem načelu** (preglednica X). To načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov v populaciji med generacijami ohranja. Načelo velja za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer ni selekcije vzorcev, dodatnih mutacij in migracij in se osebki naključno razmnožujejo.

Preglednica X: Prikaz eksperimentalnih in izračunanih relativnih frekvenc posameznih genotipov za oba polimorfizma.

genotip	opazovana frekvenca #	pričakovana frekvenca #
-643 C>T		
CC	28	29,5
CT	60	57,0
TT	26	27,5
p=0,852		

genotip	opazovana frekvenca #	pričakovana frekvenca #
-693G>C		
GG	26	27
GC	59	57
CC	29	30
p=0,932		

Po pričakovanju smo pri obeh genotipih s χ^2 testom potrdili statistično neznačilno razliko ($p>0,05$) med opazovano frekvenco genotipov, dobljeno z eksperimentalnim delom in pričakovano frekvenco izračunano po Hardy–Weinberg-ovem načelu ($p=0,852$ za -643C>T; $p=0,932$ za -693 G>C). To pomeni, da se **frekvence genotipov za preučevana polimorfizma porazdeljujejo v skladu z HW ravnotežjem.**

4.4. OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV S KONCENTRACIJAMI OPG, RANKL V SERUMU IN RAZMERJEM MED NJIMA

Polimorfna mesta v genomu so lahko morebitni genetski dejavniki tveganja, med drugim pa so lahko uporabni tudi kot genetski označevalci pri posredni diagnostiki določene bolezni. Cilj naše raziskave je bil poiskati povezanost med serumskimi koncentracijami OPG, RANKL, razmerjem RANKL/OPG in polimorfizmoma v promotorju gena TNFSF11 pri bolnikih okuženih s HIV.

Koncantracija OPG v serumu je bila izmerjena 95 preiskovancem, koncentracija RANKL 92 preiskovancem in prav tako je bilo pri 92 preiskovancih izračunano razmerje med serumskima koncentracijama RANKL in OPG (priloga1). S statistično obdelavo smo skušali poiskati razlike znotraj preiskovane skupine bolnikov okuženih s HIV glede na genotipsko spremembo v promotorju gena za RANKL.

Preglednica XI: Pregled srednjih vrednosti po genotipih za oba polimorfizma; rumena barva označuje najvišje srednje vrednosti

		konc.OPG $\pm$ SD (pmol/L)	konc.RANKL $\pm$ SD (pmol/L)	RANKL/OPG $\pm$ SD
genotip -643C>T	CC	3,904 $\pm$ 1,070	0,077 $\pm$ 0,051	0,024 $\pm$ 0,021
	CT	4,294 $\pm$ 1,519	0,105 $\pm$ 0,079	0,029 $\pm$ 0,028
	TT	4,594 $\pm$ 1,648	0,130 $\pm$ 0,102	0,033 $\pm$ 0,033
genotip -693G>C	GG	3,872 $\pm$ 1,107	0,080 $\pm$ 0,051	0,026 $\pm$ 0,026
	GC	4,335 $\pm$ 1,524	0,102 $\pm$ 0,079	0,029 $\pm$ 0,028
	CC	4,459 $\pm$ 1,457	0,129 $\pm$ 0,099	0,035 $\pm$ 0,032

Vidimo, da so srednje vrednosti vseh treh spremenljivk najvišje pri spremenjenih genotipih: TT pri -643C>T in CC pri -693G>C (preglednica XI). Iz tega bi lahko sklepali,

da imata spremenjena homozigota večjo produkcijo RANKL proteina, hkrati pa se sintetizira tudi več OPG (kot kompenzacijski odgovor). Poveča se tudi vrednost razmerja RANKL/OPG, kar pomeni, da se koncentracija RANKL procentualno bolj poviša kot koncentracija OPG in s tem se proces remodelacije premakne v smeri povečane kostne razgradnje. Tako bi pri osebah s spremenjenima genotipoma pričakovali večjo podvrženost osteoporozi, zaradi večje razgradnje kosti.

Pred nadaljnjo statistično obdelavo smo z **One-Sample Kolmogorov-Smirnov testom** preverili porazdelitev vseh izmerjenih serumskih koncentracij in razmerij ter potrdili, da se serumske koncentracije OPG porazdeljujejo normalno, pri serumskih koncentracijah RANKL in razmerju koncentracij RANKL/OPG pa normalne porazdelitve nismo potrdili. Tako smo za primerjavo srednjih vrednosti koncentracij OPG lahko uporabili **parametrične teste**, za koncentracije RANKL in razmerje pa **neparametrične teste**. Iskali smo povezave med genotipi in serumskimi koncentracijami RANKL in OPG, ter razmerjem med njima.

I. RAZLIKE V KONCENTRACIJI OPG MED GENOTIPI

Preglednica XII: Povezanost genotipov posameznega polimorfizma s serumskimi koncentracijami OPG - pregled statističnih testov in rezultati ; $p > 0,05$ povezava je neznačilna

OPG		-643C>T		-693G>C	
		p	značilnost povezave	p	značilnost povezave
ANOVA	med genotipi	0,296	NZ	Med genotipi	0,363 NZ
Post hoc	CC-CT	0,286	NZ	GG-GC	0,224 NZ
	CC-TT	0,124	NZ	GG-CC	0,186 NZ
	CT-TT	0,436	NZ	GC-CC	0,737 NZ
t-test*	med skrajnima genotipoma	0,119	NZ	med skrajnima genotipoma	0,164 NZ

*za polimorfizma -643C>T in -693G>C uporabljena različna t-testa, glede na osnovi enakosti oz.neenakosti varianc (glej preglednicoXIII)

- Z **enostranskim ANOVA testom**, smo proučevali vpliv posameznega genotipa na serumsko koncentracijo OPG znotraj preiskovane populacije (preglednica XII). V primerjavo so bile vključene vse tri skupine genotipov istočasno.

S primerjavo srednjih vrednosti koncentracij OPG posamezne skupine, glede na genotip, smo pri obeh polimorfizmih dobili vrednosti $p > 0,05$ (za -643C>T $p = 0,296$ in za -693G>C $p = 0,363$), kar pomeni, da so razlike med koncentracijami OPG posameznih genotipov neznatne.

- Nato smo s **Post Hoc testom** (LSD) primerjali srednje vrednosti koncentracij OPG med pari genotipov (preglednica XII), da bi odkrili morebitne značilne razlike.

Tudi s tem testom nismo dokazali značilne povezave med genotipi in serumsko koncentracijo OPG (pri -643C>T in -693G>C za vse pare genotipov $p > 0,05$). Je pa pri primerjavi obeh skrajnih genotipov (homozigotov) videti zmanjšanje neznatnosti med skrajnima genotipoma CC-TT in GG-CC, sploh pri -643C>T polimorfizmu ($p = 0,124$), ki je blizu mejne značilnosti ($0,05 < p < 0,1$).

- Uporabili smo še statistični **t-test** s katerim smo testirali razlike med skrajnima genotipoma obeh polimorfizmov. Najprej smo izvedli **Levene-jev test** enakosti varianc (preglednica XIII) in glede na rezultat nadalje izvedli ustrezen t-test.

Preglednica XIII: Testiranje razlik med variancami za oba polimorfizma in izbira t-testa

OPG		Levenejev test enakosti varianc		neenake variance	t-test prilagojen neenakosti varianc
		p	značilnost povezave		
-643C>T	CC-TT	0,031	Z		
-693G>C	GG-CC	0,082	NZ	enake variance	navaden t-test

Pri genotipu -643C>T smo dobili značilno razliko med variancami ($p < 0,05$), zato smo v nadaljevanju uporabili **t-test prilagojen domnevi neenakosti varianc** med skrajnima skupinama genotipov. Pri genotipu -693G>C pa smo dobili neznatno razliko med variancami ($p > 0,05$) in smo v nadaljevanju uporabili **običajen t-test z domnevo o enakosti varianc** med skupinama genotipov (preglednica XII).

S t-testom pri nobenem polimorfizmu nismo uspeli dokazati statistično značilnih razlik (obe p vrednosti $> 0,05$) med koncentracijami OPG pri homozigotih v serumu. Vidimo pa zmanjšanje neznatnosti – večje razlike med koncentracijami OPG pri skrajnih genotipih,

sploh pri polimorfizmu -643C>T ($p=0,119$), ki je blizu mejne značilnosti ($0,05 < p < 0,1$). To pomeni da so razlike med koncentracijami homozigotov večje.

Pri vseh testih smo sprejeli H_0 , kar pomeni, da so bile razlike med srednjimi vrednostmi serumskih koncentracij OPG glede na genotip statistično neznačilne. Iz tega sklepamo, da polimorfizma ne vplivata na serumske koncentracije OPG.

II. RAZLIKE V KONCENTRACIJI RANKL MED GENOTIPI

Preglednica XIV: Povezanost genotipov posameznega polimorfizma s serumskimi koncentracijami RANKL -pregled statističnih testov in rezultati ; $p > 0,05$ povezava je neznačilna

RANKL		-643C>T		-693G>C	
		p	značilnost povezave	p	značilnost povezave
Kruskal-Wallis test	med genotipi	0,371	NZ	0,426	NZ
Mann-Whitney test	med skrajnima genotipoma	0,178	NZ	0,183	NZ

- S **Kruskal-Wallis-ovim testom** smo primerjali vrednosti srednjih rangov koncentracij RANKL (preglednica XIV) in iskali povezanost genotipov s serumsko koncentracijo RANKL znotraj celotne preiskovane populacije.

Za genotipe -643C>T je $p=0,371$, za genotipe -693G>C pa $p=0,426$, kar pomeni da so pri obeh polimorfizmih razlike v koncentracijah RANKL znotraj skupine preiskovanih HIV bolnikov med skupinami genotipov neznačilne ($p > 0,05$).

- Za primerjavo koncentracij RANKL med skrajnimi genotipi, oziroma primerjavo med homozigoti, pri obeh polimorfizmih, smo uporabili **Mann-Whitney test** (preglednica XIV).

Razlike v koncentracijah med skrajnima genotipoma pri obeh polimorfizmih so statistično neznačilne ($p > 0,05$). V obeh primerih pa opazimo zmanjšanje statistične neznačilnosti med skrajnima genotipoma.

Pri obeh testih smo sprejeli H_0 , kar pomeni, da so bile razlike med srednjimi vrednostmi serumskih koncentracij RANKL glede na genotip statistično neznačilne. Iz tega sklepamo, da polimorfizma ne vplivata na serumske koncentracije RANKL.

III. RAZLIKE V RAZMERJU KONCENTRACIJ RANKL/OPG MED GENOTIPI

Preglednica XV: Povezanost genotipov posameznega polimorfizma z razmerjem RANKL/OPG -pregled statističnih testov in rezultati ; $p > 0,05$ povezava je neznačilna

RANKL/OPG		-643C>T		-693G>C	
		p	značilnost povezave	p	značilnost povezave
Kruskal-Wallis test	med genotipi	0,822	NZ	0,802	NZ
Mann-Whitney test	med skrajnima genotipoma	0,584	NZ	0,553	NZ

Uporabili smo iste neparametrične teste kot pri koncentraciji RANKL.

- S **Kruskal-Wallis testom** smo primerjali vrednosti srednjih rangov posameznega genotipa in vpliv na razmerje RANKL/OPG znotraj celotne preiskovane populacije (preglednica XVI).

Za polimorfizma -643C>T ($p=0,822$) in -693G>C ($p=0,802$) je $p > 0,05$ zato je povezava med razmerjem RANKL/OPG in genotipi neznačilna.

- Z **Mann-Whitney testom** smo iskali razlike med srednjimi rangi razmerja RANKL/OPG in vpliv skrajnih genotipov na to razmerje (preglednica XVI).

Prav tako nismo uspeli dokazati statistično značilnih razlik med razmerjem RANKL/OPG glede na vrsto homozigota (-643C>T $p=0,584$ in -693G>C $p=0,553$; $p > 0,05$ zato je povezava med razmerjem RANKL/OPG in genotipi homozigotov neznačilna). Pri obeh polimorfizmih smo pri primerjavi med skrajnima genotipoma opazili zmanjšanje neznačilnosti povezave.

Pri obeh testih smo sprejeli H_0 , kar pomeni, da so bile razlike med srednjimi vrednostmi razmerja RANKL/OPG glede na genotip statistično neznačilne. Iz tega sklepamo, da polimorfizma ne vplivata na razmerje RANKL/OPG.

Kljub temu da, nismo s statistično obdelavo odkrili vpliva polimorfizmov -643C>T in -693G>C na serumsko koncentracijo OPG, RANKL in na razmerje med njima, smo videli

da obstajajo večje razlike (čeprav neznačilne) med skrajnimi genotipi (homozigoti) in višje vrednosti koncentracij in razmerja pri spremenjenih genotipih.

4.5. KORELACIJSKA ANALIZA GENOTIPOV S SERUMSKIMI KONCENTRACIJAMI OPG, RANKL IN RAZMERJU MED NJIMA

Ocenjevali smo tudi moč in način povezave med posameznimi spremenljivkami. Uporabili smo Spearmanov korelacijski koeficient (ρ), ker se spremenljivke ne porazdeljujejo normalno (razen koncentracije OPG).

Preglednica XVI: Neparometrična korelacija – Spearmanov korelacijski koeficient (ρ): med posameznim polimorfizmom in koncentracijama RANKL, OPG; RANKL/OPG in med samima polimorfizmoma

		konc.OPG	konc.RANKL	RANKL/OPG			
-643C>T	ρ	0,112	0,145	0,064			-693G>C
	p	NZ	NZ	NZ			
		0,281	0,165	0,547			
-693G>C	ρ	0,087	0,137	0,061	-643C>T	ρ	0,956
	p	NZ	NZ	NZ			Z
		0,403	0,194	0,565		p	0,000

V vseh primerih, kjer smo primerjali polimorfizem (genotipe) s serumskimi koncentracijami posameznega proteina ali razmerjem, smo ugotovili, da je korelacija šibka ($\rho < 0,2$) povezava pa neznačilna ($p > 0,05$) (preglednica XVI). Kjer smo primerjali kako se genotipi obeh polimorfizmov pojavljajo sočasno pri posamezniku, smo ugotovili, da je korelacija zelo močna ($\rho > 0,9$) in značilna že pri večji stopnji zaupanja ($p < 0,01$) (preglednica XVI).

4.6.PRIMERJAVA HAPLOTIPOV S SERUMSKIMI KONCENTRACIJAMI OPG, RANKL IN NJUNIM RAZMERJEM

Zaradi močne in značilne korelacije med preiskovanima polimorfizmoma smo se odločili za nadaljnjo statistično obdelavo, kjer smo dobljene genotipe obeh polimorfizmov združili v haplotipe.

I. ZDRUŽITEV V HAPLOTIPE IN PRIMERJAVA SREDNJIH VREDNOSTI PODSKUPIN HAPLOTIPOV

Posamezne alele obeh polimorfizmov smo združili v haplotipa: **haplotip CG** in **haplotip TC**. Obe skupini smo razdelili na **3 podskupine**:

- 0.....0 kopij CG oziroma TC
- 1.....1 kopija CG oziroma TC
- 2.....2 kopiji CG oziroma TC

Preglednica XVII: Pregled frekvenčne porazdelitve in srednjih vrednosti koncentracij OPG, RANKL in razmerja za posamezne podskupine haplotipaov CG in TC; rumena barva označuje najvišje srednje vrednosti pri posameznem haplotipu

		frekvenca v %	konc.OPG (pmol/L)	konc.RANKL (pmol/L)	RANKL/OPG
haplotip CG	0	23,7	4,527 ± 1,635	0,132 ± 0,100	0,036 ± 0,033
	1	53,5	4,313 ± 1,499	0,101 ± 0,078	0,028 ± 0,028
	2	22,8	3,872 ± 1,107	0,080 ± 0,051	0,026 ± 0,214
haplotip TC	0	24,6	3,904 ± 1,070	0,077 ± 0,051	0,024 ± 0,021
	1	52,6	4,294 ± 1,519	0,105 ± 0,079	0,029 ± 0,028
	2	22,6	4,594 ± 1,648	0,130 ± 0,102	0,035 ± 0,033

Iz preglednice je razvidno, da imajo haplotipi CG skupine 0 najvišje srednje vrednosti koncentracij OPG, RANKL in tudi srednja vrednost razmerja je v tej skupini najvišja. V skupino 0 haplotipa CG spadajo vsi tisti HIV bolniki, ki nimajo nobene kopije haplotipa CG, kar pomeni, da sta oba alela posameznega polimorfizma spremenjena (za -643C>T in -693G>C oba spremenjena homozigota), ali pa je spremenjen homozigot pri enem polimorfizmu, pri drugem pa je heterozigot (možne kombinacije naših eksperimentalno

dobljenih genotipov obeh polimorfizmov TT CC, CT CC ali TT GC). Obratno pa vidimo, da imajo najvišje srednje vrednosti haplotipi TC skupine 2. V to skupino sodijo tisti HIV bolniki, ki imajo 2 kopiji haplotipa TC, kar pomeni, da sta oba spremenjena homozigota (možna kombinacija genotipov obeh polimorfizmov je TT CC)(preglednica XVII).

Za nadaljnjo statistično obravnavo smo uporabili parametrične teste za primerjavo koncentracij OPG, in neparametrične teste za primerjavo koncentracij RANKL in razmerja RANKL/OPG.

II. RAZLIKE V KONCENTRACIJI OPG MED PODSKUPINAMI HAPLOTIPOV

Preglednica XVIII: Povezanost podskupin posameznega haplotipa s koncentracijami OPG - pregled statističnih testov in rezultati ; $p > 0,05$ povezava je neznačilna

OPG		haplotip CG		haplotip TC	
		p	značilnost povezave	p	značilnost povezave
ANOVA	med podskupinami haplotipa	0,326	NZ	0,296	NZ
Post hoc	0-1	0,850	NZ	0,564	NZ
	1-2	0,505	NZ	0,737	NZ
	0-2	0,350	NZ	0,304	NZ

➤ S parametričnim **ANOVA** testom smo primerjali srednje vrednosti koncentracij OPG med posameznimi podskupinami obeh haplotipov (preglednica XVIII).

S primerjavo srednjih vrednosti koncentracij OPG znotraj preiskovane populacije HIV bolnikov pri posameznih podskupinah haplotipov nismo dokazali značilnih razlik, saj je v obeh primerih $p > 0,05$ (haplotip GC $p = 0,326$ in haplotip TC $p = 0,296$).

➤ Nato smo s **Post Hoc testom** (Scheffe). primerjali srednje vrednosti koncentracij OPG med pari podskupin pri obeh haplotipih (preglednica XVIII).

Vse vrednosti p so $> 0,05$, kar pomeni, da med pari podskupin pri posameznem haplotipu ni značilnih razlik v koncentracijah OPG.

Pri obeh testih smo sprejeli H_0 , kar pomeni, da so bile razlike med srednjimi vrednostmi serumskih koncentracij OPG glede na podskupino pri posameznem haplotipu statistično neznačilne. Iz tega sklepamo, da haplotipa CG in TC ne vplivata na serumske koncentracije OPG.

III. RAZLIKE V KONCENTRACIJI RANKL MED PODSKUPINAMI HAPLOTIPOV

Preglednica XIX: Povezanost haplotipov s serumskimi koncentracijami RANKL - pregled statističnih testov in rezultati ; $p > 0,05$ povezava je neznajčilna

RANKL		haplotip CG		haplotip TC	
		p	značilnost povezave	p	značilnost povezave
Kruskal-Wallis test	med podskupinami haplotipa	0,377	NZ	0,371	NZ

➤ S **Kruskal-Wallis testom** smo primerjali vrednosti srednjih rangov koncentracij RANKL posamezne podskupine pri obeh haplotipih in vpliv na koncentracijo RANKL znotraj preiskovane populacije HIV bolnikov (preglednica XIX).

Pri obeh haplotipih je vrednost $p > 0,05$ (haplotip CG $p = 0,377$ in haplotip TC $p = 0,371$), kar nam pove, da ni značilnih razlik med serumskimi koncentracijami posameznih podskupin pri določenem haplotipu.

Sprejeli smo H_0 , kar pomeni, da so bile razlike med srednjimi vrednostmi serumskih koncentracij RANKL glede na podskupino posameznega haplotipa statistično neznajčilne. Iz tega sklepamo, da haplotipa CG in TC ne vplivata na serumske koncentracije RANKL.

IV. RAZLIKE V RAZMERJU KONCENTRACIJ RANKL/OPG MED PODSKUPINAMI HAPLOTIPOV

Preglednica XX: Povezanost haplotipov z razmerjem RANKL/OPG - pregled statističnih testov in rezultati ; $p > 0,05$ povezava je neznajčilna

RANKL/OPG		haplotip CG		haplotip TC	
		p	značilnost povezave	p	značilnost povezave
Kruskal-Wallis test	med haplotipi	0,790	NZ	0,824	NZ

➤ **S Kruskal-Wallis testom** smo primerjali vrednosti srednjih rangov razmerja RANKL/OPG posamezne podskupine pri obeh haplotipih in vpliv na razmerje RANKL/OPG znotraj preiskovane populacije HIV bolnikov (preglednica XX).

Pri obeh haplotipih je vrednost $p > 0,05$ (haplotip CG $p = 0,790$ in haplotip TC $p = 0,824$), kar nam pove, da ni značilnih razlik med razmerji RANKL/OPG posameznih podskupin pri določenem haplotipu.

Sprejeli smo H_0 , kar pomeni, da so bile razlike med srednjimi vrednostmi razmerja RANKL/OPG glede na podskupino posameznega haplotipa statistično neznačilne. Iz tega sklepamo, da haplotipa CG in TC ne vplivata na razmerje RANKL/OPG.

4.7. ZAKLJUČEK K RAZPRAVI

Z nobenim testom nismo uspeli dokazati statistično značilnih razlik med serumskimi koncentracijami RANKL, OPG in razmerjem RANKL/OPG glede na pripadajoči genotip in haplotip preiskovanca. **Iz tega sklepamo, da polimorfizma -643C>T, -693G>C in haplotipa CG, TC ne vplivajo na serumske koncentracije RANKL, OPG in razmerje RANKL/OPG.**

Smo pa opazili višje vrednosti vseh treh parametrov pri spremenjenih homozigotih kar nakazuje na to, da bi lahko imele te osebe zaradi višjih vrednosti, predvsem razmerja RANKL/OPG večjo kostno razgradnjo in bi bile lahko bolj podvržene kostnim obolenjem z izgubo kostne mase. Te predpostavke v našem primeru nismo podprli z nobenim statističnim testom, vendar je možno, da drugi dejavniki zakrijejo vpliv polimorfizmov na serumske koncentracije RANKL, OPG in razmerje med njima. Z možnim povečanjem števila preiskovancev (na približno 1000), bi dobili relevantnejše podatke, saj bi se lahko izognili tem vplivom. V genu TNFSF11 so prisotna številna vezavna mesta za transkripcijske faktorje in eden izmed teh je možno vezavno mesto za ADR1 (87,7% homolognost), ki vključuje ravno preiskovani polimorfizem -693G>C (44). Do zdaj pa ni znana nobena raziskava, ki bi ocenila funkcionalnost vezavnega mesta za transkripcijski faktor ADR1.

Raziskave polimorfizmov v promotorju gena TNFSF11 so bile do sedaj usmerjene le v povezanost z MKG in sicer:

➤ Objava raziskovalne skupine Katedre za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo, ki ni dokazala povezanosti polimorfizmov -643C>T in -693G>C v promotorju gena

- V diplomskem delu pogostost polimorfizmov gena TNFSF11 in njihova povezanost z MKG pri Slovencih ni bilo dokazanega vpliva polimorfizmov -643C>T in -693G>C na MKG (genotipska in haplotipska analiza) pri 400 preiskovancih vključenih v prevalenčno študijo osteoporoze in prav tako ne pri skupini 63 osteoporoznih bolnic zdravljenih z raloksifenom (45).
- V nedavni raziskavi funkcionalne vloge polimorfizmov promotorja gena TNFSF11 je bila pri 182 osteoporoznih bolnicah dokazana povezava teh dveh polimorfizmov z MKG-vratnih vretenc, pri polimorfizmu -693G>C pa tudi z MKG-vratu stegenice, nobene povezave pa ni bilo odkrite pri 222 neosteporotičnih ženskah. Med polimorfizmoma je bila opažena močna neuravnotežena vezava (LD), kar pomeni, da je težnja določenih alelov na enem lokusu, da se pojavljajo z določenimi aleli drugega lokusa na istem kromosomu v frekvencah, ki so večje od pričakovanih (46).
- Populacijska raziskava pri Kitajcih, ki se je ukvarjala s polimorfizmi v promotorju TNFSF11 gena, prav tako ni dokazala povezanosti z nizko MKG pri naših polimorfizmih.

Študije, ki so se ukvarjale s povezavo HIV in pojavom osteoporoze pri teh bolnikih niso pojasnile procesa patogeneze izgube kostne mase. Znani so nekateri dejavniki, ki vplivajo na ta proces:

- Številni HIV proteini lahko vplivajo na funkcionalnost in dozorevanje osteoblastov s tem da sprožijo apoptotični dražljaj v mezenhimskih celicah, ki so prekurzorji osteoblastov.
- HIV-1 gp120 in p55gag lahko zmanjšata aktivnost alkalne fosfataze in odlaganje kalcija preko osteoblastov
- povečana produkcija provnetnih citokinov TNF in IL-6 pri osebah okuženih s HIV, ki imajo vlogo v osteoklastni aktivaciji in kostni resorpciji

➤ motnje v metabolizmu laktata, porast nivoja kortikosteroidov, kronično obolenje hipotalamusno-hipofizne osi, pridobljena rezistenca rastnih hormonov, padec insulina podobnega rastnega faktorja 1, motnje v regulaciji vitamina D, lahko doprinesejo k zmanjšanju kostne gostote (39)

Iz vsega lahko razberemo kompleksnost pojavljanja same osteoporoze (multifaktorska in poligenska bolezen). Pri bolnikih okuženih s HIV pa je zaradi številnih dejavnikov, ki dodatno vplivajo na njen razvoj (direkten vpliv virusa HIV ali posledica številnih zapletov) še težje določiti vzroke za njen razvoj.



5. SKLEP

Z našimi rezultati statistične analize nismo dokazali značilne povezave med koncentracijami OPG, RANKL in njunega razmerja v serumu bolnikov okuženih s HIV. Vrednosti p vseh testov so bile $>0,05$.

Prav tako nismo dokazali značilne korelacije med posameznim polimorfizmom in koncentracijami OPG, RANKL in njunim razmerjem. V vseh primerih $\rho > 0,2$ (šibka povezava) in $p > 0,05$ (neznačilna povezava). Močno in značilno korelacijo smo dokazali med obema polimorfizmoma ($\rho > 0,8$, $p < 0,01$) in zato statistično obdeli še haplotipa CG in TC (s pripadajočimi podskupinami). Tudi tu nismo dokazali statistično značilne povezave podskupin haplotipov CG in TC s koncentracijami OPG, RANKL in njunega razmerja v serumu HIV bolnikov. Prav tako so bile vse p vrednosti $>0,05$.

Iz tega sklepamo, da polimorfizma -643C>T in -693G>C nimata vpliva na serumske koncentracije OPG, RANKL in na njuno razmerje pri bolnikih okuženih z virusom HIV. Ker pa smo videli pri obeh spremenjenih genotipih in haplotipih najvišje srednje vrednosti pri vseh treh opazovanih parametrih, bi bilo smiselno raziskavo ponoviti na večjem številu vzorcev, s čimer bi se izognili vplivu številnih drugih dejavnikov in tako dobili relevantnejše rezultate.

Patogeneza izgube kostne mase pri bolnikih okuženih s HIV je do danes še nedoločena. Koncentracije RANKL, OPG v serumu HIV bolnikov niso nujno odraz dejanskega dogajanja v procesu kostne resorpcije, saj so lahko tudi posledica sodelovanja sistema RANK/RANKL/OPG v imunskem odgovoru pri prisotnih kroničnih vnetnih procesih.

Iz vsega vidimo, da je težko dokazati vpliv posameznega dejavnika na razvoj osteoporoze, saj se številni dejavniki medsebojno prepletajo, dopolnjujejo, krepijo.

Vsekakor pa je RANKL protein, ki zahteva nadaljnje raziskave. Zelo pomembno je odkrivanje novih polimorfizmov v promotorju TNFSF11 gena, ki so znotraj vezalnih mest za transkripcijske faktorje in bi bili lahko povezani s serumskimi koncentracijami RANKL, OPG in RANKL/OPG razmerja ter MKG. Smiselno pa bi bilo tudi preiskovanje različnih kombinacij kromosomskih lokusov, različnih genov in kombinacije različnih

polimorfizmov, saj je znano, da je vpliv posameznega gena na določeno lastnost pri poligenških boleznih kakršna je osteoporoza relativno majhen. Zato ne moremo dokončno sklepati, da polimorfizem -643C>T in -693G>C nimata vpliva na serumske koncentracije RANKL, OPG in razmerje, saj popolna slika regulacije gena TNFSF11 še ni znana.

6. LITERATURA

1. Bongiovanni M, Tincati C: Bone diseases associated with human immunodeficiency virus infection: pathogenesis, risk factors and clinical management. *Curr Mol Med* 2006; 6(4): 359-400
2. Annapoorna N, Venkateswara Rao G, Reddy N S, Rambabu P, Samabasiva rao K R S: An increased risk of osteoporosis during acquired immunodeficiency syndrome. *Int J Med Sci* 2004; 1(3): 152-164
3. <http://en.wikipedia.org/wiki/hiv> (HIV)
4. Glušič S: Zidovudin pri terapiji obolelih za aidsom. *Spatula*; jun 2005; 32: 4-9
5. http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/HIVLifeCycle_FS_en.pdf (The HIV Life Cycle)
6. <http://www.cdc.gov/hiv/resources/factsheets/PDF/transmission.pdf> (HIV and Its Transmission)
7. <http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/transmission.htm> (HIV Infection and AIDS: An Overview)
8. UNAIDS - AIDS epidemic update; december 2006 (<http://www.unaids.org>)
9. Poročilo Inštituta za vavanje zdrava RS (Klavs I, Kastelic Z): Prijavljeni primeri AIDSa in okužb s HIV v Sloveniji do 20.11.2006
10. <http://www.mayoclinic.com/health/hiv-aids> (HIV/AIDS Complications)
11. <http://www.drugs.com/aids-symptoms.html> (HIV-AIDS Symptoms & Complications)
12. <http://hivinsite.ucsf.edu/insite?page=pb-diag-04-00> (Opportunistic Infections and AIDS-Related Cancers)
13. <http://en.wikipedia.org/wiki/Aids> (AIDS)
14. Alter M J: Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *Journal of Hepatology*, 2006, 0(44):S6-S9
15. <http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/howhiv.htm> (How HIV Causes AIDS)
16. Kocijančič A: Presnovne bolezni kosti. V: Kocijančič A, Mrevlje F; *Interna medicina*, EWO d.o.o. in DZS Ljubljana, 1998: 711-736
17. <http://www.technion.ac.il/~mdcourse/274203/lect5.html> (bone tissue)
18. Raisz LG: Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry* 45:8(B), 1999:1353-1358
19. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Bone/Bone.htm> (skeletal tissues - bone)
20. Holick MF, Krane SM: Introduction to bone and mineral metabolism. V: Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson: *Harrison's 15th ed. Principles of internal medicine*, volume 2; Medical Publishing Division, McGraw-Hill; 2001:2192-2230
21. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL,: Osteoclast differentiation and activation. *Nature Publishing Group*, 2003;423:337-342
22. Čoklič M: Osteoporoza in uradna stališča ISCD. *Zdravstveni vestnik*, 2004; 73: 201-202
23. Kocijančič A: Osteoporoza: diagnostika in zdravljenje; V: *Farmacevtski vestnik*, 1999;50:1-6

24. Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T: Genetics of Osteoporosis. *Endocrine Reviews* 2002; 23(3): 303-326
25. Zajickova K, Žofkova I: Osteoporosis: genetic analysis of multifactorial disease. *Endocrine Regulations*, 2003, 37: 31-44
26. Ralston SH: Genetics of osteoporosis. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2007; 66:158-165
27. Khosla S: Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 2001; 142(12):5050-5055
28. Katagiri T, Takahashi N; Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases*, 2002; 8: 147-159
29. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL: The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in paracrine regulation of bone resorption. *Journal of bone and mineral research*, 2000; vol.15(1)
30. Woo KM, Kim HM, Ko JS: Macrophage colony-stimulating factor promotes the survival of osteoclast precursors by up-regulating Bcl-X_L. *Experimental and Molecular Medicine*, 2002; vol 34(5): 340-346
31. Boyce BF, Xing L: Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. Available online <http://arthritis-research.com/content/9/S1/S1>
32. Aubin JE, Bonny E: Osteoprotegerin and its Ligand: A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorption. 2000; *Medscape Women's Health* 5(2)
33. Mencej Bedrač S, Marc J: Sistem RANKL / RANK / OPG – nova tarča za zdravljenje osteoporoze. *Farmacevtski vestnik*, 2008; 59(4): 175-178
34. Hofbauer LC: Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *European Journal of Endocrinology*. 1999; 141: 195–210
35. Kodaira K, Mizuno A, Yasuda H, Shima N, Marukami A, Ueda M, Higashio K: Cloning and characterization of the gene encoding mouse osteoclast differentiation factor. *Gene* 230;1990: 121-127
36. Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, and Kitazawa R: Sequence of human TNFSF11 gene, promoter region, GenBank, Accession Number AF54402
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=23395407>
37. Zhang J, Keller ET: Sequence of human TNFSF11 gene, promoter region, GenBank, Accession Number AF333234
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=13123708>
38. Thomas J, Doherty SM: HIV infection – A risk factor for osteoporosis. *JAIDS*, 2003; 33: 281-291
39. Re MC, De Crignis E, Cimmati L, Gibellini D: HIV infection and bone changes. *HAART and correlated pathologies* 2008; 0:13-17
40. Črešnar B, Marc J: Tehnike molekularne biologije; predavanja 2002/03 (izredni študij Visokošolski študij laboratorijske biomedicine)
41. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky II, White TJ: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press; Inc., 1990:3-20
42. Coleman WB, Tsongalis GJ: Molecular diagnostic: For the Clinical Laboratorian. Human Press; Inc., 1997
43. Mencej S, Preželj J, Kocijančič A, Ostanek B, Marc J: Association of TNFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas*, 2006; 55(3):219-26

44. Roccisana JL, Kawanabe N, Kajiya H, Koide M, Roodman GD, Reddy SV: Functional Role of Heat Shock Factors in the Transcriptional Regulation of Human RANK Ligand Gene Expression in Stromal/Osteoblast Cells. *J Biol Chem* 279(11):10500-7, 2004;
45. Teskač K: Pogostost polimorfizmov v promotorju gena TNFSF11 in njihova povezanost z mineralno kostno gostoto pri Slovencih. Diplomsko delo 2006; FFA
46. Mencej S, Albagha O ME Preželj J, Kocjan T, Marc J: Tumor necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of Molecular Endocrinology* (2008)40,273-279

PRILOGA1

Pregled eksperimentalnih rezultatov merjenja serumskih koncentracij OPG, RANKL, izračunane vrednosti razmerja RANKL/OPG in genotipi za polimorfizma -643C>T in -693 G>C pri 114 bolnikih okuženih s HIV, ki so bili vključeni v raziskavo.

Št. DNA vzorca	Št. serumskega vzorca	sRANKL v serumu (konc. v pmol/l)	OPG v serumu (konc. v pmol/l)	sRANKL / OPG	643C>T	693G>C
1194	1	0,03	6,91	0,0043	TT	CC
1216	2	0,10	6,62	0,0151	CT	GC
1154	3	0,03	6,88	0,0044	CT	GC
1212	4	0,02	4,23	0,0047	CC	GG
1196	5	0,07	3,42	0,0205	CT	GC
1166	6	0,01	4,97	0,0020	CC	GG
1161	7	0,02	10,02	0,0020	CT	GC
1252	8	0,02	5,54	0,0036	CT	GC
1198	9	0,02	3,78	0,0053	CT	CC
1189	10	0,10	2,29	0,0437	CT	GC
1246	11	0,06	3,48	0,0172	CT	GC
1167	12	0,06	5,33	0,0113	CT	GC
1238	13	0,03	5,28	0,0057	CT	GC
1254	14	0,02	5,72	0,0035	CT	GC
1220	15	0,03	3,80	0,0079	CC	GG
1182	16	0,02	5,95	0,0034	TT	CC
1180	17	0,04	8,21	0,0049	TT	CC
1181	18	0,11	3,05	0,0361	CC	GG
1188	19	0,07	5,63	0,0124	CT	GC
1155	20	0,07	3,44	0,0203	TT	CC
1223	21	0,12	5,23	0,0229	CT	GC
1195	22	0,18	1,66	0,1084	CT	GC
1153	23	0,00	5,29	0,0000	CT	GC
1253	24	0,00	5,25	0,0000	CC	GG
1187	25	0,04	2,90	0,0138	CC	GG
1177	26	0,00	3,99	0,0000	CT	GC
1185	27	0,00	4,70	0,0000	CC	GC
1221	28	0,16	3,70	0,0432	CT	CC
1217	29	0,00	3,83	0,0000	TT	CC
1176	30	0,03	2,88	0,0104	CT	GC
1192	31	0,02	3,91	0,0051	CT	GC

Št. DNA vzorca	Št. serumskega vzorca	sRANKL v serumu (konc. v pmol/l)	OPG v serumu (konc. v pmol/l)	sRANKL / OPG	643C>T	693G>C
1239	32	0,00	3,98	0,0000	TT	CC
1226	33	0,35	2,26	0,1549	CT	GC
1219	34	0,23	4,37	0,0526	CT	GC
1259	35	0,15	3,73	0,0402	TT	CC
1179	36	0,15	3,84	0,0391	CC	GG
1231	37	0,13	4,72	0,0275	CT	GC
1241	38	0,00	4,11	0,0000	CT	GC
1249	39	0,10	5,81	0,0172	CT	GC
1214	40	0,08	5,38	0,0149	CT	GC
1255	41	0,27	3,10	0,0871	TT	CC
1160	42	0,08	2,98	0,0268	CC	GG
1164	43	0,10	2,93	0,0341	CC	GG
1158	44	0,06	3,56	0,0169	CT	GC
1243	45	0,15	3,70	0,0405	CT	GC
1162	46	0,15	4,65	0,0323	TT	CC
1191	47	0,13	3,42	0,0380	CC	GG
1184	48	0,24	3,81	0,0630	TT	CC
1170	49	0,05	2,96	0,0169	TT	CC
1200	50	0,10	2,86	0,0350	CT	GC
1186	51	0,11	4,18	0,0263	TT	CC
1205	52	0,08	2,61	0,0307	CT	GC
1183	53	0,08	4,00	0,0200	CC	GG
1151	54	0,08	4,23	0,0189	CC	GG
1201	55	0,17	4,40	0,0386	CT	GC
1207	56	0,08	3,70	0,0216	CT	GC
1236	57	0,27	3,34	0,0808	TT	CC
1233	58	0,10	6,41	0,0156	CT	GC
1206	59	0,11	2,39	0,0460	CT	GC
1175	60	0,10	3,64	0,0275	CC	GG
1190	61	0,08	3,95	0,0203	CT	GC
1218	62	0,24	5,60	0,0429	CT	GC
1234	63	0,21	2,90	0,0724	CT	GC
1171	64	0,08	3,39	0,0236	CC	GG
1199	65	0,06	6,65	0,0090	CT	GC
1215	66	0,10	3,12	0,0321	CT	GC

Št. DNA vzorca	Št. serumskega vzorca	sRANKL v serumu (konc. v pmol/l)	OPG v serumu (konc. v pmol/l)	sRANKL / OPG	643C>T	693G>C
1247	67	0,19	2,77	0,0686	TT	CC
1178	68	0,18	3,37	0,0534	CT	GC
1211	69	0,08	4,42	0,0181	CT	GC
1250	70	0,13	4,42	0,0294	CC	GG
1229	71	0,21	6,08	0,0345	TT	CC
1248	72	0,03	6,53	0,0046	CC	GG
1173	73	0,10	3,76	0,0266	CC	GC
1244	74	0,08	4,27	0,0187	CT	GC
1237	75	0,10	4,68	0,0214	CT	GC
1193	76	0,06	5,46	0,0110	TT	CC
1240	77	0,08	7,73	0,0103	TT	CC
1251	78	0,06	3,15	0,0190	CC	GG
1232	79	0,27	2,47	0,1093	TT	CC
1235	80	0,13	2,99	0,0435	CT	GC
1203	81	0,08	5,47	0,0146	CT	GC
1209	82	0,08	2,12	0,0377	CT	GC
1165	83	0,31	4,19	0,0740	TT	CC
1197	84	0,18	3,19	0,0564	CT	CC
1204	85	0,19	4,03	0,0471	CC	GG
1245	86	0,23	4,00	0,0575	CT	GC
1225	87	0,11	3,24	0,0340	CT	GC
1258	88	0,10	1,07	0,0935	CC	GG
1169	89	0,05	4,78	0,0105	CT	GC
1174	90	0,08	5,09	0,0157	TT	CC
1159	91	0,18	4,35	0,0414	CT	GC
1228	92	0,33	4,89	0,0675	CT	GC
1263	93		4,88		CC	GG
1163	94		2,39		CT	GC
1265	95		4,61		CC	GG
1152					CT	GC
1156					TT	CC
1157					CC	GG
1168					CC	GG
1172					TT	CC
1202					CC	GG

Št. DNA vzorca	Št. serumskega vzorca	sRANKL v serumu (konc. v pmol/l)	OPG v serumu (konc. v pmol/l)	sRANKL / OPG	643C>T	693G>C
1208					TT	CC
1210					CT	GC
1213					CT	GC
1222					CT	GC
1224					CC	GG
1227					TT	CC
1230					CT	GC
1242					CT	GC
1256					CT	GC
1257					CT	GC
1262					TT	CC
1264					TT	CC
1267					CC	GG