

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MILICA TUCAKOV

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV -670G>C V GENU *RANK* IN SP1 V GENU
COLIA1 Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI
KOSTNE PREMENE**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS -670G>C IN *RANK* GENE AND SP1 IN
COLIA1 GENE WITH BONE MINERAL DENSITY AND BIOCHEMICAL
MARKERS OF BONE TURNOVER**

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm. Meritve mineralne kostne gostote in biokemijskih kazalcev kostne premene so opravili na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, v Splošni bolnišnici Celje, v Ambulanti za osteoporozo Zdravilišča Dolenjske Toplice in v Univerzitetnem Kliničnem centru v Mariboru.

Zahvala

V prvi vrsti gre zahvala izr. prof. dr. Janji Marc za njeno potrežljivost, vzpodbune besede in mnoge koristne nasvete. Posebna zahvala gre somentorici asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, ki me je skrbno vodila skozi laboratorijsko delo, me spodbujala in pomagala premagati vse ovire pri delu. Prav tako bi se rada zahvalila vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo, ki so mi vedno priskočili na pomoč, ko je bilo to potrebno.

Veliko zahvalo si zaslužijo moji domači in prijatelji, ki smo mi pomagali prebroditi vse težke trenutke. Hvala Gregorju za neomajno razumevanje, pomoč in podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm.

Ljubljana, junij 2009

Milica Tucakov

predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag.farm.
članica diplomske komisije: doc. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag.farm.

KAZALO

KAZALO	i
POVZETEK.....	iii
SEZNAM OKRAJŠAV.....	v
SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC	vi
UVOD	1
I. KOSTNA PREMENA	1
1.1. Ciklus kostne premene	1
1.2. Dejavniki, ki vplivajo na kostno premeno	2
II. OSTEOPOROZA	3
1.1. Etiopatogeneza osteoporoze	4
1.2. Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze	5
1.3. Prevalenca osteoporoze	6
2. GENETIKA OSTEOPOROZE	6
3. DIAGNOSTIKA OSTEOPOROZE	8
3.1. Dvoenergijska rentgenska absorpciometrija	8
3.2. Ostale metode	9
3.3. Druge klinične in laboratorijske preiskave	9
4. BIOKEMIJSKI KAZALCI KOSTNE PREMENE	9
4.1. Kazalci kostne tvorbe	10
4.2. Kazalci kostne razgradnje	11
4.3. Dejavniki, ki uravnavajo delovanje osteobalistov in osteoklastov	12
5. ZDRAVLJENJE OSTEOPOROZE	12
5.1. Zdravila, ki zmanjšujejo kostno razgradnjo z zaviranjem nastanka osteoklastov	12
5.2. Zdravila, ki vplivajo na kostno izgradnjo s stimulacijo osteoblastov	13
5.3. Pripravki za izboljšanje kalcijeve bilance	14
III. SISTEM RANKL/RANK/OPG	15
1. ZNAČILNOSTI IN DELOVANJE SISTEMA RANKL/RANK/OPG	15
2. VLOGA SISTEMA RANKL/ RANK/OPG PRI RAZVOJU OSTEOPOROZE	16
2.1. Vloga sistema RANKL/RANK/OPG v osteoklastogenezi	16
2.2. Vloga sistema RANKL/RANK/OPG v osteoklastogenezi preko imunskega sistema	17
3. URAVNAVANJE DELOVANJA SISTEMA RANKL/RANK/OPG	18
4. RANK	19
4.1. Molekularna genetika RANK	20
4.2. Študija povezanosti polimorfizma -670G>C v genu RANK	21
4.3. Funkcijska analiza polimorfizma -670G>C v genu RANK	21
IV. KOLAGEN TIP 1 α 1 (COLIA1)	21
1. STRUKTURA IN BIOSINTEZA KOLAGENA	22
2. COLIA1	23
2.1. Študije povezanosti polimorfizma Sp1 v genu COLIA1	23
2.2. Funkcijska analiza polimorfizma Sp1 v genu COLIA1	24
NAMEN DELA.....	25
MATERIALI IN METODE	26
1. PREISKOVANCI	26
2. IZOLACIJA DNA	28
3. OCENA KOLIČINE IN KVALITETE IZOLIRANE DNA	30
3.1. Preverjanje velikosti in kvalitete izolirane DNA	30

3.2. Preverjanje čistosti izolirane DNA.....	32
4. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	33
4.1. PCR v realnem času	34
4.1.1. Detekcija produktov PCR v realnem času.....	34
4.1.2. Mehanizem detekcije produktov PCR s sondami TaqMan®	35
4.1.3 Uporaba sond TaqMan® za alelno diskriminacijo - genotipizacijo.....	36
5. GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA -670G>C v GENU RANK.....	36
5.1. Pomnoževanje dela promotorja RANK.....	36
5.2. Analiza polimorfizma -670G>C z RFLP	38
5.3. Analiza vezave potencialnih transkripcijskih faktorjev v promotorju RANK	41
6. GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA Sp1 V GENU COLIA1	42
6.1. Pomnoževanje odseka introna 1 COLIA1	42
6.2. Detekcija produktov PCR v realnem času.....	44
7. STATISTIČNE METODE	44
7.1. Primerjava frekvenc genotipov	44
7.2. Normalnost porazdelitve spremenljivk	44
7.3. Analiza variance enega faktorja (ANOVA) in analiza kovariance (ANCOVA)	45
REZULTATI IN RAZPRAVA	46
I. OPTIMIZACIJA POSTOPKA GENOTIPIZACIJE.....	46
1. IZOLACIJA DNA.....	46
2. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	46
3. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV IN DOLOČANJE GENOTIPOV	48
4. GENOTIPIZACIJA S SONDAMI TAQMAM®	50
II. UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMOV	52
III. OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV Z MINERALNO KOSTNO GOSOTO IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE	53
1. POMENOPAVZNE PREISKOVANKE.....	53
1.1. Zdrave preiskovanke	54
1.2. Osteoporozne bolnice	55
2. PREMENOPAVZNE PREISKOVANKE	57
3. MOŠKI	58
4. FARMAKOGENETSKA ANALIZA	59
4.1. Farmakogenetika pri zdravljenju z raloksifenom.....	60
4.2. Farmakogenetika pri zdravljenju z alendonatom	61
ZAKLJUČEK.....	63
LITERATURA	66
PRILOGE	72

POVZETEK

Kostnina se celo življenje tvori in razgrajuje v procesu kostne premene, kar ohranja okostje močno in prožno. Neravnovesje med kostno tvorbo in kostno razgradnjo lahko pripelje do različnih kostnih bolezni, npr. osteoporoze, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota (MKG), porušena mikroarhitektura kostnega tkiva in večje tveganje za zlom. Danes je eden izmed pomembnejših izzivov v medicini ta, kako prepoznati posamezni s povečanim tveganjem za osteoporozo, še preden pride do zloma ali prekomerne izgube kostne mase.

Raziskave kažejo, da je sistem RANKL/RANK/OPG eden pomembnejših lokalnih dejavnikov, ki uravnavajo kostno premeno. Po vezavi RANKL na RANK pride do diferenciacije in aktivacije osteoklastov ter prekomerne kostne razgradnje, ki je značilna za osteoporozo in nekatere druge presnovne bolezni kosti. *COLIA1* je gen, ki kodira $\alpha 1$ -verigo kolagena tipa I, ki predstavlja 90 % organskega matriksa v kostnini. Kolagenska vlakna omogočajo prožnost kosti, nanje pa se nalagajo minerali, ki dajejo kostnemu tkivu trdnost. Ker je okrog 85% sprememb v MKG gensko pogojenih, raziskovalci intezivno iščejo kandidatne gene za osteoporozo. Preučevani polimorfizmi bi lahko imeli pomen kot genetski dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze ter bi lahko bili uporabni kot genetični označevalci pri posredni diagnostiki bolezni in kot tarča za načrtovanje novih zdravil za zdravljenje osteoporoze.

V naši raziskavi, v katero smo vključili 721 preiskovancev iz različnih centrov po Sloveniji, smo proučili povezanost polimorfizmov -670G>C v promotorju gena *RANK* in Sp1 v intronu gena *COLIA1* z MKG in sledečimi biokemijskimi kazalci kostne premene: osteokalcin, kostna alkalna fosfataza, C-terminalni telopeptid, RANKL, OPG, katepsin K in deoksipiridinolin. Preverili smo tudi, ali sta preiskovana polimorfizma povezana z odzivnostjo na zdravljenje osteoporoze z raloksifenom in alendronatom. DNA smo izolirali iz levkocitov periferne venske krvi z metodo izsoljevanja proteinov po modifciranim Millerjevem postopku. Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnožili odsek promotorja *RANK*, nato pa z analizo polimorfizmov dolžin restriktijskih fragmentov (RFLP) določili genotip preiskovancev. Nadalje smo z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času pomnožili odsek introna *COLIA1* ter z uporabo sond TaqMan[®] določili genotip preiskovancev.

V primeru polimorfizma -670G>C smo z analizo RFLP ugotovili prisotnost restriktijskega mesta le pri 6 preiskovancih, ki so imeli genotip GC. Frekvenca genotipa GC je torej 0,8 % in za kavkazijce še ni bila objavljena. Frekvence proučevanega polimorfizma -670G>C se porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem. Po primerjavi podatkov za vseh šest preiskovancev nismo našli korelacije med polimorfizmom -670G>C v genu *RANK* in MKG, saj je imelo vseh šest preiskovancev MKG primerljivo z MKG drugih preiskovancev.

Frekvence proučevanega polimorfizma Sp1 v genu *COLIA1* pri Slovencih se porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem. Podobne so v vseh skupinah preiskovancev in so v razmerju 62% : 32% : 6% za genotipe GG : GT : TT. V naši raziskavi smo dokazali povezanost med polimorfizmom Sp1 in zvišano MKG kolka pri pomenopavznih osteoporoznih bolnicah ($p=0,038$) ter znižano MKG kolka pri premenopavznih preiskovankah ($p=0,038$). Prav tako smo dokazali povezanost polimorfizma Sp1 z znižano MKG ledvenih vretenc pri moških ($p=0,016$). Nadalje smo dokazali povezanost polimorfizma Sp1 s povišano serumsko koncentracijo RANKL pri pomenopavznih osteoporoznih bolnicah ($p=0,043$). Ugotovili smo, da prisotnost polimorfizma Sp1 statistično značilno vpliva na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom, saj se je po enoletnem zdravljenju z raloksifenom statistično značilno najmanj zmanjšala vrednost osteokalcina v serumu ($p=0,031$). Pri preiskovancih, ki so se zdravili z alendronatom, se je po enem letu zdravljenja statistično značilno povečala MKG kolka ($p=0,029$).

Naša raziskava se pridružuje tistim, ki so dokazale povezanost med polimorfizmom Sp1 in MKG. Rezultati raziskav potrjujejo polimorfizem Sp1 v genu *COLIA1* kot genetski označevalci za razvoj osteoporoze. Tako lahko prepoznamo posameznike s povečanim tveganjem za osteoporozo še preden pride do zloma ali prekomerne izgube kostne mase. Prav tako bi lahko služil za prepoznavo tistih osteoporoznih bolnikov, ki bi se bolje odzivali na zdravljenje z določenim zdravilom za osteoporozo.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALT	alanin aminotransferaza
AST	aspartat aminotransferaza
bp	bazni par
ELISA	encimsko imunski test na trdnem nosilcu
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IU	mednarodna enota (angl. international units)
IGF	inzulinski rastni dejavnik
IL	interlevkin
INF	interferon
PGE	prostaglandin
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat
PTH	parathormon
RIA	radioimunski test
TAE	tris-acetat-EDTA
TGF	transformirajoči rastni faktor
TNF	dejavnik tumorske nekroze
TSH	ščitnico stimulirajoč hormon

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1	Ciklus kostne premene
Slika 2	Primerjava med normalno in osteoporozno kostjo
Slika 3	Spreminjanje kostne mase s starostjo
Slika 4	Bisfosfonati
Slika 5	Osteoklastogeneza
Slika 6	Vloga sistema RANKL/RANK/OPG v osteoklastogenezi
Slika 7	Zgradba gena <i>RANK</i> in polimorfizem -670 G>C
Slika 8	Biosinteza kolagena
Slika 9	Zgradba gena <i>COLIA1</i> in polimorfizem Sp1
Slika 10	Potek reakcije PCR
Slika 11	Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s sondami TaqMan®
Slika 12	Optimizacija količine MgCl ₂ pri reakciji PCR
Slika 13	Elektroforeza produktov PCR na 2% agaroznem gelu z vgrajenim etidjevim bromidom
Slika 14	Sekundarni PCR
Slika 15	Elektroforeza produktov cepitve z encimom Eco0109I
Slika 16	Elektroforeza produktov cepitve z encimom BsaHI
Slika 17	Avtomatski pipetor EVO®75 in ciklični pomnoževalnik LightCycler®480
Slika 18	Rezultat genotipizacije s sondami TaqMan®
Slika 19	Razpršeni prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan®

Preglednica I	Sistemski in lokalni dejavniki kostne premene
Preglednica II	Definicija osteoporoze na osnovi meritev MKG
Preglednica III	Notranji in zunanji dejavniki tveganja za osteoporozo
Preglednica IV	Najbolj proučevani kandidatni geni za osteoporozo
Preglednica V	Predstavniki sistema RANKL/RANK/OPG
Preglednica VI	Dejavniki, ki vplivajo na izražanje RANKL in OPG
Preglednica VII	Razdelitev preiskovancev v skupine in podskupine
Preglednica VIII	Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov v skupini premenopavznih in pomenopavznih preiskovank ter moških preiskovancev
Preglednica IX	Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov v skupini osteoporoznih bolnic, ki so se zdravile z raloksifenom in alendronatom

Preglednica X	Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje odseka promotorja <i>RANK</i>
Preglednica XI	Pogoji za pomnoževanje odseka promotorja <i>RANK</i>
Preglednica XII	Sestava reakcijske zmesi za analizo RFLP
Preglednica XIII	Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje odseka introna <i>COLIA1</i>
Preglednica XIV	Pogoji za pomnoževanje odseka introna <i>COLIA1</i>
Preglednica XV	Korelacija med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA
Preglednica XVI	Določitev genotipa preiskovanca na podlagi analize RFLP
Preglednica XVII	Vrednosti izmerjenih parametrov za heterozigote za polimorfizem -670G>C v genu <i>RANK</i>
Preglednica XVIII	Frekvence posameznih genotipov za <i>COLIA1</i> Sp1 polimorfizem
Preglednica XIX	Povprečne vrednosti MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah
Preglednica XX	Povprečne vrednosti MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah
Preglednica XXI	Povprečne vrednosti MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih osteoporoznih bolnicah
Preglednica XXII	Povprečne vrednosti MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah
Preglednica XXIII	Povprečne vrednosti MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških
Preglednica XXIV	Povprečne vrednosti spremembe MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih bolnicah, ki so se zdravile z raloksifenom
Preglednica XXV	Povprečne vrednosti spremembe MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih bolnicah, ki so se zdravile z alendronatom

UVOD

I. KOSTNA PREMENA

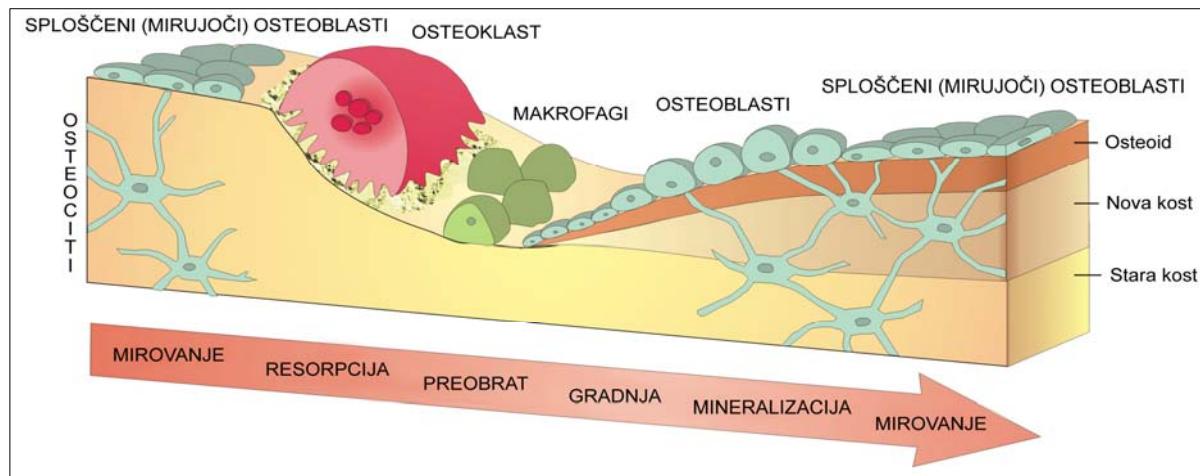
Kostnina se pod vplivom hormonov, mehaničnih in drugih dejavnikov neprestano obnavlja in se celo življenje nahaja v ravnotežju tvorbe in razgradnje. Proces imenujemo kostna premena oz. kostna remodelacija. Sestavljata jo proces razgradnje kostnine z osteoklasti in proces tvorbe nove kostnine z osteoblasti.

Proces tvorbe kostnine traja približno 3 mesece, razgradnja pa le nekaj dni in v tem obdobju se zamenja približno $10,6 \text{ mm}^3$ kostnine. V eni od faz kostne premene je 35 milijonov kostnih remodelacijskih enot (angl. bone remodeling unit, BRU), kar predstavlja približno 10% kostnine (1, 2).

1.1. Ciklus kostne premene

Ciklus kostne premene obsega več stopenj. Večina kostnine je v *mirujoči fazi*, v kateri pokrivajo kostno površino sploščeni, mirujoči osteoblasti. Le-ti se v *fazi razgaljenja* skrčijo in razgalijo kostno površino. *Faza aktivacije* se prične se s fokalnim privabljanjem prekurzorjev osteoklastov v območja, kjer bo potekala razgradnja. Prekurzorske monojederne celice se zlijejo v večjederne preosteoklaste, ki nadalje dozorijo v osteoklaste, ki so na kostni matriks pritrjeni preko osteopontina. Obseg in hitrost razgradnje kostnine sta odvisna od števila aktiviranih mest (BRU) na kostni površini. Proces zorenja osteoklastov regulirajo lokalni in sistemski dejavniki. *Faza kostne razgradnje* traja 4 do 12 dni. Osteoklasti tvorijo številne prstaste citoplazmatske podaljške in na ta način povečajo resorpcijsko površino. Citoplazma osteoklasta vsebuje, še zlasti med nagubano površino in jedri, številne lisosome, ki vsebujejo kislo fosfatazo in karboanhidrazo. Karboanhidraza tvori H^+ ione, ki se s pomočjo protonskih črpalk prenašajo na površino prstastih podaljškov ter zagotavljajo kislo okolje na mestu razgradnje (pH 4,5). Zaradi kislega okolja se hidroksiapatit raztopi, kolagenska vlakna pa so tako izpostavljena proteolizi, ki jo vršita tartrat rezistentna kisla fosfataza (TRAP, angl. tartrate resistant acid phosphatase) in katepsin K. Pri tem procesu nastane vdolbina, imenovana Howshipova lakuna. Razgradni produkti se v osteoklastih predelajo in izločijo v krvni obtok. V *fazi preobrata* gredo osteoklasti v proces apoptoze in za seboj pustijo prazne

Howshipove lakune, ki jih počistijo mononuklearni fagociti in obložijo s cementno plastjo, ki je bogata s proteoglikani. V tako očiščene Howshipove lakune pritegnejo sklopitveni signali osteoblaste. *V fazi tvorbe novega osteoida* aktivni, izoprizmatski osteoblasti zapolnijo lakuno z osteoidom - organskim delom kostne medceličnine, ki je zgrajen iz lamelarno razvrščenega kolagena. Količina novo nastale nemineralizirane kosti je odvisna od števila in aktivnosti osteoblastov.



Slika 1: Ciklus kostne premene

Nekaj dni kasneje se prične *faza mineralizacije*, ko začnejo osteoblasti izločati alkalno fosfatazo, ki poveča lokalno koncentracijo kalcijevih in fosfatnih ionov. Le-ti tvorijo kristale hidroksiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ki se povežejo s kolagenskimi vlakni, kar zagotavlja trdnost in odpornost kostnine. Pri mineralizaciji sodelujejo tudi drugi proteini organskega matriksa - osteokalcin (kostni Gla protein), ki ga tvorijo izključno osteoblasti in veže kalcijeve ione, ter osteonektin. Po končani mineralizaciji se aktivni osteoblasti ujamejo v matriks, ki so ga sintetizirali, se obdajo z medceličnino in preoblikujejo v osteocite. Kljub temu, da imajo zmanjšano sintetsko aktivnost, so osteociti preko različnih mehanosenzoričnih mehanizmov vključeni v kostno premeno. Med procesom mineralizacije se osteoblasti sploščijo in po končani mineralizaciji prekrijejo novo nastalo kostnino, ki preide v fazo mirovanja (Slika 1) (1).

1.2. Dejavniki, ki vplivajo na kostno premeno

Na dinamiko kostne premene vpliva več dejavnikov. Bistveno vlogo igrajo hormoni in lokalni mediatorji, npr. citokini in rastni dejavniki, ki uravnavajo komunikacijo med osteoklasti in osteoblasti (Preglednica I) (1, 2).

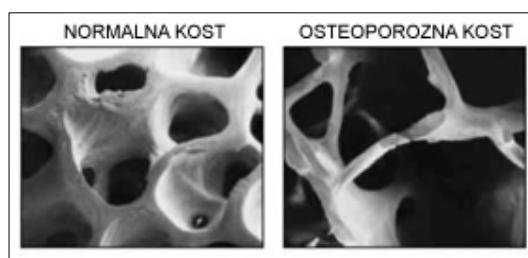
Preglednica I: Sistemski in lokalni dejavniki kostne premene (\uparrow pomeni ojačanje, \downarrow pomeni zaviranje)

HORMONI	TVORBA KOSTNINE	RAZGRADNJA KOSTNINE	LOKALNI DEJAVNIKI	TVORBA KOSTNINE	RAZGRADNJA KOSTNINE
estrogeni, androgeni	\uparrow	\downarrow	IGF I in II	\uparrow	
PTH	\uparrow	\uparrow	TGF β	\uparrow	
vitamin D	\uparrow	\uparrow	BMP	\uparrow	
rastni hormon	\uparrow		PDGF	\uparrow	
tiroksin		\uparrow	aFGF in bFGF	\uparrow	
kalcitonin		\downarrow	PGE2	\uparrow	\uparrow
glukokortikoidi	\downarrow	\downarrow	IL-1	\downarrow	\uparrow
inzulin	\uparrow		IL-6, 11		\uparrow
			TNF α in TNF β		\uparrow
			CSF		\uparrow
			INF γ		\downarrow
			IL-4		\downarrow

II. OSTEOPOROZA

1. DEFINICIJA OSTEOPOROZE

Osteoporoza je večfaktorska sistemska skeletna bolezen, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota, porušena mikroarhitektura kostnega tkiva in, kot posledica, povečana lomljivost kosti ter večje tveganje za zlom. Osteoporozni zlomi so posledica strukturnih kostnih sprememb, saj se trabekule tanjšajo, fenestrirajo in nato izginejo, prostori med trabekulami pa se večajo (Slika 2). Tako pride do zloma že ob padcu s stojne višine ali ob blagi obremenitvi. Zlomi najpogosteje prizadanejo zapestje, vretenca in kolk (3).



Slika 2: Primerjava med normalno in osteoporozno kostjo

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne kostne gostote (MKG, angl. bone mineral density - BMD). Izmerjeno vrednost mineralne kostne gostote izrazimo tudi kot T-vrednost, ki predstavlja MKG preiskovanca, izraženo kot število standardnih deviacij (SD) nad ali pod povprečno MKG vrednostjo zdravih oseb v zgodnji odrasli dobi (Preglednica II) (3).

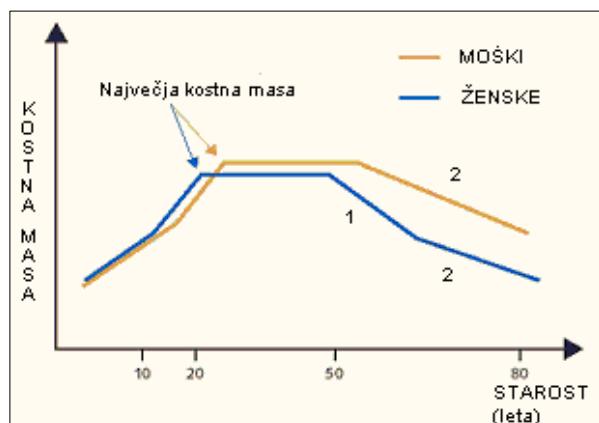
Preglednica II: Definicija osteoporoze na osnovi meritev MKG

T-VREDNOST	DEFINICIJA
< -2,5 + zlomi	huda oz. napredovana osteoporoza
< -2,5	osteoporoza
od -2,5 do -1	osteopenija
> -1	normalna MKG

1.1. Etiopatogeneza osteoporoze

V obdobju rasti se velikost skeleta in količina kostne mase povečujeta. Do 30. leta starosti je dosežena največja kostna masa oz. maksimalna kostna masa (PBM, angl. peak bone mass). Največja kostna masa je merilo, ki omogoča napoved o možnem nastanku osteoporoze in o pojavu posledic. Če je nizka, lahko celo neznatna izguba kostne mase privede do zloma, visoka vrednost pa varuje pred osteoporozo (3).

Od 30. do 40. leta starosti sta tvorba in razgradnja kostnine uravnotežena, nato pa sledi



postopna razgradnja kostnine, ki ustreza fiziološkemu procesu staranja (Slika 3). Vzrok za manjšanje kostne mase po 40. letu je neravnovesje med razgradnjo in tvorbo nove kosti. Rezultat nezadostne tvorbe kostnine kot odziv na prekomerno razgradnjo kostnine je zmanjšana količina kostne mase in porušenje mikroarhitekture okostja.

Slika 3: Spreminjanje kostne mase s starostjo (izguba kostne mase 1: med menopavzo, 2: s starostjo).

Pri ženskah se količina kostne mase zmanjša bolj kot pri moških, saj je zaradi menopavze izguba kostne mase nekaj let intenzivnejša. Glavni vzrok za menopavzno izgubo kostne mase je izrazito pomanjkanje spolnih hormonov estrogenov, ki so močni zaviralci razgradnje kostnine. Za razvoj osteoporoze pri moških je pomembno postopno zmanjševanje sekrecije androgenov iz testisov in nadledvičnih žlez (4).

Raziskovalci domnevajo, da je največja kostna masa v 50 do 80% odvisna od genske zasnove, kar so pokazale študije na eno- in dvojajčnih dvojčkih (5). Na največjo kostno maso lahko

vplivajo tudi spolni hormoni ter negenetski dejavniki, kot so pomanjkanje telesne dejavnosti in kalcija v prehrani, daljša obdobja amenoreje in različne kronične bolezni.

1.2. Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze

Glede na vzroke za nastanek osteoporoze lahko ločimo dve veliki skupini osteoporoze: primarno in sekundarno. *Pomenopavzna osteoporoza (osteoporoza tipa 1)* se pojavi pri ženskah med 50. in 70. letom starosti, in sicer zaradi povečane resorpcije in zmanjšane tvorbe kostnine zaradi pomanjkanja estrogenov. *Senilna osteoporoza (osteoporoza tipa 2)* se pojavi v visoki starosti, nad 70 let. V tem obdobju je kostna premena počasnejša, ta tip osteoporoze pa zajame v večjem številu tudi moške. Sekundarna osteoporoza je običajno posledica druge osnovne bolezni ali dokazljivih negativnih vplivov na presnovo kosti, kot so jemanje nekaterih zdravil, odvisnost od alkohola in imobilizacija (4).

Notranji in zunanji dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze so podani v Preglednici III. Učinek zunanjih dejavnikov je na splošno manjši kot učinek notranjih, vendar so pomembni, saj nanje lahko vplivamo in s tem sami zmanjšamo tveganje za osteoporozo (3, 4).

Preglednica III: Endogeni in zunanji dejavniki tveganja za osteoporozo

NOTRANJI DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OSTEOPROZO		
bela rasa	zgodnja menopavza	zapozneta puberteta
starost	amenoreja pred menopavzo	drobna konstitucija
dednost	nekatere oblike raka - <i>kostni tumorji in kostne metastaze</i>	predhodni zlom
ženski spol	razne bolezni - <i>hipertiroza, hipogonadizem, hiperparatiroidizem, vnetje črevesne sluznice</i>	imobilizacija zaradi bolezni ali poškodb
dolgotrajno jemanje nekaterih zdravil - <i>kortikosteroidi, imunosupresivi, antiepileptiki, heparin, antacidi</i>	stanje po presaditvi organov	
ZUNANJI DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OSTEOPROZO		
nepravilna prehrana, škodljive navade: - <i>nezadosten vnos kalcija</i> - <i>velik vnos kofeina, soli, beljakovin</i> - <i>kajenje, prekomerno uživanje alkohola</i>	neprimerna in nezadostna telesna aktivnost: - <i>negativen vpliv na vrednost največje kostne mase</i>	nezadostna izpostavljenost soncu: - <i>UV žarki so potrebni za sintezo vitamina D v koži</i>

1.3. Prevalenca osteoporoze

Osteoporoza je najpogosteja metabolna bolezen kosti. Je predvsem bolezen starejših žensk, saj je do 70. leta starosti šestkrat pogosteja pri ženskah kot pri moških, po 70. letu pa je pogosta tudi pri moških. Osteoporoza postaja zaradi svojih zapletov, osteoporoznih zlomov, eden glavnih zdravstvenih problemov razvitih družb. Pričakovana življenska doba tistih, ki so utrpteli osteoporozni zlom vretenca ali kolka, je krajša kot pri ostalih. Zapleti osteoporoze so v starostni skupini od 45 do 75 let drugi, po 75. letu starosti pa najbolj pogost vzrok smrti (4).

Pred kratkim se je končala prva prevalenčna raziskava o osteoporozi v Sloveniji, v katero so vključili 509 preiskovancev. Dobrih 33% sodelujočih je imelo normalen izvid, 43% preiskovancev je imelo osteopenijo, 23% pa je že imelo osteoporozo. Prevalenca osteoporoze pri ženskah nad 50. letom je bila 27,5%, pri moških nad 60. letom pa 14,6%. S starostjo delež osteoporoze narašča, saj je bil pri ženskah nad 65. letom delež osteoporoznih bolnic 40,6%, pri moških nad 65. letom pa 16,7 %. Ti rezultati so primerljivi z ostalim svetom. Raziskovalce je zanimalo tudi, koliko preiskovancev, pri katerih so ugotovili osteoporozo, ima že postavljeno diagnozo in se zdravi. Izkazalo se je, da je ta odstotek razmeroma majhen, saj je bilo takšnih le 24,9 % preiskovancev (6).

2. GENETIKA OSTEOPOROZE

Osteoporoza je večgenska bolezen z majhnim vplivom posameznega gena. Raziskovalci pripisujejo velik pomen interakcijam gen-gen ter gen-okolje. Geni vplivajo na dejavnike, kot so največja MKG, struktura kostnega tkiva, geometrija skeleta, nivo biokemijskih kostnih kazalcev, jakost mišic ter ITM (indeks telesne mase). Geni vplivajo tudi na hitrost izgubljanja kostne mase in na nastanek osteoporoznih zlomov.

V povezavi s mineralno kostno gostoto so bili proučevani številni polimorfizmi v genskih zapisih proteinov, ki sodelujejo pri kostni premeni, vendar zaradi kompleksnosti osteoporoze preiskovalci še niso uspeli identificirati genov, ki bi zagotavljali visoko stopnjo povezanosti z osteoporozo. Strategija odkrivanja kandidatnih genov obsega asociacijske študije (študije povezanosti), študije vezanega delovanja in študije na živalih. 90% vseh študij na področju genetike osteoporoze predstavljajo asociacijske študije, pri katerih izberemo kandidatni gen in ugotavljamо povezanost genotipa (prisotnost ali odsotnost mutacije oz. polimorfizma) s

fenotipom, ki je lahko zmanjšana MKG, zlom kosti, spremenjena vrednost biokemijskih kazalcev kostne premene ali geometrija skeleta.

Kritična točka *asociacijskih študij* je že sama izbira kandidatnega gena, saj izhajamo iz trenutnega poznavanja biologije kosti in še ne poznamo vseh proteinov, ki sodelujejo pri kostni premeni. Prednost asociacijskih študij je enostavna izvedba. Pomembno je, da se študija izvaja na čimvečjem številu preiskovancev, saj lahko vplivajo na MKG tudi drugi dejavniki, kot so telesna aktivnost, velika izpostavljenost soncu, jemanje vitamina D itd. V preglednici IV so podani najbolj proučevani kandidatni geni za osteoporozo (7).

Preglednica IV: Najbolj proučevani kandidatni geni za osteoporozo

SKUPINA	KANDIDATNI GEN
1. KALCIOTROPNI HORMONI IN RECEPTORJI	receptor za vitamin D (VDR)
	estrogenski receptor (ER)
	receptor za kalcitonin
	kalcitonin
	paratiroidni hormoni
	glukokortikoidni receptor
	androgenski receptor
2. KOMPONENTE KOSTNEGA Matriksa	kolagen tipaI α1 (COLIA1)
	kolagen tipaI α 2 (COLIA2)
	osteokalcin
	osteonektin
	osteopontin
3. LOKALNI REGULATORJI	TGF- β 1
	IGF-1
	IL-1
	IL-6
	RANKL/RANK/OPG sistem
4. DRUGO	kolagenaza
	vitamin D-vezujoči protein
	PPAR δ

Veliko asociacijskih študij navaja dvomljive podatke, predvsem zaradi relativno majhnega števila preiskovancev, ki so bili vanje vključeni. Zato so zaključki teh študij pogosto v prid povezanosti preiskovanega polimorfizma z osteoporozo, česar pa študija na večjem številu preiskovancev ne pokaže. Nov pristop k genetiki osteoporoze so vsegenomske asociacijske študije (GWA, angl. genome-wide association studies), kjer analiziramo celotni genom pri nekem bolniku in povezavo genov z MKG. Takšne študije temeljijo na tehnologiji mikromrež.

Pri študijah *vezanega dedovanja* preiskujemo prisotnost mutacije pri bolnih oziroma zdravih sorodnikih različnih generacij. Težava, ki nastopi pri osteoporozi, je ta, da nimamo več generacij z eno boleznijo, saj je osteoporoza predvsem bolezen starejših ljudi. Zato je teh študij malo in na eni generaciji (mati-hči).

Pri študijah na živalih konck-out miškam izrežemo preiskovani gen in pogledamo, kako se to izrazi fenotipsko. Izhajamo iz kandidatnih genov za osteoporozo in na živalskem modelu preverimo, ali ima preiskovani gen vlogo v kostni premeni ter tako upravičimo izvedbo asociacijske študije (8).

3. DIAGNOSTIKA OSTEOPOROZE

Ker osteoporoza pred pojavom zlomov nima kliničnih znakov, temelji diagnoza bolezni na določanju znižanja mineralne kostne gostote. Čeprav zbujojo nekatere študije dvome glede prognostične vrednosti MKG, ostaja ta zaenkrat najpomembnejši napovedni dejavnik osteoporoznega zloma (9, 10). Merjenje MKG na določenem delu skeleta najbolje napove tveganje za zlom na taistem delu.

3.1. Dvoenergijska rentgenska absorpciometrija

Za merjenje MKG se najpogosteje uporablja dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (DXA, angl. dual-energy X-ray absorptiometry). Pri tej metodi uporabimo snop žarkov dveh energij, ki ga usmerimo skozi preiskovani del telesa. Prepuščeno rentgensko sevanje merimo s posebnimi senzorji, tako da lahko za vsako merjeno točko določimo količino prepuščenega sevanja. Naprave same določijo mejo kosti, zaradi uporabe rentgenskih žarkov dveh energij pa lahko izničijo vpliv mehkih tkiv. Merimo maso in gostoto celotnega skeleta, v praksi pa merimo maso in gostoto ledvenih vretenc, kolka in vratu stegnenice. Metoda je neboleča, hitra, natančna in dobro ponovljiva, sevanje pa je zanemarljivo, zato lahko meritve ponavljamo, kar izkorisčamo za spremljanje učinka zdravljenja. Mineralno kostno gostoto izmerimo od eno- do triodstotno natančno. Toliko znaša tudi najpogostejša letna izguba kostne mase, zato ni smiseln meritev ponavljati pogosteje kot na 1 do 2 leti. Kostno maso izrazimo kot mineralno kostno gostoto (MKG) v g/cm^2 ali kg/m^2 , saj s površinsko gostoto deloma zmanjšamo vpliv velikosti kosti. Izmerjeno vrednost mineralne kostne gostote izrazimo tudi kot T-vrednost (3, 11).

3.2. Ostale metode

Ultrazvočna preiskava kosti se uporablja predvsem za merjenje kostne gostote v petnici ali pogačici. Je manj preizkušena metoda kot DXA in tudi manj razširjena. Z UZ preiskavo lahko napovemo tveganje za zlom, težje pa ocenimo učinek zdravljenja osteoporoze, saj rezultati preiskave niso odvisni le od MKG, ampak predvsem od strukture kosti (3). Za odkrivanje zlomov pri osteoporozi se uporablja *rentgensko slikanje*. Nizko kostno maso je na rentgenski sliki mogoče zanesljivo ugotoviti šele, kadar je kostna gostota zmanjšana za več kot 30% ali je že prišlo do zlomov vretenc (4). V mnogih bolnišnicah so danes na razpolago *računalniški tomografi* za celo telo, ki jih lahko uporabljamo tudi za kvantitativno določanje kostne gostote ter razlikovanje med kortikalno in trabekularno kostnino.

3.3. Druge klinične in laboratorijske preiskave

Preostale klinične in laboratorijske preiskave napravimo zato, da izključimo druge bolezni, ki jih osteoporoza lahko spremlja ali posnema oz. da ugotovimo, ali je prisotna sekundarna osteoporoza in kaj je njen vzrok. Take bolezni imajo značilno klinično sliko in jih običajno ugotovimo že s kliničnim pregledom, nato pa potrdimo z določanjem koncentracije hormonov v plazmi. Vsem bolnikom določimo serumski kalcij, fosfat, alkalno fosfatazo, sečnino, kreatinin, AST, ALT, TSH, prosti testosteron (moški) ter napravimo proteinogram in hemogram. Pri primarni osteoporozi so vsi našteti kazalci v mejah normalnih vrednosti. Pomagajo nam še določitve 25-(OH) vitamina D ter PTH v serumu (3, 4).

4. BIOKEMIJSKI KAZALCI KOSTNE PREMENE

Biokemijski kazalci kostne premene so molekule v krvi ali urinu, ki nastajajo in se sproščajo tekom kostne premene. Z njihovim merjenjem ocenujemo intenzivnost kostne premene in s tem nevarnost za zlom, ravnotežje procesov tvorbe in razgradnje kostne mase ter uspešnost zdravljenja (12). Včasih nas ti kazalci usmerjajo pri izbiri zdravil in njihovih odmerkih. Določamo jih pri zapletenih oblikah osteoporoze, pred začetkom zdravljenja, med zdravljenjem pa, če želimo preveriti učinek antiresorpcijskih zdravil v času, ko spremembe v MKG še niso zaznavne. Tako lahko učinek zdravljenja osteoporoze z bisfosfonati na osnovi meritev MKG z gotovostjo ocenimo šele po dveh letih, s pomočjo določanja kazalcev kostne premene pa že po treh mesecih. Prav tako lahko pomagajo pri boljšem sodelovanju in

zadovoljstvu bolnikov. Prednost biokemičnih kazalcev so neinvazivne in poceni metode, ki jih lahko pogosto ponovimo (13).

4.1. Kazalci kostne tvorbe

Alkalna fosfataza (ALP): aktivnost ALP v serumu je vsota aktivnosti različnih izoencimov ALP. Približno 50% aktivnosti predstavljajo jetrni izoencimi, v patoloških stanjih pa pride do tvorbe tudi drugih izoencimov. Aktivnost ALP v serumu tako ni selektivni biokemijski kazalec, saj je lahko povečana, vendar ne na račun kostnega izoencima. Specifičnost metode povečamo, če določamo le izoencim kostno alkalno fosfatazo (BALP, angl. bone alkali phosphatase), ki ga ločimo z imunokemijskimi reakcijami z monoklonskimi protitelesi, ki so specifična proti kostni ALP, preostanek pa speremo in tako odstranimo ostale izoencime ter proteine v serumu. Nato izvedemo barvno reakcijo, pri kateri BALP cepi substrat (p-nitrofenilfosfat) do rumenoobarvanega produkta (p-nitrofenol). Količina nastalega produkta, ki jo določimo z absorbanco, je sorazmerna aktivnosti BALP.

Osteokalcin je kostni Gla-protein, ki ga sintetizirajo osteoblasti in je najpomembnejši nekolageni protein v kostnini. Omogoča mineralizacijo kostnega tkiva, saj lahko veže kalcijeve ione, in sicer tako, da se dva ostanka glutaminske kisline karboksilirata in vežeta kalcijev ion. Vezava je odvisna od prisotnosti vitamina K. Osteokalcin nastaja neposredno pod vplivom receptorja za vitamin D. Ta deluje kot transkripcijski faktor, ki se aktivira z ligandom, tarčni gen pa je gen za osteokalcin. Osteokalcin se deloma izloči v sistemski krvni obtok in ta količina je v ravnotežju s celotnim osteokalcinom, ki ga sintetizirajo osteoblasti. Koncentracija osteokalcina v plazmi je sorazmerna aktivnosti osteokalcina v kosti in tako sorazmerna intenziteti sinteze kolagena. Osteokalcin izmerimo s kemiluminiscenčnim encimskoimunskim testom v plazmi po dodatku heparina.

N-terminalni in C-terminalni propeptid prokolagena I (PINP in PICP) sta produkta posttranslacijske modifikacije prokolagena, in sicer cepitve propeptidov do nastanka kolagena. Tako odraža količina propeptidov v serumu intenziteto sinteze kolagena, ta pa intenziteto sinteze kostnine. PINP in PICP določam o imunokemično z ELISA ali RIA testom. Od nedavnega je na voljo avtomatizirana metoda za meritev serumske koncentracije PINP z zelo nizko variabilnostjo (<3%) (14).

4.2. Kazalci kostne razgradnje

Tartrat rezistentna kislfa fosfataza (TRAP) je lizosomalni encim, ki deluje v zelo močno kislem okolju. Izločajo ga različne celice, med njimi tudi osteoklasti, in sicer izoencim TRAP5b. Razgrajuje minerale v kostnem tkivu in omogoča nastanek resorpcijske lakune. Je edini kazalec aktivnosti osteoklastov. Koncentracija TRAP5b v serumu je sorazmerna z aktivnostjo osteoklastov in naraste, ko je povečana kostna razgradnja (osteoporoza, Pagetova bolezen, kostne metastaze, multipli mileom). TRAP določamo imunokemično (14).

Katepsin K je lizosomalni encim iz skupine proteaz, ki cepi verige kolagena tipa I in tako sodeluje v razgradnji kostnine. Koncentracijo katepsina K v serumu določamo imunokemično (ELISA). Sorazmerna je aktivnosti osteoklastov in naraste, ko je povečana kostna razgradnja (15).

Piridinolin (PYR) in deoksipiridinolin (DPYR) sta kovalentna prečna povezovalca, ki povezujeta snope kolagena. Trdnost kolagenske strukture je določena s številom prečnih povezovalcev. Med razgradnjo kolagena se sproščajo v krvni obtok in prehajajo v urin. Ker jih je v kostnem kolagenu veliko več kot drugod, jih lahko uporabljam kot biokemijske kazalce kostne razgradnje in odsevajo inteziteto razgradnje kolagena. Včasih so določali proste prečne povezovalce v urinu in serumu s HPLC, vendar je ta metoda neprimerna za rutino. Danes uporabljam bolj natančne metode tj. imunokemične metode (ELISA, RIA).

C-terminalni in N-terminalni telopeptid (CTX in NTX) sta telopeptida, ki imata še vezane prečne povezovalce. α 1 veriga CTX med staranjem β -izomerizira in racemizira, zato je razmerje α CTX/ β CTX merilo hitrosti kostne premene. α CTX predstavlja razgradnjo na novo sintetiziranega kolagena, β CTX pa starega kolagena. Razmerje se zmanjša po uporabi bifosfonatov. CTX in NTX določamo v serumu ali urinu, in sicer imunokemično z ELISA ali RIA testom ter na podlagi elektrokemiluminescence. Sta najboljša kazalca kostne razgradnje, ki se trenutno uporablja v rutini.

Telopeptid kolagena I (ICTP) in hidroksiprolin sta nespecifična kazalca kostne premene, saj sta zastopana tudi v drugih tipih kolagena in se ju ne uporablja v praksi (14).

4.3. Dejavniki, ki uravnavajo delovanje osteoblastov in osteoklastov

RANKL in OPG sta proteina osteoblastov in lokalna dejavnika, ki uravnavata kostno premeno. OPG s prestrezanjem RANKL preprečuje njegovo vezavo na RANK in s tem zavira osteoklastogenezo. RANKL in OPG določamo v serumu, in sicer imunokemično (ELISA). Višja serumska koncentracija RANKL in nižja serumska koncentracija OPG sta sorazmerna pospešeni osteoklastogenezi (15).

5. ZDRAVLJENJE OSTEOPOROZE

Cilj zdravljenja osteoporoze je preprečiti oz. zmanjšati število zlomov. Zdravila za zdravljenje osteoporoze delujejo kot pospeševalci tvorbe nove kosti ali zaviralcii njene razgradnje.

5.1. Zdravila, ki zmanjšujejo kostno razgradnjo z zaviranjem nastanka osteoklastov

- estrogeni
- modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM)
- kalcitonin
- bisfosfonati

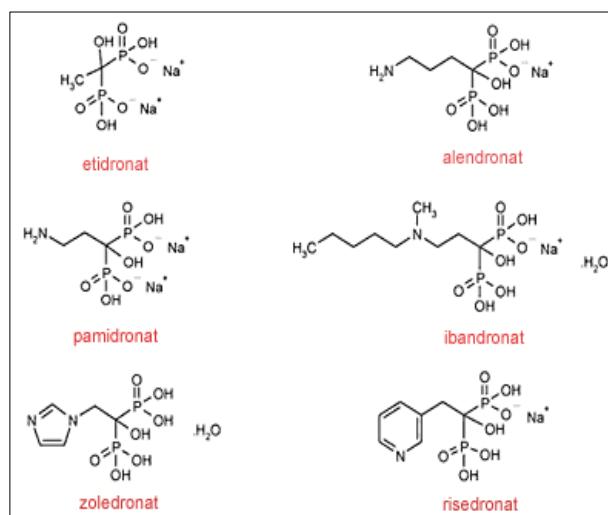
Nadomeščanje estrogenov (*hormonsko nadomestno zdravljenje - HNZ*) takoj po menopavzi prepreči nastanek osteoporoze ali pa jo premakne v kasnejše življensko obdobje. Tako skrajšamo čas, ko je še verjetno, da se bo kostna masa znižala do te meje, da bo osteoporoza tudi klinično izrazita. Estrogene lahko uporabimo tudi kot zdravilo pri že razviti osteoporozi v starejšem življenskem obdobju. Izkoristišamo njihovo lastnost, da zavirajo resorpcijo kosti in tako zvečajo kostno maso na vseh delih okostja.

Za zdravljenje osteoporoze se uporablja tudi učinkovine, ki kompetitivno zavirajo delovanje estrogenov na dojke in maternico, na kost in metabolizem lipidov pa delujejo enako kot estrogeni. Najbolj znana zdravilna učinkovina iz te skupine je *raloksifen*, ki ga uvršamo med *selektivne modulatorje estrogenskih receptorjev (SERM)*. Raloksifen zmanjšuje razgradnjo kostnine in tveganje za vertebralne zlome (zlome vretenc), ne pa tudi za nevertebralne zlome.

Naravni in sintezi *kalcitonin* zavira razgradnjo kostnine, tako da preprečuje nastajanje osteoklastov in zmanjša njihovo delovanje. Zdravljenje s kalcitoninom zviša MKG vretenc in

kolka. Protibolečinsko delovanje kalcitonina preko centralnega živčnega sistema izkoriščamo pri zdravljenju osteoporoze s svežimi zlomi. Slabost terapije s kalcitoninom je v tem, da je njegov učinek viden samo 18-24 mesecov.

Bisfosfonati so analogi naravnih pirofosfatov, ki se absorbirajo iz črevesja in nalagajo v kosti, kjer se vežejo na kristale hidroksiapatita, od tam pa prehajajo v osteoklaste. Inaktivaciji sledi apoptoza osteoklasta. Tako zmanjšajo hitrost kostne premene in zavrejo resorpcijo kosti, saj se zmanjša število in aktivnost osteoklastov. V kosti se zadržujejo več let, zato je njihovo delovanje vidno še dolgo po ukinitvi zdravljenja. Biološka uporabnost bisfonatov je manj kot 1 % in hrana zelo zmanjšuje absorpcijo. Se ne presnavljajo in se nespremenjeni hitro izločajo



z urinom. Neželeni učinki obsegajo draženje zgornjih prebavil in nevarnost ulceracij ustne votline ter požiralnika. Nedoslednost pri jemanju bisfosfonatov negativno vpliva na absorpcijo zdravilne učinkovine in sodelovanje bolnikov pri zdravljenju. Danes so med bisfosfonati v uporabi alendronat, etidronat, ibandronat, kladronat, pamidronat, risedronat in zoledronat (Slika 4) (3, 4).

Slika 4: Bisfosfonati

5.2. Zdravila, ki vplivajo na kostno izgradnjo s stimulacijo osteoblastov

- natrijev fluorid, natrijev monofluorfosfat
- parathormon v nizkih odmerkih in teriparatid
- anabolni steroidi
- stroncijev ranelat

Soli, ki vsebujejo fluor (natrijev fluorid, monofluorfosfat), pospešujejo delovanje osteoblastov in dokazano zvišajo MKG, ni pa dokazano, da zdravljenje s fluoridi zmanjša število osteoporoznih zlomov, saj ostaja odprt vprašanje, ali je med zdravljenjem novo nastala kostrina dovolj kvalitetna. Ob zdravljenju s fluoridi je potrebno dodajati kalcij in vitamin D.

Parathormon poveča količino trabekularne kosti, če ga dajemo dnevno parenteralno. Trenutno je najučinkovitejše sredstvo za večanje kostne mase, a žal tudi najdražje in ga uporabljamo samo pri najtežjih oblikah osteoporoze. *Teriparatid* je analog parathormona, ki spodbuja tvorbe nove kostnine in je namenjen bolnikom z najhujšimi oblikami osteoporoze.

Anabolni steroidi naj bi preko povečane mišične mase posredno povečali kostno maso. Rezultat zdravljenja z *nandrolonom*, anabolnim steroidom za parenteralno uporabo, je zvečanje MKG ledvenih vretenc (3, 4).

Mehanizem delovanja *stroncijevega ranelata* ni v celoti znan, ima pa dvojno delovanje, saj zmanjšuje razgradnjo in pospešuje tvorbo kostnine. *In vitro* stroncijev ranelat povečuje replikacijo prekurzorjev osteoblastov in sintezo kolagena v kulturah kostnih celic ter zmanjšuje razgradnjo kostnine z zmanjševanjem diferenciacije in aktivacije osteoklastov. Kot dvovalentni kation se stroncij ne presnavlja in se, tako kot kalcij, vgradi v kostni matriks (16).

5.3. Pripravki za izboljšanje kalcijeve bilance

- kalcijeve soli
- vitamin D

Kalcij je najpomembnejša prehrambena prvina za primeren razvoj kosti in ohranitev njihove trdnosti. Najboljši način za zagotovitev zadostne količine kalcija je prehrana, bogata z mlekom in mlečnimi izdelki. Pri odraslih je absorpcija kalcija zmanjšana na 30 do 50% zaužitega kalcija. Za ženske po menopavzi oz. za moške starejše od 65. leta je priporočen dnevni vnos 1000 mg. Kalcijevi pripravki so v obliki tablet kalcijevega karbonata, kalcijevega glukuronata in kalcijevega citrata, ki jih je potrebno zaužiti med jedjo, da zagotovimo ustrezno absorpcijo. Kalcij dodajamo antiresorpcijskim zdravilom in tako povečamo njihovo učinkovitost.

Vitamin D (kalcitriol) pospešuje absorpcijo kalcija iz prebavnega sistema ter vpliva na nalaganje in absorpcijo Ca^{2+} v kosteh, hkrati pa pomembno prispeva k mišični moči in ravnotežju ter zmanjšuje tveganje za zlome. Za sintetizo vitamina D v koži iz 7-dehidroholisterola (provitamin D₃) so potrebni UV žarki in ga v idealnih okoliščinah ni potrebno vnašati s hrano. Vitamin D sam po sebi ni aktivna substanca, ampak se mora najprej preko niza reakcij v jetrih in ledvicah pretvoriti v končni aktivni produkt, 1,25-

dihidroksiholekalciferol (1,25-(OH)₂-D₃, kalcitriol). Pri starejših z zmanjšano funkcijsko sposobnostjo ledvic, ki se večinoma zadržujejo v zaprtih prostorih brez sonca, je hipovitaminiza D pogosta. Zato dajemo v kombinaciji s kalcijevimi pripravki ali v kombinaciji z drugimi zdravili za osteoporozo tudi 1-alfa-(OH) vitamin D oz. kalcitriol v odmerku 0,5 mg dnevno. Mlajšim, ki imajo primerno funkcijo ledvic in jeter in se ne izpostavljajo dovolj sončnim žarkom, dajemo vitamin D v odmerku 400 do 800 IU dnevno.

Učinkovitost zdravil za osteoporozo ocenujemo glede na njihovo sposobnost preprečevanja oz. zmanjševanja števila zlomov. Med zdravljenjem ocenujemo učinek zdravljenja z merjenem MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene. Upoštevati moramo, da spremembe v MKG ne odražajo vseh sprememb v kvaliteti kosti in zato niso vedno v korelaciji s številom osteoporoznih zlomov. Zdravljenje osteoporoze z zdravili je sicer zelo učinkovito, vendar pa je dokazano, da jemanje zdravil v povezavi z redno in pravilno načrtovano telesno vadbo še dodatno poveča prirastek kostne mase (3).

III. SISTEM RANKL/RANK/OPG

1. ZNAČILNOSTI IN DELOVANJE SISTEMA RANKL/RANK/OPG

Sistem RANKL/RANK/OPG je eden od lokalnih dejavnikov, ki uravnava kostno premeno. Vpliva na osteoklastogenezo, v kateri nastajajo zreli osteoklasti, in na aktivacijo zrelih osteoklastov. OPG in RANKL sta proteina osteoblastov, RANK pa protein na osteoklastih. OPG predstavlja topni receptor za RANKL (17). V Preglednici V so podani predstavniki sistema RANKL/RANK/OPG in njihovo alternativno poimenovanje.

Preglednica V: Predstavniki sistema RANKL/RANK/OPG

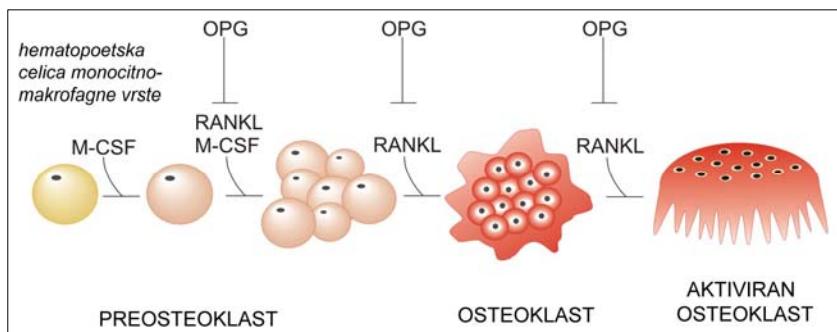
RANKL	RANK	OPG
ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, <i>angl. receptor activator of nuclear factor κ-B ligand</i>	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, <i>angl. receptor activator of nuclear factor κ-B</i>	osteoprotegerin, <i>angl. osteoprotegrin</i>
TNFSF11 - naddružina dejavnikov tumorske nekroze, član 11, <i>angl. tumor necrosis factor superfamily, member 11</i>	TNFRSF11A - receptorji naddružine dejavnikov tumorske nekroze, član 11A, <i>angl. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11A</i>	TNFRSF11B - receptorji naddružine dejavnikov tumorske nekroze, član 11B, <i>angl. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11B</i>

2. VLOGA SISTEMA RANKL/ RANK/OPG PRI RAZVOJU OSTEOPOROZE

Po vezavi RANKL na receptor RANK se pospešijo procesi diferenciacije in aktivacije osteoklastov, pride do zlitja do večjedernih osteoklastov, njihovo preživetje se podaljša, prav tako pa je upočasnjena apoptoza osteoklastov. Posledično se poveča kostna razgradnja (17).

2.1. Vloga sistema RANKL/RANK/OPG v osteoklastogenezi

Najbolj kritična faza kostne premene je razvoj osteoklastov, ki ga nadzorujejo osteoblasti. V začetnih fazah osteoklastogeneze je pomemben M-CSF, ki ga izločajo osteoblasti. Veže se na c-Fms receptor na preosteoklastih, tako poveča preživetje monocitne linije in omogoči njihovo diferenciacijo, proliferacijo in aktivacijo pod vplivom RANKL. Ob prisotnosti zadostne količine M-CSF je RANKL nujen in zadosten dejavnik za diferenciacijo hematopoetskih progenitornih celic, ki pripadajo celični liniji osteoklastov, do zrelih osteoklastov. Veže se na receptor RANK na površini prekurzorjev osteoklastov in inducira njihovo diferenciacijo (18) (Slika 5).



Slika 5: Osteoklastogeneza

Po vezavi RANKL na RANK pride do vezave dejavnikov povezanih s TNF (TNF receptor-associated factor) 1, 2, 3, 5 in 6 na znotrajcelično domeno RANK. Odločilno vlogo igra TRAF-6, saj se le pri *TRAF-6* knock-out miškah zaradi neaktivnih osteoklastov razvije osteopetroza, za katero je značilno porušeno ravnotežje med razgradnjo in tvorbo kostnine zaradi odsotnosti ali neaktivnih osteoklastov ter nakopičenje na novo sintetizirane kostnine, ki daje kosti marmornat videz. TRAF-6 signalna pot vodi v diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov in je sestavljena iz dveh delov:

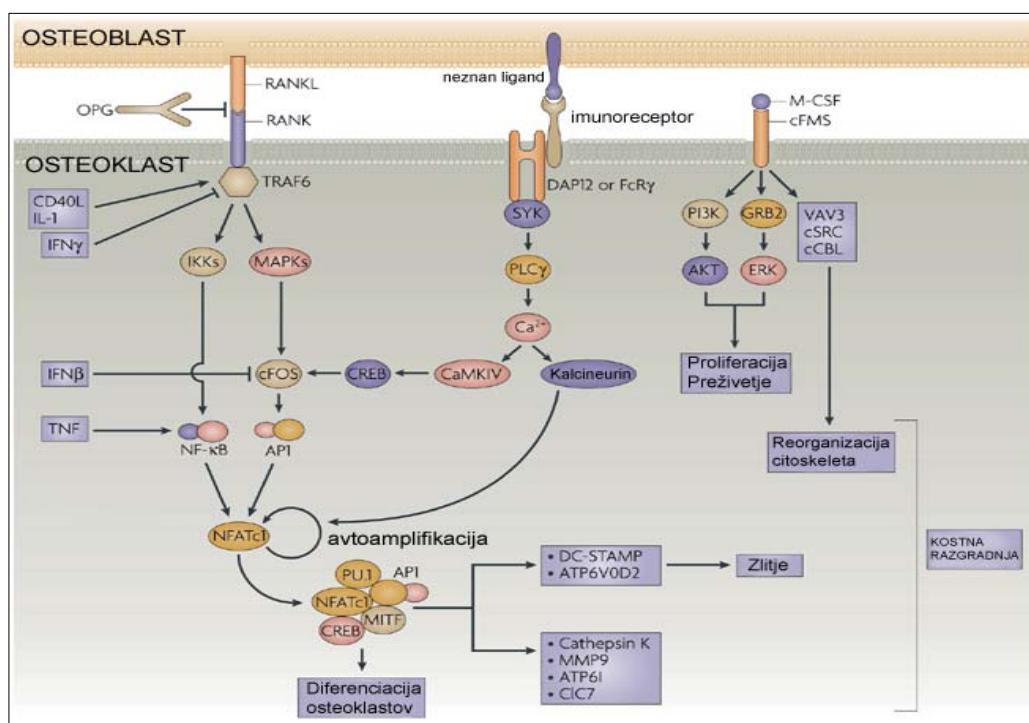
- c-jun N-terminalna kinaza/c-fos/c-jun pot: TRAF-6 aktivira mitozo aktivirajoči protein (MAP, angl. mitose-activating protein) kinazne kaskade. Preko aktivacije c-jun N-

terminalne kinaze (JNK, angl. c-jun N-terminal kinase) vodi do povezave protoonkogenov *c-jun* in *c-fos* v transkripcijski faktor AP-1.

- NF-κB TRAF-6 pot: TRAF-6 aktivira kinazo Iκ, kar vodi do nastanka jedrnega dejavnika κB (NF-κB), ki prehaja v jedro in se veže na določene gene.

TRAF-6 in c-src sodelujeta pri aktivaciji protein kinaze B (PKB), ki uravnava antiapoptozne signale in reorganizacijo citoskeleta. Pri *NF-κB1/ NF-κB2* in *c-fos* knock-out miškah se osteopetroza razvije zaradi pomankanja osteoklastov, pri *c-src* knock-out miškah pa, podobno kot pri *TRAF-6* knock-out miškah, zaradi prisotnosti neaktivnih osteoklastov.

OPG, ki ga izločajo osteoblasti, se poveže z RANKL in onemogoči njegovo vezavo na RANK. Končni rezultat te vezave je zaviranje diferenciacije, zlivanja in aktivacije osteoklastov (18, 19) (Slika 6).



Slika 6: Vloga sistema RANKL/RANK/OPG v osteoklastogenezi (povzeto po Nature Reviews Immunology)

2.2. Vloga sistema RANKL/RANK/OPG v osteoklastogenezi preko imunskega sistema

Sistem RANKL/RANK/OPG ima pomembno vlogo tako pri osteoklastogenezi kot tudi pri delovanju imunskih celic. Dendritične celice lahko sprožijo imunski odgovor z limfociti T. Na ta način neposredno inducirajo izražanje RANKL v aktiviranih celicah T. Le-te izločajo tudi

protivnetne citokine (IL-1, IL-6, IL-11 in TNF- α), ki posredno povečajo izražanje RANKL v osteoblastih. Sistemska aktivacija limfocitov T tako poveča obseg osteklastogeneze preko povečanega izražanja RANKL. Nasprotno je pri akutnem imunskem odzivu in kratkotrajni aktivaciji limfocitov T povečana tvorba interferona γ na osteoklastih ali njegovih prekurzorjih. Interferon γ preko hitre razgradnje TRAF-6 zmanjša osteoklastogenezo (Slika 6) (20, 21). Nekatere študije navajajo možne alternativne poti za diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov neodvisno od RANKL/RANKL/TRAF-6 signalne poti, in sicer preko stimulacije prekurzorjev osteoklastov z TNF- α in IL-1, ob prisotnosti TGF- β in M-CSF kot kofaktorjev. Takšna alternativna pot je možna pri nekaterih vnetnih boleznih, vendar ji raziskovalci ne pripisujejo velike vloge pri kostni razgradnji (18, 22).

3. URAVNAVANJE DELOVANJA SISTEMA RANKL/RANK/OPG

Preosteoblasti izločajo transkripcijski faktor CBFA-1 (angl. core-binding factor A1), ki je nujen za diferenciacijo osteoblastov in zadostno izražanje številnih proteinov v osteoblastih, tudi RANKL na površju preosteoblastnih/stromalnih celic. *CBFA-1* knock-out miška je brez zrelih osteoblastov, kot tudi brez osteoklastov (18). Izražanje CBFA-1 uravnavajo kostno morfogenetični proteini (BMP, angl. bone morphogenic protein). RANKL inducira izražanje c-fos, ki je bistveni transkripcijski faktor za nastanek osteoklastov. V izražanje c-fos se vpleta tudi interferon- β . RANKL preko indukcije gena za interferon- β v preosteoklastih inhibira diferenciacijo osteoklastov. Osteoblasti prav tako izločajo M-CSF, ki je nujen (a ne zadosten) dejavnik za osteoklastogenezo (23). Obratno, tudi osteoklasti uravnavajo diferenciacijo in aktivacijo ostoblastov. Transformirajoči rastni faktor β (TGF- β , angl. transforming growth factor β), BMP-2, 4 in 7 (angl. bone morphogenic factor) in IGF (angl. insulin-like growth factor), ki se sproščajo med kostno razgradnjo, stimulirajo osteoblastogenezo in hkrati zavirajo izražanje RANKL na osteoblastih. TGF- β pa deluje tudi neposredno na osteoklaste, in sicer ojača diferenciacijo osteoklastov pod vplivom RANKL. Osteoklasti izločajo tudi PDGF, ki zavira diferenciacijo osteoblastov. Lokalno povečana koncentracija kalcija, ki se sprosti med kostno razgradnjo, zavira osteoklastogenezo. OPG, ki se veže na RANKL, blokira interakcijo RANKL z RANK in tako zavira diferenciacijo osteoklastov in napredujočo razgradnjo kostnega tkiva. Tako je zagotovljena sklopitev kostne tvorbe in kostne razgradnje ter vzdrževanje kostne premene v ravnotežju, s tem pa tudi integritete kosti (19).

Začetek izražanja RANK uravnava več dejavnikov, kot so M-CSF, TGF- β 1, vitamin D₃, PMA in prekurzorji osteoklastov. Izražanje RANK je dokaj konstantno, zato obseg kostne razgradnje posredno uravnava razmerje koncentracij RANKL/OPG. Sprememba razmerja sproži ali izrazito povečanje kostne razgradnje, ki vodi do osteoporoze, ali zmanjšanje kostne razgradnje, kar lahko privede do nastanka osteopetroze. Njuno izražanje uravnava številni lokalni in sistemski dejavniki, ki preko različnih mehanizmov z zaviralnimi ali stimulatornimi učinki vplivajo na proces osteoklastogeneze (Preglednica VI) (24).

Preglednica VI: Dejavniki, ki vplivajo na izražanje RANKL in OPG (\uparrow pomeni ojačanje, \downarrow pomeni zaviranje)

DEJAVNIK	RANKL	OPG	DEJAVNIK	RANKL	OPG
vitamin D3	\uparrow	\uparrow/\downarrow	TNF- α	\uparrow	\uparrow
PTH	\uparrow	\downarrow	kostni morfogenetični protein 2		\uparrow
estrogen		\uparrow	kalcij	\uparrow	\uparrow
IL-1	\uparrow	\uparrow	glukokortikoidi	\uparrow	\downarrow
IL-6	\uparrow	\uparrow	M-CSF	\uparrow	
IL-11	\uparrow	\uparrow	PGE ₂	\uparrow	\downarrow

4. RANK

RANK, receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, je transmembranski protein tipa I, sestavljen iz 616 AK. Na celični površini se poveže v trimer. Vsebuje 4 zunajcelične, s cisteinom bogate psevdodonovitve, kar je značilnost naddružine receptorjev tumorje nekrotizirajočih dejavnikov (TNFRS, angl. TNF receptor superfamily). Protein RANK je sestavljen iz signalnega peptida (28 AK), N-terminalne zunajcelične domene (184 AK), transmembranske domene (21 AK) in C-terminalne citoplazemske domene (383 AK) (25). Gen *TNFRSF11A*, ki kodira protein RANK, se izraža predvsem v celicah makrofagne/monocitne linije, ki vključujejo preosteoklaste, celice B in T, dendritične celice in fibroblaste, v manjši meri pa tudi v srcu, pljučih, možganih, skeletnih mišicah, ledvicah, jetrih in koži. *TNFRSF11A* se nahaja na kromosому 18, na mestu 18q22.1, obsega 61 kb in vsebuje 12 eksonov (17, 25). Stimulirajoča protitelesa proti zunajceličnim domenam RANK oponašajo delovanje RANKL in sprožijo osteoklastogenezo *in vitro*. Nasprotno, inhibitorni fragmenti teh protiteles ali topna oblika RANK, ki tekmuje s transmembransko obliko RANK za svoj ligand, RANKL, zavrejo osteoklastogenezo (24).

4.1. Molekularna genetika RANK

Mutacije v genu *RANK* so povezane s nekaterimi bolezenskimi stanji, kot so družinska ekspanzilna osteoliza (FEO, angl. familial expansile osteolysis), ena izmed oblik družinske Pagetove bolezni in osteopetroza. FEO je redka avtosomna dominantna motnja, za katero je značilna fokalno pospešena kostna razgradnja, ki je prav tako značilna za Pagetovo bolezen. Vzrok tako za FEO kot tudi za Pagetovo bolezen je mutacija v eksonu 1 *RANK*. Posledica mutacije je nepopolna cepitev signalnega peptida v proteinu RANK, kar vodi v kopičenje nepravilnih translacijskih produktov v sekretorni poti, medsebojno povezovanje receptorjev in povečano signalno transdukcijo v NF- κ B poti (26). Vzrok za osteopetrozo je mutacija v delu *RANK*, ki kodira bodisi za zunajcelično, s cisteinom bogato podenoto RANK, bodisi za znotrajcelično podenoto RANK. V obeh primerih je prizadeta osteoklastogeneza (27).

O vplivu polimorfizmov v *RANKL* in *OPG* na MKG je bilo opravljenih in objavljenih že precej raziskav, nasprotno pa je vpliv polimorfizmov v *RANK* na MKG dokaj slabo raziskan. V eni izmed študij so raziskovalci preučevali vpliv nesmislene substitucije 575T>C v eksonu 7 *RANK* v kitajski populaciji, ki vodi do zamenjave AK alanin v valin na mestu 192 (Ala192Val). V študijo so vključili 1120 preiskovancev, od tega 555 preiskovancev s skrajno nizko MKG na kolku in, kot kontrolno skupino, 565 preiskovancev s skrajno visoko MKG na kolku. Ugotovili statistično značilno povezanost med polimorfizmom Ala192Val in MKG le pri moških, ne pa tudi pri premenopavznih in pomenopavznih ženskah. Rezultati kažejo na heterozigotno prednost, saj so pri preiskovancih z genotipom TC ugotovili za 40% zmanjšano tveganje za skrajno nizko MKG na kolku, prav tako so imeli ti preiskovanci statistično značilno višjo celokupno MKG v primerjavi s preiskovanci z genotipom TT in CC (28).

Leta 2007 je bila objavljena študija, v kateri so raziskovalci identificirali nove polimorfizme v *RANK* ter ugotovljali njihovo povezanost z MKG pri pomenopavznih ženskah. Z direktnim sekveniranjem *RANK* so pri 24 zdravih Korejkah identificirali 25 polimorfizmov, od tega 7 novih. Glede na alelno frekvenco so izbrali 11 izmed teh polimorfizmov in genotipizirali 560 pomenopavznih žensk. Ugotovili so, da sta dva izmed polimorfizmov, ki se nahajata v intronu, +34863G>A (rs12458117) in novo odkriti +35928isndelC, povezana z nizko MKG pri pomenopavznih ženskah ($p=0,02$ in $0,04$) (26). Niso ugotovili statistično značilne povezave med *RANK* polimorfizmi in tveganjem za zlom. Eden izmed izbranih 11 polimorfizmov je bil polimorfizem +34656T>C, ki ustreza polimorfizmu Ala192Val.

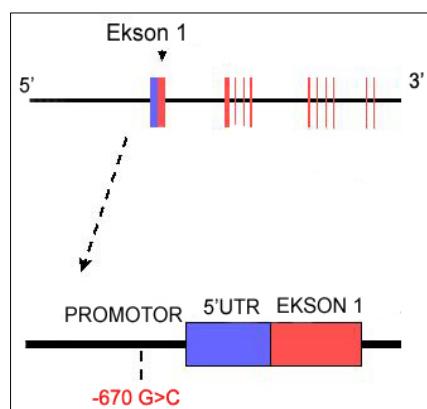
Ugotovili so povezanost tega polimorfizma z nizko MKG petnice pri pomenopavznih Korejkah ($p=0,017$), ne pa tudi z nizko MKG vretenc in stegnenice (29, 30).

4.2. Študija povezanosti polimorfizma -670G>C v genu *RANK*

Eden izmed 25 polimorfizmov, ki so ga na korejski populaciji proučevali Koh in sodelavci, je bil tudi polimorfizem -708G>C, ki se nahaja v promotorju *RANK* in ustreza polimorfizmu, ki smo ga preiskovali v naši raziskavi, -670G>C. Frekvenca alela C v korejski populaciji znaša 19,3 %. Objavljene so še frekvence alela C za Azijce in prebivalce sub-saharske Afrike, ki znašajo 12,2% in 4,2%, ne pa tudi za kavkazijce, ki so bili vključeni v našo raziskavo. Pri pomenopavznih ženskah niso ugotovili statistično značilne povezave med polimorfizmom -708G>C in MKG ($p=0,67$ za MKG ledvenih vretenc in 0,52 za MKG stegnenice) (29).

4.3. Funkcijska analiza polimorfizma -670G>C v genu *RANK*

Regulacija izražanja genov se vrši na nivoju promotorjev, ki vsebujejo vezavna mesta za različne transkripcijske faktorje (Slika 7). Ti so iniciatorji transkripcije, saj olajšajo vezavo RNA-polimeraze v fazi transkripcije ter tako vplivajo na količino sintetiziranega proteina. Kakršnekoli spremembe v promotorju bi lahko povzročile spremembo v vezavi



transkripcijskih faktorjev in posledično vplivale na količino sintetiziranega proteina. V povezavi s preučevanim polimorfizmom bi lahko povečana količina receptorjev RANK pomenila večjo občutljivost za ligand RANKL, pospešeni procesi diferenciacije in aktivacije osteoklastov preko TRAF-6 signalne poti pa bi lahko vodili v povečano kostno razgradnjo.

Slika 7: Zgradba gena *RANK* in polimorfizem -670 G>C

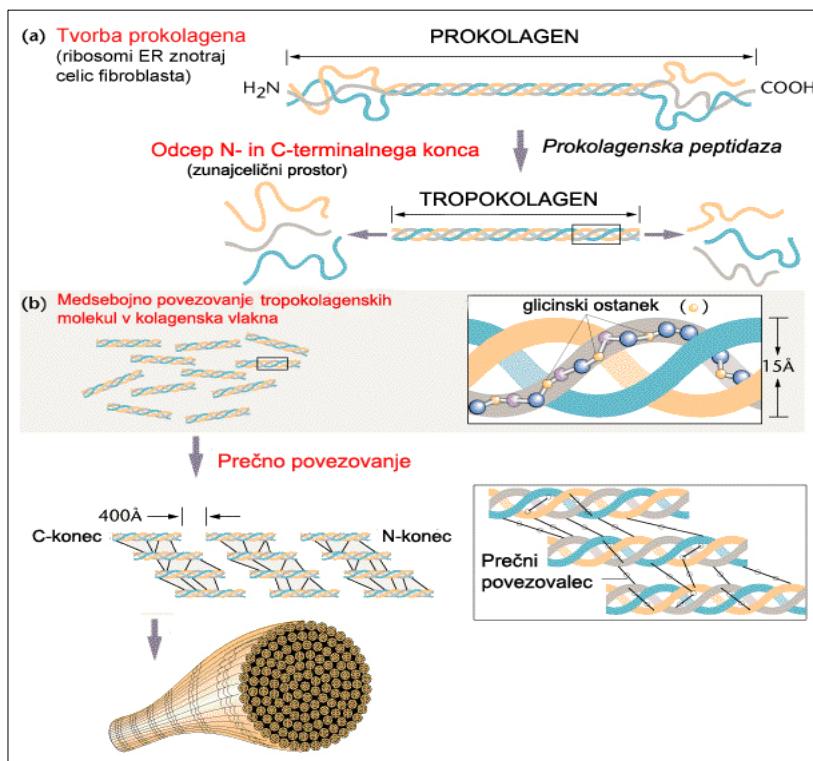
IV. KOLAGEN TIP 1 α 1 (COLIA1)

Kolagen je glavna beljakovina vezivnega tkiva pri sesalcih in predstavlja 25 % vse beljakovinske mase. Je glavna sestavina hrustanca, vezi, tetiv, kosti in zob. Glede na kemijske

lastnosti ga uvrščamo med skleroproteine. Kolagenska vlakna so osnovni strukturni element zunajceličnega matriksa, ki podpira večino tkiv in daje zgradbo medceličnini (31). Poznamo 29 različnih vrst kolagena, ki jih označujemo z rimskimi številkami. Vsaka izmed vrst kolagena ima tkivno specifično porazdelitev, tako da vsebuje kostnina največ kolagena tipa I. Razliko med tipi kolagena določajo stopnja hidroksilacije prolinskih in lizinskih ostankov, prečno povezovanje in glikolizacija. Tip I, II in III predstavlja 90% kolagena. Kolagen tipa I je sestavni del osteoida, ki ga sintetizirajo osteoblasti (32).

1. STRUKTURA IN BIOSINTEZA KOLAGENA

Kolagen ima nenavadno aminokislinsko (AK) zgradbo. Sestavljen je iz 33 % glicina (Gly), 12 % prolina (Pro), 10 % hidroksiprolina, ostalo so druge AK. Kolagen je edini protein v telesu, ki vsebuje hidroksiprolin. Primarno strukturo kolagena predstavlja ponavljajoči se triplet Gly-X-Y. Na mestu X ali Y se pogosto nahaja prolin, na mestu Y pa se nahajajo hidroksilirane AK, kot so 4-hidroksiprolin (4Hyp), 3-hidroksiprolin (3Hyp) ali 3-hidroksilizin (3Hyl). Glede na posamezno vrsto kolagena se na različno število hidroksilizinov vežejo disaharidi (33). Biosinteza kolagena je sestavljena iz več korakov in poteka v nizu posttranslacijskih preoblikovanj prvotnega prokolagenega polipeptida (Slika 8).



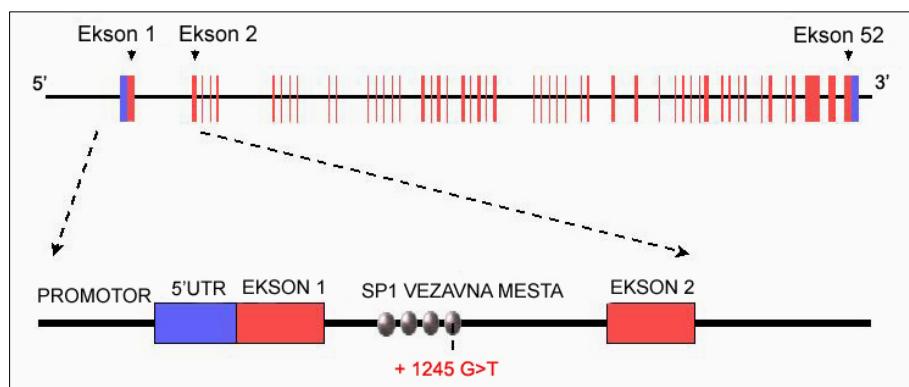
Slika 8: Biosinteza kolagena (Povzeto po Clug & Cummins 1997)

2. COLIA1

Kolagen tipa I $\alpha 1$ (angl. *Collagen, type I, alpha 1; COLIA1*) je gen, ki kodira pro- $\alpha 1$ verigo kolagena tipa I. Različni tipi kolagena vsebujejo različne kombinacije α verig. Kolagen tipa I je heterotrimjer, ki vsebuje dve $\alpha 1$ in eno $\alpha 2$ verigo. Gen *COLIA1* se nahaja na kromosomu 17, na mestu 17q21.31-q22.05 (34). Dolg je 18 kb in vsebuje 52 eksonov, ki so večinoma dolgi 45 bp, 54 bp ali 99 bp (45 bp + 54 bp). α verigo kodirajo eksoni od 6 do 49.

2.1. Študije povezanosti polimorfizma Sp1 v genu *COLIA1*

Mutacije v genu *COLIA1* so povezane s nekaterimi bolezenskimi stanji, kot so osteogenesis imperfecta (tip 1, 2, 3 in 4) in Ehlers-Danlosov sindrom (35, 36). Grant in sodelavci so leta 1996 opisali nov G>T polimorfizem (dbSNP rs1800012, na mestu +1245 glede na začetno mesto transkripcije) v prvem intronu *COLIA1*, ki leži v vezavnem mestu za transkripcijski faktor Sp1 (angl. specificity protein 1) (Slika 9). Ugotovili so, da je prisotnost polimorfizma Sp1 povezana z MKG in povečano pojavnostjo osteoporoznih zlomov pri pomenopavznih Angležnjah (37). Temu odkritju je sledilo veliko študij, ki so bodisi potrdile bodisi ovrgle te ugotovitve. Največja raziskava na tem področju je bila multicentrična raziskava GENOMOS, v katero je bilo vključenih 20786 preiskovancev in je potrdila povezanost polimorfizma Sp1 v genu *COLIA1* z zmanjšano MKG ledvenih vretenc in vratu stegnenice ter večjim tveganjem za zlome vretenc pri pomenopavznih ženskah (38). V zadnjih letih so raziskovalci odkrili več polimorfizmov v promotorski regiji *COLIA1*, ki naj bi skupaj z *COLIA1* Sp1 polimorfizmom uravnavali MKG. Polimorfizem Sp1 v genu *COLIA1* je patentiran kot genetski označevalec za razvoj osteoporoze (41).



Slika 9: Zgradba gena *COLIA1* in polimorfizem *Sp1*

2.2. Funkcijska analiza polimorfizma Sp1 v genu *COLIA1*

Molekularni mehanizem, ki bi lahko razložil povezanost med polimorfizmom Sp1 in zmanjšano MKG ter povečanim tveganjem za zlome, obsega povečano afiniteto transkripcijskega faktorja Sp1 do vezavnega mesta in tako povečano transkripcijo gena *COLIA1*, kar vodi do povečanega razmerja med COLIA1 in COLIA2 mRNA oz. med $\alpha 1$ in $\alpha 2$ verigo kolagena tipa I. Pri heterozigotih (genotip GT) je to razmerje 2,36:1 v primerjavi z razmerjem 2:1 pri homozigotih (genotip GG). Vloga spremenjenega razmerja med $\alpha 1$ in $\alpha 2$ verigo še ni popolnoma pojasnjena, vplivalo pa naj bi na mehansko jakost kosti (39). *In vitro* študije so prav tako pokazale, da imajo osteoblasti nosilcev alela T zmanjšano sposobnost mineralizacije osteoida. To ugotovitev je potrdila tudi biopsija kostnih vzorcev, ki so jih odvzeli preiskovancem z različnimi genotipi (40, 41). V raziskavi na 185 zdravih pomenopavznih ženskah so ugotovili značilno povezanost med polimorfizmom Sp1 in povišano koncentracijo piridinolina v urinu ($p<0,05$), kar nakazuje na povečano razgradnjo oz. premeno kolagena tipa I (42).

NAMEN DELA

Osteoporoza je najpogostejsa metabolna bolezen kosti, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota in povečano tveganje za zlom. Je bolezen z raznoliko etiologijo, saj vključuje tako notranje (genetske in hormonske) kot tudi okoljske dejavnike. Zaradi zapletov postaja osteoporoza eden glavnih zdravstvenih problemov razvitih družb. Številne raziskave so pokazale, da je okrog 85% sprememb v MKG gensko pogojenih. Do sedaj so raziskovalci proučevali številne kandidatne gene, katerih proteini vplivajo na metabolizem kosti. Nekateri so pokazali vpliv na razvoj osteoporoze, med njimi gen, ki kodira za receptor vitamina D (VDR), gen za estrogenski receptor α (ER α) in gen za kolagen tipa I (COLIA1).

Naš namen je ugotoviti pogostost dveh polimorfizmov v dveh kandidatnih genih za razvoj osteoporoze, in sicer -670G>C v genu *RANK* in Sp1 v genu *COLIA1*, ter njihovo povezanost z MKG, biokemijskimi kazalci kostne premene in odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom. Preučevani polimorfizmi bi lahko bili pomembni kot genetski dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze ter uporabni kot diagnostični kazalci. Prav tako bi lahko služili za prepoznavo tistih osteoporoznih bolnikov, ki bi se bolje odzivali na zdravljenje z določenim zdravilom za osteoporozo.

V ta namen bomo:

- v raziskavo vključili 721 preiskovancev, ki jim je bila odvzeta kri in izmerjena MKG ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene,
- izolirali DNA iz polne krvi z metodo izsoljevanja proteinov po modificiranem Millerjevem postopku,
- z reakcijo PCR pomnožili 507 bp dolg odsek promotorja *RANK* ter preverili kvaliteto in količino pomnoženega odseka z agarozno elektroforezo
- s pomočjo analize RFLP preverili prisotnost polimorfizma -670 G>C v promotorju gena *RANK* in določili genotipe preiskovancev,
- z reakcijo PCR v realnem času in uporabo sond TaqMan® preverili prisotnost Sp1 polimorfizma v intronu gena *COLIA1* ter določili genotipe preiskovancev,
- s statistično analizo ugotovili, ali polimorfizma -670 G>C v genu *RANK* in Sp1 v genu COLIA1 vplivata na MKG, biokemijske kazalce kostne premene ter odzivnost na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom

MATERIALI IN METODE

1. PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 721 preiskovancev (604 žensk in 117 moških) iz različnih slovenskih centrov. Razdelili smo jih v 4 skupine s podskupinami, kot je prikazano v Preglednici VII.

Preglednica VII: Razdelitev preiskovancev v skupine in podskupine

1. SKUPINA	480 pomenopavnih preiskovank smo razdelili v dve podskupini: ➤ 235 zdravih preiskovank ➤ 245 osteoporoznih bolnic
2. SKUPINA	57 premenopavznih preiskovank
3. SKUPINA	117 moških preiskovancev
4. SKUPINA	pomenopavzne osteoporozne bolnice, ki so se zdravile s/z: ➤ raloksifenom (56) ➤ alendronatom (52)

Preiskovancem so odvzeli kri, izmerili višino, telesno maso in izračunali ITM (indeks telesne mase). Nadalje so jim z metodo DXA izmerili MKG na področju vratu stegnenice (angl. BMD femoral neck - BMD_{fh}), kolka (angl. BMD total hip - BMD_{tot}) in vretenc L1-L4 (angl. BMD lumbar spine - BMD_{ln}). Prav tako so jim izmerili biokemijske kazalci kostne premene, in sicer RANKL, OPG, osteokalcin, CTX, BALP, DPYR in katepsin K. Osteokalcin (OC) so izmerili v plazmi po dodatku heparina s kemiluminiscenčnim encimskoimunskim testom (Immulite Osteocalcin, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). Serumsko vrednost kostne alkalne fosfataze (BALP) so določili z radioimunskim testom (Tandem-R Ostase, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Serumske vrednosti CTX (C-terminalni telopeptid kolagena tipa I), RANKL (sRANKL), OPG in katepsina K pa so določili z encimskoimunskim testom (Serum CrossLaps ELISA, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark; sRANKL ELISA, Biomedica, Vienna, Austria; Human Osteoprotegerin ELISA, BioVendor Laboratory Medicine, Inc.). Po začetnem merjenju MKG so 52 pomenopavznih žensk z osteoporozo zdravili z alendronatom v odmerku 10 mg na dan in 56 pomenopavznih žensk z osteoporozo zdravili z raloksifenom v odmerku 60 mg na dan. Poleg tega so preiskovanke jemale tudi kalcij (500 mg na dan ob terapiji z alendronatom in 1000 mg

na dan ob terapiji z raloksifenom) ter vitamin D₃ (500 IU na dan ob terapiji z alendronatom in 400 IU na dan ob terapiji z raloksifenom). Po enem letu so preiskovankam ponovno izmerili MKG in vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene. V Preglednici VIII in IX so podane povprečne vrednosti izmerjenih parametrov za posamezne skupine in podskupine.

Preglednica VIII: Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov v skupini premenopavznih in pomenopavznih preiskovank ter moških preiskovancev (ITM: indeks telesne mase, CTX: C-terminalni telopeptid kolagena tipa I)

	Pomenopavzne preiskovanke	Pomenopavzne osteoporozne bolnice	Zdrave pomenopavzne preiskovanke	Premenopavzne preiskovanke	Moški
Število preiskovancev	463	238	225	56	117
Starost (leta)	$62,96 \pm 8,393$	$64,42 \pm 8,19$	$61,48 \pm 8,35$	$45,35 \pm 4,65$	$67,58 \pm 6,10$
Masa (kg)	$69,68 \pm 12,157$	$65,96 \pm 9,97$	$73,56 \pm 13,01$	$65,37 \pm 11,79$	$81,70 \pm 12,77$
Višina (m)	$1,60 \pm 0,06$	$1,58 \pm 0,06$	$1,61 \pm 0,06$	$1,63 \pm 0,06$	$1,71 \pm 0,06$
ITM (kg/m^2)	$27,29 \pm 4,60$	$26,26 \pm 3,85$	$28,34 \pm 5,07$	$24,34 \pm 4,10$	$27,85 \pm 3,77$
Pričetek menopavze (leto starosti)	$49,45 \pm 8,39$	$48,81 \pm 4,45$	$49,82 \pm 4,08$	/	/
trajanje menopavze (leta)	$12,12 \pm 9,12$	$15,30 \pm 9,35$	$10,41 \pm 8,66$	/	/
MKG vratu stegnenice (g/cm^2)	$0,6932 \pm 0,1252$	$0,6243 \pm 0,0830$	$0,7649 \pm 0,1214$	$0,7817 \pm 0,0775$	$0,8128 \pm 0,1587$
MKG kolka (g/cm^2)	$0,8338 \pm 0,1439$	$0,7546 \pm 0,0986$	$0,9164 \pm 0,1371$	$0,9210 \pm 0,0919$	$1,0250 \pm 0,1650$
MKG ledvenih vretenc (g/cm^2)	$0,85568 \pm 0,1643$	$0,7418 \pm 0,0878$	$0,9744 \pm 0,1395$	$1,0056 \pm 0,1153$	$1,0565 \pm 0,1763$
Osteokalcin ($\mu\text{g}/\text{l}$)	$21,838 \pm 12,410$	$28,326 \pm 13,746$	$15,171 \pm 5,604$	$10,632 \pm 4,636$	$9,548 \pm 5,171$
Kostna alkalna fosfataza ($\mu\text{g}/\text{l}$)	$12,275 \pm 5,182$	$12,437 \pm 5,576$	$11,838 \pm 3,951$	$8,188 \pm 3,036$	/
CTX (pmol/l)	$4095,92 \pm 2090,23$	$4343,36 \pm 2333,01$	$3940,03 \pm 1917,60$	$2679,07 \pm 1366,37$	$2003,72 \pm 1086,74$
sRANKL (pmol/l)	$0,3663 \pm 0,5065$	$0,3421 \pm 0,5651$	$0,3806 \pm 0,4708$	$0,4912 \pm 0,4401$	$0,1800 \pm 0,1118$
OPG (pmol/l)	$105,003 \pm 183,993$	$64,291 \pm 188,657$	$145,715 \pm 170,570$	$315,711 \pm 56,139$	$5,4636 \pm 1,5392$
Katepsin K (pmol/l)	/	/	/	$8,693 \pm 20,208$	/

Preglednica IX: Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov v skupini osteoporoznih bolnic, ki so se zdravile z raloksifenom in alendronatom (predopona d se nanaša na spremočno vrednosti parametra v % v obdobju enega leta zdravljenja; ITM: indeks telesne mase, CTX: C-terminalni telopeptid kolagena tipa I)

	OP bolnice, zdravljene z raloksifenom	OP bolnice, zdravljene z alendronatom
Število preiskovancev	56	51
Starost (leta)	$60,55 \pm 5,60$	$65,37 \pm 6,34$
Masa (kg)	$65,54 \pm 8,07$	$65,79 \pm 9,75$
Višina (m)	$1,60 \pm 0,05$	$1,57 \pm 0,05$
ITM		$26,59 \pm 3,66$
MKG vratu stegnenice (g/cm^2)	$0,6299 \pm 0,0773$	$0,6168 \pm 0,0899$
dMKG vratu stegnenice (%)	$1,6129 \pm 5,1971$	/
MKG kolka (g/cm^2)	$0,7294 \pm 0,0949$	$0,7377 \pm 0,1069$
dMKG kolka (%)	$-0,6277 \pm 15,0337$	$4,2393 \pm 3,2001$
MKG ledvenih vretenc (g/cm^2)	$0,7594 \pm 0,0697$	$0,7029 \pm 0,0737$
MKG ledvenih vretenc (%)	$2,0753 \pm 4,4847$	$6,5641 \pm 4,4750$
Osteokalcin (OC) ($\mu\text{g}/\text{l}$)	$33,309 \pm 11,476$	$24,0027 \pm 9,1504$
dOC ($\mu\text{g}/\text{l}$)	$-24,470 \pm 19,3663$	$56,2552 \pm 21,9383$
Kostna alkalna fosfataza (BALP) ($\mu\text{g}/\text{l}$)	$12,261 \pm 5,246$	$12,3681 \pm 5,5197$
dBALP (%)	$-21,0083 \pm 28,2922$	$44,8223 \pm 28,1859$
OPG (pmol/l)	$6,2116 \pm 1,9738$	/
dOPG (pmol/l)	/	/
CROSS (pmol/l)	$0,5209 \pm 0,1896$	/
DCROSS (%)	$-26,2819 \pm 28,5665$	/
Deoksipiridinolin (DPYR)	/	$7,6404 \pm 3,5746$
dDPYR (%)	/	$70,0063 \pm 30,8307$

2. IZOLACIJA DNA

DNA smo izolirali iz levkocitov periferne venske krvi z metodo izsoljevanja proteinov po modificiranem Millerjevem postopku (43), ki je sestavljena iz več korakov:

➤ Prvi dan

DNA smo izolirali iz 8,0 mL zamrznjene polne venske krvi, ki smo jo pred izolacijo odtalili pri sobni temperaturi. V 50 mL centrifugirki smo krvi dodali 40,0 mL pufra CLB (raztopina za lizo eritrocitov), dobro premešali in pustili na ledu 20 minut. Nato smo vzorce 20 minut centrifugirali v hladni centrifugi na 4°C pri 4600 x g. Po centrifugiranju smo supernatant v celoti odpipetirali in ponovno dodali CLB pufer do 20 mL. Previdno smo premešali, da se je peleta odlepila od dna centrifugirke in pustili za 20 minut na ledu. Centrifugiranje smo pri istih pogojih še enkrat ponovili. Supernatant smo v celoti odpipetirali in dodali do 40 mL pufra SLR (raztopina za lizo citoplazemske membrane levkocitov). Narahlo smo premešali,

da se je peleta odlepila od dna in 20 minut stresali v kadički z ledom. Potem smo vzorce centrifugirali 20 minut v hladilni centrifugi pri 4600 x g in supernatant odpipetirali. Peleti smo dodali 4,8 mL pufra NB (raztopina za lizo jadrne membrane), 320 µL 10% raztopine SDS in 1,0 mL raztopine proteinaze K, vse skupaj narahlo premešali in inkubirali čez noč na stresalniku v komori pri 42 °C.

➤ Drugi dan

V centrifugirko smo dodali 1,6 mL nasičene raztopine NaCl, rahlo premešali in centrifugirali 30 minut v hladilni centrifugi pri 4600 x g. Supernatant smo odlili v drugo centrifugirko in dodali ledeno hladen etanol do 25 mL. Po rahlem mešanju se je pojavila zdrizasta DNA, katero smo navili na sterilizirano in zataljeno kapilaro ter jo prenesli v sterilno 1,5 mL plastično epruvetko. Čez noč smo jo pustili na temnem prostoru, da je etanol odhlapel.

➤ Tretji dan

Posušeno DNA smo raztopili v 300 µL avtoklavirane ultra čiste vode.

Materiali in oprema

A. Kemikalije:

Saharoza (Sigma), triton (Bio Rad), TRIS-baza (Fluka), magnezijev diklorid (Sigma), natrijev klorid (Kemika), Na₂EDTA x 2 H₂O (Fluka), natrijev dodecilsulfat (Sigma), proteinaza K (Sigma) in absolutni etanol (Merck).

B. Reagenti

- 2 M TRIS pufer, pH=8,2: 12,114 g TRIS-baze smo raztopili v 40 mL ultra čiste vode. S koncentrirano HCl smo uravnali pH na 8,2, dopolnili do 50 mL in avtoklavirali.
- 2 M raztopina MgCl₂: 10,165 g MgCl₂ x 6 H₂O smo raztopili v 50 mL ultra čiste vode in avtoklavirali.
- 0,5 M raztopina EDTA: 9,306 g Na₂EDTA smo raztopili v 30 mL ultra čiste vode, uravnali pH z NaOH do 8,2, dopolnili do 50 mL z vodo in avtoklavirali.
- 5 M raztopina NaCl: 14,6 NaCl smo raztopili v 50 mL ultra čiste vode in avtoklavirali.
- nasičena raztopina NaCl: 20,0 g NaCl smo dodali 50 mL ultra čiste vode in avtoklavirali.
- CLB pufer: v čašo smo natehtali 54,8 g saharoze, dodali 5 g detergenta tritona, 2,5 mL TRIS pufra pH 8,2 in 1,25 mL 2M raztopine MgCl₂. To mešanico reagentov smo dopolnili do 500 mL z avtoklavirano ultra čisto vodo. Nato smo raztopino

mikrobiološko filtrirali ($\phi=0,22 \mu\text{m}$), saj bi saharoza pri postopku avtoklaviranja karamelizirala.

- *SLR pufer*: zmešali smo 3,5 mL 2 M TRIS pufra, 1,75 mL 2 M raztopine MgCl₂ in 990 μL 5 M raztopine EDTA. Z ultra čisto vodo smo dopolnili do 500 mL in avtoklavirali.
- *NLB pufer*: k 500 μL 2 M TRIS pufra smo dodali 8,04 mL 5 M raztopine NaCl in 400 μL 0,5 M raztopine EDTA ter dopolnili do 100 mL z ultra čisto vodo ter avtoklavirali.
- *10% raztopina SDS*: 2 g natrijevega dodecilsulfata smo raztopili v 20 mL avtoklavirane ultra čiste vode in razdelili v 2 mL plastične epruvetke.
- *raztopina proteinaze K (c=1mg/mL)*: v sterilno čašo smo zatehtali 10 mg proteinaze K in dodali 10 mL ultra čiste vode. Raztopino smo razdelili in zamrznili na –20 °C.

Vse reagente za izolacijo DNA iz polne krvi smo hranili v hladilniku na 4 °C, razen absolutnega etanola in proteinaze K, ki smo ju hranili v zamrzovalniku na –20 °C.

C. Pribor in aparature

15 mL plastične centrifugirke s pokrovčkom (Sarstedt), avtoklavirane 1,5 mL epruvete, (Sarstedt), polavtomatske pipete Eppendorf, avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt), steklene kapilare 10 μL (Brand), plinski gorilnik, avtoklav A21 (Kambič), centrifuga 5804R (Eppendorf), inkubator Unihood 650 s stresalnikom Vibromix 403 EVT (Tehtnica), analitska tehtnica Europe 60, dd=0,0001 g (Gibertini), tehtnica Exacta 300 EB, dd=0,001 g (Tehtnica), stresalnik Vibromix-314EVT (Tehtnica), pH meter PHM 92 (Radiometer Copenhagen), aparat za ultra čisto vodo Purelab Classic (ELGA) in Vortex-2 Genie (Scientific Industries).

3. OCENA KOLIČINE IN KVALITETE IZOLIRANE DNA

3.1. Preverjanje velikosti in kvalitete izolirane DNA

Velikost in kvaliteto (celovitost) izolirane DNA smo ocenili z elektroforezo na 2% (m/V) agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. V električnem polju potujejo negativno nabite DNA molekule proti pozitivno nabiti anodi. Potovanje molekul DNA skozi pore gela je obratnosorazmerno njihovi velikosti – večje molekule potujejo počasneje, manjše pa hitreje. (45). Gel smo potopili v elektroforezno kadičko z 1xTAE pufrom. Pri tem smo pazili, da je bil gel popolnoma potopljen v pufru in v vodoravnem položaju. V žepke smo nanesli označevalec velikosti DNA in razredčene raztopine DNA. Pred nanosom smo na parafilmu

pomešali po 3 µL naštetih komponent s kapljico nanašalnega pufra bromfenol modro. Nanašalni pufer vsebuje glicerol, ki poveča gostoto vzorca in zagotavlja vsedanje DNA v žepk gela. Barvilo ksilencianolobarva vzorec, kar olajša nanos. Barvilo prav tako potuje v električnem polju proti anodi z določeno hitrostjo in tako omogoča spremljanje hitrosti potovanja. Elektroforeza je potekala 25 minut pri stalni napetosti 90 V. Po končani ločbi smo 2% gel z vgrajenim etidijevim bromidom postavili pod UV lučko transluminatorja, z UV dokumentacijskim sistemom ($\lambda=302$ nm) detektirali rezultate elektroforezne ločbe in gel fotografirali.

Materiali in oprema

➤ Priprava elektroforeznega gela

A. Kemikalije

Agaroza (Sigma), TRIS-baza (Fluka), Na₂EDTA x 2 H₂O (Fluka), etidijev bromid, 10 mg/mL (Sigma) in destilirana voda. Etidijev bromid je močno mutagen, zato moramo z njim rokovati zelo previdno. Delamo le v digestoriju, vedno uporabljamo posebne neprepustne rokavice in ga shranjujemo v temnem prostoru. V temnem prostoru prav tako shranjujemo gel, ki vsebuje etidijev bromid, saj le-ta razpada na svetlobi.

B. Reagenti

- TAE pufer: pripravimo ga iz 242,0 g Tris baze, 57,1 g 100% ocetne kisline in 100 mL 0,5 M raztopine Na₂EDTA s pH 8,0. Zmes dopolnimo z bidestilirano vodo do končnega volumna 1000 mL in pred uporabo redčimo v razmerju 1:50.

C. Pribor in aparature

Tehnica Exacta 300 EB (TEHTNICA, Železniki, Slovenija), 200 mL erlenmajerica, 100 mL merilni valj, urno stekelce, mikroovalovna pečica (Moulinex), polavtomatska pipeta Eppendorf, nastavki za pipeto (Sarstedt), mali nosilec za vlivanje gela (10x15x0,5 cm), glavniček za tvorbo žepkov v gelu za detekcijo izolirane DNA (BioRad).

V erlenmajerico smo natehtali 1,5 g agaroze in dodali 75 mL 1x TAE pufra. Erlenmajerico smo postavili na tehnico, starirali in jo pokrili z urnim stekлом. V mikroovalovni pečici smo zmes segrevali do bistre prozorne raztopine. Na tehnici smo dodali izparelo vodo. V digestoriju smo raztopini dodali še 4 µL etidijevega bromida, premešali in zmes vlili v pripravljen model z vstavljenima glavničkoma (30 žepkov) za tvorbo žepkov v gelu za detekcijo izolirane DNA. Gel smo pustili 30 minut, da se je strdil, in nato previdno odstranili

glavnička. Gel smo iz modela prenesli v plastično vrečko, saj smo tako preprečili njegovo izsušitev, in ga do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4°C.

➤ Izvedba elektroforeze

A. Kemikalije

Označevalec velikosti DNA, ki vsebuje fragmente dolžin 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp (PCR Markers G316A, PROMEGA Corp., Madison, WI, ZDA)

B. Reagenti

- nanašalni pufer bromfenol modro: natehtamo 0,025 g bromfenol modro, 3 mL glicerola in 7 mL destilirane vode.

C. Pribor in aparature

Kadička za elektroforezo - Wide mini sub-cell GT (BioRad), usmernik napetosti Power Pac 3000 (BioRad), polavtomatska pipeta Eppendorf, avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt), parafilm, dokumentacijski sistem za slikanje gela UVI Pro in program UVI Photo (Uvitec).

3.2. Preverjanje čistosti izolirane DNA

Čistost izolata ocenimo z meritvijo razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm. Vodne raztopine DNA smo redčili v razmerju 1:50 (2 µL DNA + 98 µL ultra čiste vode), izmerili absorbance pri 260 nm in 280 nm in določili razmerje $A_{260/280}$. Priporočljiva vrednost je med 1,8-2,0. Nižje vrednosti (<1,8) nakazujejo na prisotnost večje količine proteinov, medtem ko vrednosti nad 2,0 nakazujejo na prisotnost RNA. Spektrofotometer nam je poleg absorbanc in razmerja absorbanc podal tudi koncentracijo nukleinskih kislin in proteinov v µg/mL, ki jo je izračunal po Warburg-Christianovi enačbi na sledeč način (44):

$$\text{Proteini: } c(\mu\text{g/ml}) = ((A_1 \times k_1 + A_2 \times k_2) \times R) / l$$

$$\text{DNA: } c(\mu\text{g/ml}) = ((A_1 \times k_3 + A_2 \times k_4) \times R) / l$$

A_1 = vrednost absorbance pri 260 nm	$k_1 = -757,29$
A_2 = vrednost absorbance pri 280 nm	$k_2 = 1,552$
R = redčenje	$k_3 = 62,90$
l = dolžina žarka (kivete) v cm	$k_4 = -36,00$

Materiali in oprema

Pribor in aparature

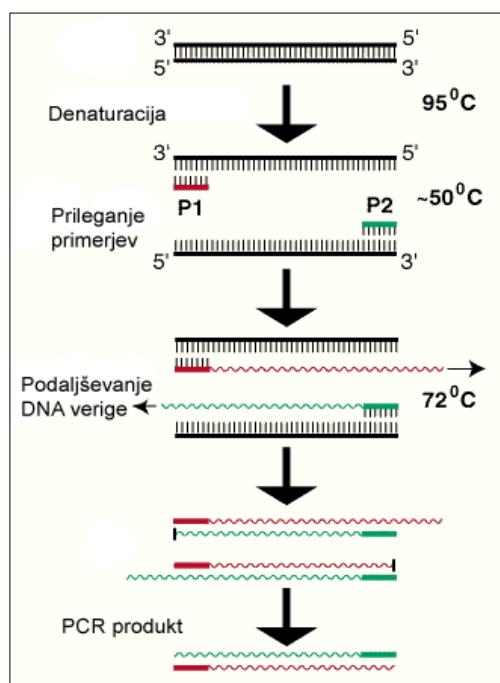
Avtoklavirane 0,5 mL epruvete (Sarstedt), polavtomatska pipeta Eppendorf, avtoklavirani nastavki za pipeto (Sarstedt), mikrokivete 10 mm (Hellma), spektrofotometer UV-VIS DU 530 (Beckman Coulter), spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

4. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) je učinkovita *in vitro* metoda za pomnoževanje določenega odseka DNA v velikem številu kopij. Poteka ciklično v treh stopnjah:

1. denaturacija dvojnoverižne DNA pri temperaturi 90-95°C
2. prileganje oligonukleotidnih začetnikov (angl. primer) na komplementarno mesto v enoverižni DNA pri temperaturi 40-65°C
3. podaljševanje verige DNA s termostabilno DNA-polimerazo pri 72°C.

Stopnje 1-3 predstavljajo en cikel, ki ga ponovimo od 30 do 40-krat. Po zaključenem zadnjem



ciklu sledi faza končnega podaljševanja pri temperaturi 72°C, ki zagotovi popolno izgradnjo verig DNA, ter inkubacija pri 4°C (Slika 10). V prvi stopnji nastale enoverižne DNA služijo kot matrica za sintezo novih odsekov v naslednjem ciklu. Teoretično naj bi se na koncu vsakega cikla število produktov PCR podvojilo in skozi sledeče cikle eksponentno naraščalo po formuli 2^n , pri čemer je n število ciklov. V praksi se izkaže, da doseže reakcija med 30. in 40. ciklom plato, ko dosežemo največjo možno količino produktov PCR, pogosto zaradi akumulacije in naleganja produktov PCR med seboj, prisotnosti inhibitorjev ali omejene količine reagentov (45).

Slika 10: Potek reakcije PCR (P1 in P2: oligonukleotidna začetnika (primerja) 1 in 2)

Sestavine reakcijske zmesi za reakcijo PCR so sledeče:

- vzorec izolirane DNA – matrica
- dva oligonukleotidna začetnika, s katerima opredelimo odsek pomnoževanja
- zmes enakih koncentracij dATP, dCTP, dTTP, dGTP (dNTP)
- termostabilna DNA-polimeraza (*Taq* polimeraza)
- Mg²⁺
- reakcijski pufer

PCR je zelo specifična in občutljiva metoda. Na specifičnost pomnoževanja vpliva izbira tarčnega nukleotidnega zaporedja, pravilen izbor oligonukleotidnih začetnikov ter ustreze koncentracije reagentov v reakcijski mešanici. Najpomembnejši dejavnik specifičnosti je optimalna vezava začetnih oligonukleotidov pred začetkom pomnoževanja. Na občutljivost PCR vpliva izguba vzorčne DNA med izolacijo ali njen razpad med shranjevanjem in prisotnost tuje DNA ali inhibitorjev PCR v vzorcu (45). V izogib kontaminacije je nujna prostorska ločitev stopenj dela. Reakcijsko zmes pripravljamo v najčistejšem območju (prostor pre-PCR), epruvete s PCR produkti pa centrifugiramo in odpiramo v drugem prostoru (post-PCR). Nastavke za pipete in epruvete za PCR pred delom avtoklaviramo, pri delu pa ves čas nosimo lateksove rokavice, ki jih po potrebi zamenjamo. Ob zmehah za vzorce pripravimo še negativno kontrolo, tj. reakcijsko zmes, v kateri vzorčno DNA nadomestimo z vodo, s pomočjo katere lahko izsledimo morebitno kontaminacijo reagentov.

4.1. PCR v realnem času

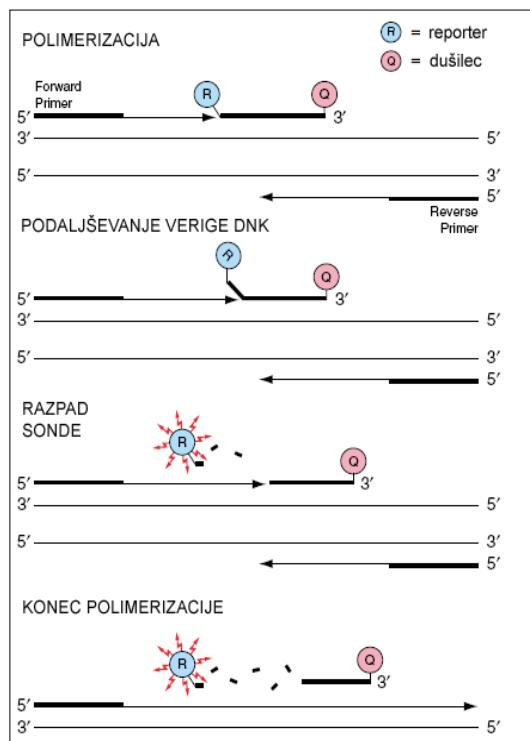
PCR v realnem času je posebna izvedba reakcije PCR, ki omogoča pomnoževanje in merjenje količine produkta PCR v posameznih ciklih med samo reakcijo. Merjenje količine produkta temelji na merjenju fluorescence. Je bolj občutljiva in natančna metoda kot klasični PCR, pomnoževanje DNA in detekcija produktov PCR pa poteka v zaprtem sistemu, kar močno zmanjša možnost kontaminacije (46).

4.1.1. Detekcija produktov PCR v realnem času

Načine za detekcijo produktov PCR v realnem času razdelimo v dve skupini, in sicer glede na to, ali z njimi zaznamo samo specifični produkt ali pa zaznamo tudi morebitno prisotne nespecifične produkte. *Med nespecifične načine detekcije* uvrščamo fluorescentna barvila, kot sta etidijev bromid in SYBR Green I. Pri *specifičnih načinah detekcije* uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide, ki se specifično vežejo na odsek DNA, ki ga pomnožujemo. V ta namen uporabljamo dva fluorofora, katerih ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata. Ko sta fluorofora dovolj blizu, povzroči vzburenje donorskega barvila sevanje svetlobe. Ta vzbudi akceptorsko barvilo, ki posledično seva svetlubo druge valovne dolžine. Kot sprejemnike lahko uporabimo tudi molekule, ki absorbirajo svetlubo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo. Najpogosteje se uporablja hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila (46).

4.1.2. Mehanizem detekcije produktov PCR s sondami TaqMan®

Pri hidrolizirajočih sondah izkoriščamo 5'-eksonukleazno aktivnost DNA-polimeraz. Najpogosteje se uporablja *Taq* polimeraza. V reakcijski zmesi je poleg oligonukleotidnih začetnikov še dodaten oligonukleotid – dvojno označena sonda, ki se specifično veže znotraj tarčnega zaporedja DNA, in ima na obeh koncih vezana različna fluorofora. Na 5' koncu je vezano reportersko barvilo (angl. reporter), ki seva fluorescenco, na 3' koncu pa je vezano drugo barvilo (dušilec, angl. quencher), ki to fluorescenco prestreže. Mehanizem, s katerim dušilec prestreže fluorescenco reporterja, imenujemo FRET (angl. fluorescence resonance energy transfer) in temelji na prenosu energije (ne fotonov) med donorskim in akceptorskim kromoforom, ki sta na razdalji 10 – 100 Å.



Tekom reakcije PCR povzroči 5'-eksonukleazna aktivnost *Taq* DNA-polimeraze hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde v stopnji podaljševanja (od tod ime – *Taq* polimeraza in PacMan). Razdalja med reporterskim barvilm in dušilcem se poveča in onemogoči prestrežanje fluorescencije. Fluorescencija reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna količini produkta PCR (Slika 11).

Reagenti za PCR v realnem času vsebujejo tudi pasivno fluorescenčno barvilo 6-karboksi-X-rodamin (ROX), ki služi kot notranja referenca za normalizacijo fluorescenčnega signala pri analizi podatkov (47).

Slika 11: Potez reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s sondami TaqMan®

Sonde TaqMan® so dolge od 20 - 60 bp, njihova vsebnost gvanina in citozina naj bi bila med 20 in 80 odstotkov, temperatura tališča (T_m) pa za približno 10°C višja od temperature tališča začetnih oligonukleotidov. Novejše sonde imajo na 3' koncu krajšo enojno verigo DNA s posebno strukturo v obliki brazde (MGB, angl. minor groove binder), ki poveča T_m pri določeni dolžini sonde, kar omogoča oblikovanje krajših sond. MGB prav tako deluje kot dušilec fluorescence, dokler je oddaljenost med reporterskim barvilm in vezano DNA na dušilcu majhna (48).

4.1.3 Uporaba sond TaqMan® za alelno diskriminacijo - genotipizacijo

Za učinkovito alelno diskriminacijo enega polimorfizma je potreben par oligonukleotidnih začetnikov ter dve sondi TaqMan®. Prva sonda ima na 5' koncu vezano reportersko barvilo, ki se razlikuje od reporterskega barvila druge sonde. Na 3' koncu imata obe vezano enako barvilo – dušilec. Sondi se razlikujeta v enem baznem paru, tako da ustreza ena izmed sond mutiranemu zaporedju (alel 1), druga pa nemutiranemu (wild-type, alel 2) zaporedju. Ob vezavi sonde na ustrezno zaporedje in porastu fluorescence reporterskega barvila lahko ugotovimo, ali je polimorfizem prisoten ali ne (48, 49).

5. GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA -670G>C V GENU RANK

5.1. Pomnoževanje dela promotorja RANK

5.1.1. Priprava reakcijske zmesi

Z reakcijo PCR smo pomnožili 507 bp dolg odsek promotorja *RANK*. Pred začetkom dela smo s 3% hipokloritom očistili delovno komoro ter ves pribor, ki smo ga uporabili, in prižgali UV žarnico za 30 min. Pri delu smo uporabljali sveže rokavice in čisto haljo. Za serijo 10 vzorcev smo v delovni komori pripravili skupno reakcijsko zmes, ki je vsebovala vse sestavine, razen DNA. Sestava reakcijske zmesi je podana v Preglednici X. Po vsakem dodatku smo zmes dobro premešali, razen po dodatku *Taq* polimeraze. Le-to smo vzeli iz zamrzovalnika tik pred dodatkom v reakcijsko zmes, ostale reagente pa smo pred uporabo odmrznili. V označene epruvete smo odpipetirali po 24,0 µL reakcijske zmesi in dodali 1 µL vzorčne DNA. V slepi vzorec nismo dodali vzorčne DNA, saj nam služi kot negativna kontrola.

Preglednica X: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje odseka promotorja *RANK*

<i>reagent</i>	<i>volumen (µL) za en vzorec</i>
10x pufer Gold	2,5
dNTP	2,5
oligonukleotidni začetnik RANK-P-670GC-F	2,0
oligonukleotidni začetnik RANK-P-670GC-R	2,0
MgCl ₂	1,0
<i>Taq</i> polimeraza	0,1
H ₂ O	13,9
vzorčna DNA	1,0
<i>skupni volumen</i>	25,0

5.1.2. Potek reakcije PCR

Pripravljeni vzorce smo centrifugirali in jih vstavili v ciklični pomnoževalnik (Biometra ali MWG), ki je po predhodno vnesenem programu v določenih časovnih intervalih spremenjal temperaturo (Preglednica XI). Uspešnost reakcije smo preverili z elektroforezo na 2% agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom in produkte reakcije PCR shranili v hladilniku pri temperaturi 4°C.

Preglednica XI: Pogoji za pomnoževanje odseka promotorja RANK (aparaturi: Biometra in MWG)

stopnja PCR	temperatura (°C)	čas
začetna denaturacija	95	10 min
denaturacija	95	45 s
prileganje primerjev	55	30 s
podaljševanje	72	45 s
		število ciklov: MWG - 37 Biometra - 40
končno podaljševanje	72	7 min
inkubacija	4	∞

5.1.3. Preverjanje uspešnosti reakcije PCR z elektroforezo

Za preverjanje uspešnosti reakcije PCR smo izvedli elektroforezo na 2% agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. 2,5 µL produkta PCR smo pomešali z nanašalnim puferom ksilencianol in ga nanesli v žepke agaroznega gela, ki je bil potopljen v 1x TAE pufer v elektroforezni kadički. Kadičko smo zaščitili pred svetlobo in jo priključili na električni tok (U=90V, t=25 min). Po končani elektroforezi smo gel osvetlili s svetlobo valovne dolžine 302 nm in ga slikali z dokumentacijskim sistemom za gele.

Materiali in oprema

A. Kemikalije

Avtoklavirana ultračista voda (aparat ELGA, Purelab Classic), pufer: 10x PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA), 25 mM raztopina MgCl₂ (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA), AmpliTaq Gold® DNA polimeraza (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA); 5U/µL ter delovne raztopine DNA različnih koncentracij in redčitev

B. Reagenti

- 2 mM raztopina dNTP: Raztopino smo pripravili iz 100mM osnovnih raztopin dATP, dGTP, dCTP, dTTP (GeneAmp dNTPs, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, ZDA). V centrifugirko smo odpipetirali 10 µL vsake od osnovnih raztopin ter dodali 490 µL ultračiste avtoklavirane vode.

- Raztopina oligonukleotidnih začetnikov (QIAGEN Operon GmbH, Hilden, Nemčija):
 - RANK-P-670GC-F, $T_m=58,35^{\circ}\text{C}$, redčenje - 1:20, nukleotidno zaporedje:
5'-ACCAAACCAATGTGCAACCT-3'
 - RANK-P-670GC-R, $T_m=60,4^{\circ}\text{C}$, redčenje - 1:20, nukleotidno zaporedje:
5'-CGACTGCAGTTAAGGCATCA -3'

C. Aparature in pribor

Ciklični pomnoževalnik Personal Cycler (Biometra) in MWG Biotech Primus 96 Plus Thermal Cycler, mikrocentrifuga Mikro-242 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija), polavtomatske pipete Eppendorf, avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt), 0,5 mL epruvete, avtoklavirane (Sarstedt), mešalnik Vortex-2 Genie (Scientific Industries), delovna komora z UV lučko (Krom, Ljubljana, Slovenija) in avtoklav A-21 (Kambič, Laboratorijska oprema).

5.2. Analiza polimorfizma -670G>C z RFLP

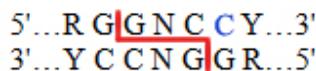
Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, angl. Restriction Fragment Length Polymorphism) je metoda, pri kateri z uporabo restrikcijskih endonukleaz analiziramo zaporedje DNA, ki ga poznamo ali v njem predvidevamo znano spremembo. Restrikcijske endonukleaze so encimi, ki prepozna specifično štiri do osem nukleotidov dolgo zaporedje v molekuli DNA, cepitveno mesto pa je lahko zunaj ali znotraj tega zaporedja. Sprememba v zaporedju za en sam bazni par povzroči izgubo vezavnega mesta za encim in do cepitve ne pride. Z uporabo restrikcijskih endonukleaz v molekularni diagnostiki ugotavljam prisotnost genskih variacij. Za znano zaporedje v genu, kjer pričakujemo spremembo, poiščemo ustrezni encim, ki prepozna bodisi nemutirano zaporedje (genska variacija odstrani to mesto) bodisi mutirano zaporedje (genska variacija uvede restrikcijsko mesto). Na osnovi analize produktov restrikcije prepoznamo prisotnost genske variacije v enem ali obeh aleilih (50).

5.2.1. *EcoO109I* in *BsaHI* RFLP analiza

Za restrikcijsko analizo smo uporabili restrikcijski endonukleazi *EcoO109I* in *BsaHI*. Slednjo smo uporabili kot kontrolo in potrditev restrikcije pri tistih vzorcih, kjer je prišlo do restrikcije z encimom *EcoO109I*, saj *EcoO109I* cepi fragment takrat, ko je prisoten preiskovani polimorfizem, *BsaHI* pa cepi fragment, ko preiskovani polimorfizem ni prisoten.

- *EcoO109I*

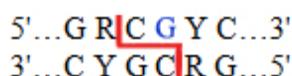
Če je v promotorju gena *RANK* na mestu -670 prisoten nukleotid C namesto G, bo restriksijska endonukleaza Eco0109I prepoznala restriksijsko mesto in cepila sledeče nukleotidno zaporedje:



Legenda
R = A ali G
Y = C ali T

- *BsaHI*

Če je v promotorju gena *RANK* na mestu -670 prisoten nukleotid G in ne C, bo restriksijska endonukleaza BsaHI prepoznala restriksijsko mesto in cepila sledeče nukleotidno zaporedje:



Legenda
R = A ali G
Y = C ali T

5.2.1.1. Priprava restriksijske zmesi

Za serijo vzorcev smo pripravili skupno reakcijsko zmes, ki je vsebovala vse sestavine, razen produkta PCR. Po vsakem dodatku smo zmes dobro premešali. Sestava reakcijske zmesi je podana v Preglednici XII. V označene epruvete smo odpipetirali po 13,0 µL oz. 12,0 µL reakcijske zmesi in v vsako dodali še 2,0 µL oz. 3,0 µL produkta PCR.

Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za EcoO109I in BsaHI analizo RFLP

reagenti	volumen reagenta (µL) za en vzorec
H ₂ O	11,05
NEB 4	1,5
BSA	0,15
Eco0109I	0,3
PCR produkt	2,0
<i>skupni volumen</i>	15,0

reagenti	volumen reagenta (µL) za en vzorec
H ₂ O	10,15
NEB 4	1,5
BSA	0,15
BsaHI	0,2
PCR produkt	3,0
<i>skupni volumen</i>	15,0

5.2.1.2. Pogoji restrikcije

Epruvete z reakcijsko zmesjo smo centrifugirali 1 minuto pri 1000 obratih/minuto. Nato smo jih namestili na plavajoče nosilce in inkubirali čez noč pri temperaturi 37°C. Naslednji dan smo vzeli vzorce iz vodne kopeli in jih ponovno centrifugirali.

5.2.1.3. Ločevanje produktov restrikcije z elektroforezo

Velikost in število fragmentov DNA smo ocenili z elektroforezo na 3% (m/V) agaroznem gelu brez vgrajenega etidijevega bromida. Po elektroforezni ločbi smo glede na položaj in število lis določili genotip preiskovanega vzorca.

Priprava 3% (m/V) agaroznega gela

V erlenmajerico smo natehtali 2,25 g agaroze in dodali 75 mL 1x TAE pufra. Erlenmajerico smo postavili na tehtnico, starirali in jo pokrili z urnim steklom. V mikrovalovni pečici smo zmes segrevali do bistre prozorne raztopine. V digestoriju smo zmes vlili v pripravljen model z vstavljenima glavničkoma (20 žepkov) za tvorbo žepkov v gelu. Gel smo pustili 30 minut, da se je strdil, in nato previdno odstranili glavnička. Gel smo iz modela prenesli v plastično vrečko, saj smo tako preprečili njegovo izsušitev, in ga do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4°C.

Izvedba elektroforeze

Agarozni gel smo položili v nosilec v kadički za elektroforezo in ga prekrili z ustrezno količino pufra TAE. V vsako epruveto z reakcijsko zmesjo smo dali 3,0 µL barvila bromfenol modro, premešali s pipeto in nanesli v ustrezen žepek na gelu. Na gel smo poleg 34 vzorcev nanesli še označevalec velikosti, kontrolo velikosti nerazrezanega produkta PCR in uspešno cepljen produkt PCR kot kontrolo aktivnosti encima. Elektroforeza je potekala 40 minut pri stalni napetosti 90V.

Barvanje gela in odčitavanje rezultatov

Ker smo uporabili agarozni gel brez vgrajenega barvila, smo morali po končani elektroforezi gel naknadno barvati, da smo lahko detektirali produkte restrikcije. Po končani elektroforezi smo gel prenesli v kadičko za barvanje. Uporabili smo barvilo Sybr®Green I in barvanje izvajali na stresalniku 30 minut. Ker je barvilo Sybr®Green I kancerogeno, smo barvanje izvajali v digestoriju, pri rokovanju z barvilom in gelom pa smo uporabljali posebne nepropustne rokavice. Po končanem barvanju smo gel postavili pod UV lučko transluminatorja, z UV dokumentacijskim sistemom ($\lambda=302$ nm) detektirali rezultate elektroforezne ločbe in gel fotografirali.

Materiali in oprema

➤ *Priprava elektroforeznega gela*

A. Kemikalije

Agaroza za PCR (Sigma), TRIS-baza (Fluka), Na₂EDTA x 2 H₂O (Fluka) in destilirana voda.

B. Pribor in aparature

Tehtnica Exacta 300 EB (TEHTNICA, Železniki, Slovenija), 200 mL erlenmajerica, 100 mL meritni valj, urno stekelce, mikrovalovna pečica (Moulinex), mali nosilec za vlivanje gela

(10x15x0,5 cm) in glavniček za tvorbo žepkov v gelu za detekcijo produktov restrikcije (BioRad).

➤ *Izvedba elektroforeze*

A. Kemikalije

Označevalec velikosti DNA, ki vsebuje fragmente dolžin 50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp (PCR Markers G316A, PROMEGA Corp., Madison, WI, ZDA) in bromfenol modro (Fluka).

B. Reagenti

Avtoklavirana bidestilirana voda, pufer NEBuffer 4 (New England BioLabs, Inc., Beverly, MA, ZDA), acetiliran goveji serumski albumin (BSA), 100 µg/mL, (New England BioLabs, Inc., Beverly, MA, ZDA), TAE pufer, restriktijska encima: Eco0109I - 20.000 U/mL (New England BioLabs, Inc., Beverly, MA, ZDA) in BsaHI – 10.000 U/mL (New England BioLabs, Inc., Beverly, MA, ZDA) ter raztopina Sybr®Green I. V digestoriju pripravimo raztopino barvila iz 20 µL Sybr®Green I (Sigma) in 200 mL TAE pufra. Zaradi občutljivosti na svetlobo shranimo raztopino v temno plastenko.

C. Pribor in aparature

Avtoklavirane 1,5 mL epruvete (Sarstedt), polavtomatske pipete Eppendorf, avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt), centrifuga Centric 150 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija), plavajoči nosilci, vodna kopel; T=37°C, kadička za elektroforezo (BioRad), vir napetosti Power Pac 3000 (BioRad), polavtomatska pipeta Eppendorf in parafilm.

➤ *Barvanje gela*

Pribor in aparature

Plastična kadička s pokrovom, kartonska škatla, stresalnik Vibromix 314 EVT (TEHTNICA, Železniki, Slovenia), dokumentacijski sistem za slikanje gelov UVI TEC in program UVI Photo (Uvitec Ltd.).

5.3. Analiza vezave potencialnih transkripcijskih faktorjev v promotorju *RANK*

S pomočjo programa TFSEARCH 1.3. smo ugotovili, da se na področju preiskovanega polimorfizma v promotorju *RANK* lahko vežejo trije transkripcijski faktorji, in sicer le, ko je na mestu -670 nukleotid C in ne G. Ti transkripcijski faktorji so ADR1 (alcohol dehydrogenase gene regulator 1), STRE (stress-responsive element) in CF1 (common factor 1) (51).

6. GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA Sp1 V GENU *COLIA1*

6.1. Pomnoževanje odseka introna 1 *COLIA1*

6.1.1. Priprava reakcijske zmesi

Pred začetkom dela smo s 3% hipokloritom očistili delovno komoro ter ves pribor, ki smo ga uporabili, in prižgali UV žarnico za 30 min. Za serijo 384 vzorcev smo v delovni komori pripravili skupno reakcijsko zmes, ki je vsebovala vse sestavine, razen DNA. TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix, ki vsebuje dva oligonuleotidna začetnika in dve sondi, smo zavarovali z aluminijasto folijo, saj so sonde občutljive na svetlobo. Sestava reakcijske zmesi je podana v Preglednici XIII.

Preglednica XIII: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje odseka introna *COLIA1*

Reagent	volumen (μL) za en vzorec
TaqMan® Universal PCR Master Mix	3,0
40x TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix	0,167
vzorčna DNA	2,833
V(skupni)	6,0

Epruveto s pripravljenou reakcijsko zmesjo smo postavili v predviden prostor v avtomatskem pipetorju Freedom EVO® 75. Zagnali smo računalniški protokol, ki smo ga predhodno pripravili, in odpipetirali reakcijsko zmes iz epruvete v ploščico s 384 vdolbinicami.

6.1.2. Priprava raztopin vzorčnih DNA

Raztopine izolirane DNA smo glede na koncentracijo nukeinskih kislin redčili v razmerju 2:50 (konc. NK < 1500 $\mu g/ml$) oz. 1:100 (konc. NK >1500 $\mu g/ml$). Tako pripravljene raztopine smo ponovno redčili do končne koncentracije 20 ng/2,8 μl . Raztopine vzorčnih DNA smo pripravili v ploščicah z 96 vdolbinicami. V prvo vdolbinico smo namesto vzorčne DNA odpipetirali vodo, ki nam služi kot negativna kontrola. Ploščice smo vstavili v predviden prostor na pipetorju Freedom EVO® 75. Ponovno smo zagnali predhodno pripravljen računalniški protokol in odpipetirali raztopine vzorčne DNA v ploščico z 384 vdolbinicami.

6.1.3. Potek reakcije PCR v realnem času

Ploščico z 384 vdolbinicami, ki vsebujejo rekacijsko zmes in vzorčno DNA, smo previdno pokrili s samolepilno folijo ter jo centrifugirali. Nato smo jo vstavili v ciklični pomnoževalnik LightCycler® 480 Real-Time PCR system, ki po predhodno pripravljenem računalniškem protokolu v določenih časovnih intervalih spreminja temperaturo (Preglednica XIV).

Preglednica XIV: Pogoji za pomnoževanje odseka introna COLIA1 (apartura: LightCycler® 480 Real-Time PCR system)

stopnja PCR	temperatura (°C)	čas
začetna denaturacija	95	10 min
denaturacija	95 60	15 s
prileganje primerjev in podaljševanje		1 min
		število ciklov: 40

Materiali in oprema

- delovne raztopine DNA različnih koncentracij in redčitev

A. Reagenti

- TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), ki vsebuje AmpliTaq Gold DNA polimerazo, AmpErase® uracil-N-glycosylase (UNG), dNTP z dUTP, pasivno referenco (ROX) in pufer.
- 40x TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), ki vsebuje dva oligonukleotidna začetnika in dve TaqMan® MGB sondi:

	reportersko barvilo (na 5' koncu)	dūšilec (na 3' koncu)
sonda 1	VIC®	NFQ
sonda 2	FAM™	NFQ

B. Aparature in pribor

Avtomatski pipetor Freedom EVO® 75 (Tecan), nastavki za pipete (Tecan), ciklični pomnoževalnik LightCycler® 480 Real-Time PCR system (Roche Applied Science), polavtomatske pipete Eppendorf, avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt), avtoklavirane 1,5 mL epruvete (Sarstedt), mikrotitrskie ploščice (96 in 384 vdolbinic), samolepilna folija, mešalnik Vortex-2 Genie (Scientific Industries), delovna komora z UV lučko (Krom, Ljubljana, Slovenija), mikrocentrifuga Mikro-242 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija) in avtoklav A-21 (Kambič, Laboratorijska oprema).

6.2. Detekcija produktov PCR v realnem času

Porast fluorescenčnega signala sledi razpadu sonde, ki se je vezala na komplementarno zaporedje. Tako lahko sklepamo, kateri izmed alelov je prisoten v vzorčni DNA. Korelacija med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA je podana v Preglednici XV.

Preglednica XV: Korelacija med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA

<i>porast fluorescenčnega signala</i>	<i>GENOTIP za polimorfizem Sp1</i>	
le FAM	homozigot za alel 1	GG
le VIC	homozigot za alel 2	TT
VIC in FAM	heterozigot (oba alela)	GT

7. STATISTIČNE METODE

7.1. Primerjava frekvenc genotipov

Za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer se osebki naključno razmnožujejo, ni selekcije vzorcev, dodatnih mutacij in migracij, velja Hardy-Weinberg-ovo načelo. To načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja. Če je relativna frekvenca genotipov v 1. in 2. generaciji enaka, potem je populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (52). Za primerjavo frekvenc smo uporabili χ^2 test za dva neodvisna vzorca.

7.2. Normalnost porazdelitve spremenljivk

Posamezne skupine bolnikov smo razdelili v tri genotipske podskupine (gentotip GG – podskupina 1, genotip GT – podskupina 2, genotip TT – podskupina 3) ter za vsako od podskupin izračunali aritmetično sredino MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene. Za statistično obdelavo smo uporabili program *SPSS for Windows*, verzija 16.1. (SPSS Inc., Illinois, ZDA).

Z One-Sample Kolmogorov-Smirnov testom smo preverili normalnost porazdelitve spremenljivk, ki smo jih uporabili pri statistični obdelavi. Postavili smo ničelno hipotezo, da je distribucija normalna. Če je bila vrednost p večja od stopnje tveganja $\alpha = 0,05$, smo to hipotezo sprejeli in pri nadaljnji statistični obdelavi za primerjanje srednjih vrednosti med

genotipskimi podskupinami uporabili parametrične statistične teste (ANOVA). Če je bila vrednost p manjša od 0,05, smo ničelno hipotezo zavrgli in pri nadaljnji statistični obdelavi uporabili neparametrične statistične teste (Kruskal-Wallisov test) (53).

7.3. Analiza variance enega faktorja (ANOVA) in analiza kovariance (ANCOVA)

Pred nadaljnjim statistično obdelavo smo preverili, ali se genotipske podskupine med seboj razlikujejo po starosti, telesni višini, telesni masi in ITM, pri pomenopavznih preiskovankah pa smo preverili tudi, ali se razlikujejo po letu pričetka menopavze in trajanju le-te. Postavili smo ničelno hipotezo, da se genotipske podskupine med seboj ne razlikujejo glede na opisane značilnosti. V primeru, da je bila vrednost p večja od stopnje tveganja $\alpha = 0,05$, smo sprejeli ničelno hipotezo in za statistično obdelavo uporabili test analize variance enega faktorja (ANOVA). Če je bila vrednost p manjša od 0,05, smo dotično značilnost vključili v nadaljnjo analizo kot kovariato in izvedli test analize kovariance (ANCOVA). Ta test smo uporabili le v primeru pomenopavznih preiskovank (cela skupina), kjer je bila kovariata starost, odvisna spremenljivka pa MKG, na katero ima starost dokazan vpliv. Pred testom ANCOVA smo izvedli Levenov test enakosti varianc. ANCOVA je veljavna v primeru, da je vrednost p večja od stopnje tveganja $\alpha = 0,05$.

Z uporabo testov ANOVA, Kruskal-Wallis in ANCOVA smo primerjali povprečne vrednosti:

- MKG kolka, ledvenih vretenc in vratu stegnenice med skupinami preiskovancev z genotipi GG, GT in TT za polimorfizem Sp1
- RANKL, OPG, osteokalcina, CTX, bALP, DPYR, katepsina K med skupinami preiskovancev z genotipi GG, GT in TT za polimorfizem Sp1

Postavili smo ničelno hipotezo, da med povprečnimi vrednostmi v posameznih skupinah ni razlike. Če je bila vrednost p večja od stopnje tveganja $\alpha = 0,05$, je bila razlika med povprečnimi vrednostmi statistično neznačilna (nesignifikantna - NS) in smo sprejeli ničelno hipotezo. V nasprotnem primeru ($p < 0,05$) je bila razlika med povprečnimi vrednostmi posameznih skupin statistično značilna (signifikantna – S). Statistično značilnost razlike med povprečnimi vrednostmi smo preverili tudi s Scheffe post-hoc testom, ki nam omogoča prepoznavanje tistih genotipskih podskupin, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo (53).

REZULTATI IN RAZPRAVA

I. OPTIMIZACIJA POSTOPKA GENOTIPIZACIJE

1. IZOLACIJA DNA

Prvi korak k genotipizaciji je izolacija zadostne količine DNA, ki mora biti ustrezne kvalitete. Velikost in kvaliteto izolirane DNA smo preverili z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. Za nadaljnje delo je pomembna tudi koncentracija in čistost DNA. To smo določili s pomočjo spektrofotometra, ki je podal koncentracijo raztopine DNA ter razmerje absorbanc pri 260 in 280 nm. Na osnovi tega razmerja smo ocenili čistost izolata. Priporočljivo je, da je to razmerje med 1,8 in 2,0. Rezultati izolacije so zbrani v Prilogi 1. Zaradi močne onečiščenosti s proteini so bili nekateri izolati očiščeni z modificirano metodo ekstrakcije z organskimi topili (44).

2. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

PCR je občutljiva metoda in naša prva naloga pri pomnoževanju DNA je bila optimizacija pogojev reakcije. Najbolj kritični dejavniki, ki vplivajo na potek reakcije, so:

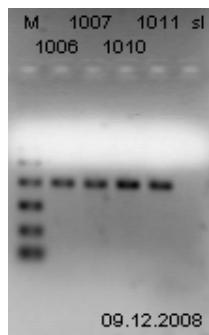
- sestava reakcijske zmesi
- število ciklov
- temperatura in čas posameznih stopenj v fazi cikličnega pomnoževanja

Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje gena *RANK* niso bili predhodno določeni. Pri izboru oligonukeotidnih začetnikov smo morali zadostiti nekaterim pogojem, kot je dolžina (20-28 bp), podobna temperatura tališča (T_m), skupna vsebnost baz gvanina in citozina pa mora biti med 40 in 55%. Oligonukeotidni začetniki ne smejo biti medsebojno komplementarni. Temperaturo prileganja smo določili kot $(Tm_1+Tm_2)/2 - 5^{\circ}\text{C}$, kar v našem primeru znaša $59,4^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C} = 54,4^{\circ}\text{C}$. Nadalje smo optimizirali količino Mg^{2+} ionov, ki so kofaktorji DNA-polimeraze. Njihova koncentracija bistveno vpliva na učinkovitost in specifičnost pomnoževanja, ker pa se vežejo tudi na dNTP in matrično DNA, je potrebno koncentracijo Mg^{2+} ionov prilagoditi za vsak odsek posebej. Optimizacija je predstavljena na Sliki 12, kot

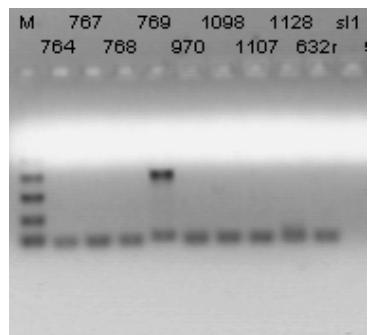
optimalno količino Mg^{2+} ionov pa smo izbrali tisto, pri kateri ni prišlo do nespecifičnega pomnoževanja DNA tj. $1\mu\text{l}$.



Slika 12



Slika 13



Slika 14

Slika 12: Optimizacija količine $MgCl_2$ pri reakciji PCR (1: $1\mu\text{l}$, 2: $2\mu\text{l}$, itn); **Slika 13:** Elektroforeza produktov PCR na 2% agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom (1006 – 1011: označe vzorcev); **Slika 14:** Sekundarni PCR (764 – 632r: označe vzorcev); M: označevalec velikosti DNA (marker), sl: slepi vzorec oz. negativna kontrola

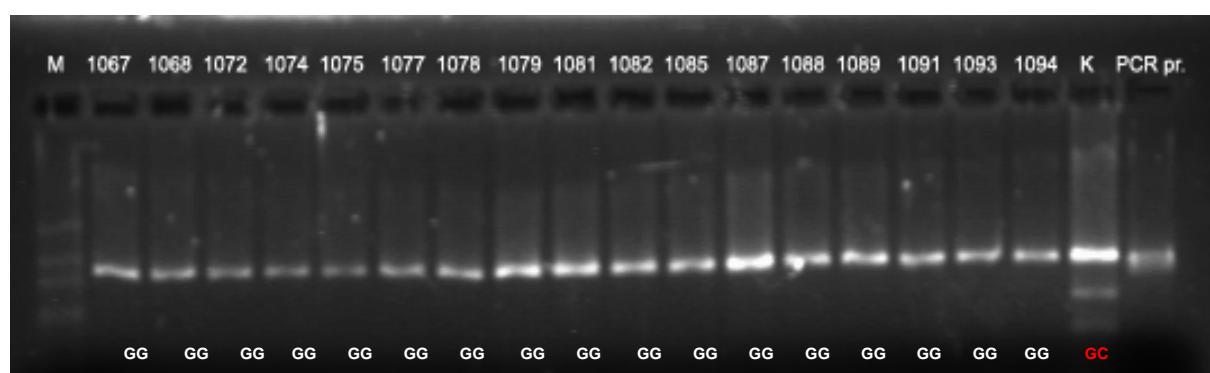
Količino ostalih reagentov in število ciklov smo določili na osnovi poznavanja teorije PCR in priporočil proizvajalcev reagentov. Ker smo pri delu uporabljali dva različna ciklična pomnoževalnika, smo opravili tudi prenos PCR reakcije z ene na drugo aparaturo, ki je vključevala spremembo števila ciklov, tako da smo pri obeh dobili primerljive rezultate.

Reakcijo PCR smo izvedli za vseh 721 vzorcev. Čistost, količino in dolžino produktov PCR smo preverili z elektroforezo na 2% agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom (Slika 13). Pri 21 vzorcih reakcija PCR ni bila uspešna, bodisi zaradi prevelike količine proteinov v vzorčni raztopini DNA, ki delujejo zaviralno na *Taq*-polimerazo, bodisi zaradi razpada ali premajhne koncentracije vzorčne DNA. Pri takšnih vzorcih smo najprej izvedli sekundarni PCR, kar pomeni, da smo v osnovno reakcijsko zmes za reakcijo PCR namesto vzorčne DNA dodali produkt PCR ustreznega vzorca. Sekundarni PCR je bil uspešen za 2 vzorca, pri ostalih 19 pa smo pri nadaljnji reakciji PCR uravnavali reakcijske pogoje. Povišali smo količino dNTP (do $2,8\mu\text{l}$), oligonukleotidnih začetnikov (do $3,0\mu\text{l}$), $MgCl_2$ (do $3,0\mu\text{l}$), *Taq*-polimeraze (do $0,15\mu\text{l}$) in DNA ($0,8\mu\text{L}$ do $2,0\mu\text{L}$) ter ustrezno prilagodili količino vode, tako da je bil končni volumen zmesi $25,0\mu\text{L}$. Število ciklov smo povišali do 50. Tako optimizirana reakcija PCR je bila uspešna za 18 vzorcev. Kljub temu, da so pri reakciji nastali dimeri oligonukleotidnih začetnikov, ki so v presežku (kratki fragmenti na Sliki 14), le-ti zaradi svoje dolžine (okrog 50 bp) niso bili moteči pri nadaljnji analizi RFLP. Za dva izmed 721 vzorcev (768 in 772) reakcija PCR ni bila uspešna in smo ju izločili iz genotipizacije. Pri 4 vzorcih od

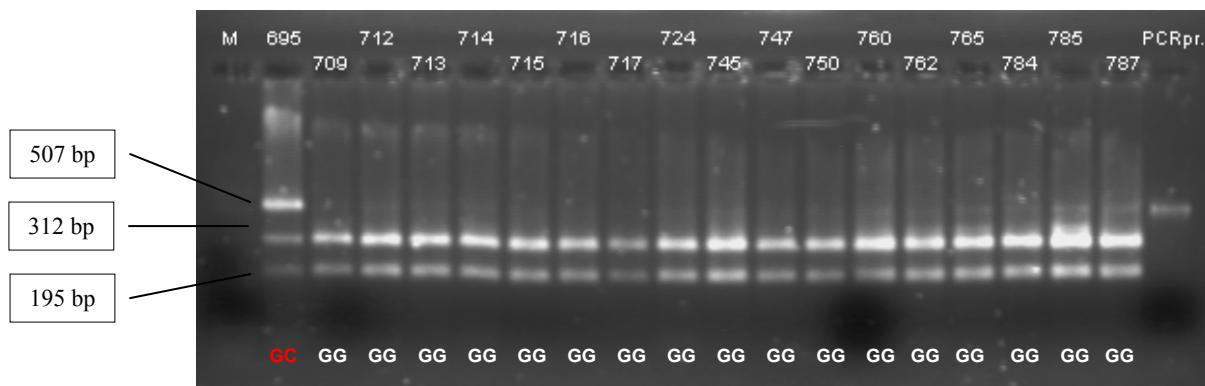
721 je bila količina vzorčne raztopine DNA nezadostna za izvedbo reakcije PCR, zato smo tudi te vzorce izključili iz genotipizacije.

3. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV IN DOLOČANJE GENOTIPOV

Za analizo RFLP smo uporabili restrikcijski endonukleazi *Eco0109I* in *BsaHI*. Ugotovljali smo prisotnost polimorfizma -670G>C v genu *RANK*. *Eco0109I* cepi restrikcijsko mesto takrat, ko je prisoten preiskovani polimorfizem, *BsaHI* pa cepi restrikcijsko mesto v primeru, ko preiskovani polimorfizem ni prisoten. Uporabili smo ga za kontrolo vzorcev, pri katerih smo z restrikcijo z *Eco0109I* dobili več fragmentov, in pri tistih vzorcih, kjer so bili rezultati nejasni. Nastali fragmenti se razlikujejo po dolžini, zato smo jih lahko identificirali po ločbi z elektroforezo na 3% agaroznem gelu. Elektroforezi je sledilo 30 minutno barvanje gela s Sybr®Green I in slikanje gela pod UV-lučko. Če je bilo potrebno, smo barvanje podaljšali za 15 minut. Rezultati cepitve so predstavljeni na Sliki 15 (*Eco0109I*) in Sliki 16 (*BsaHI*). Pri cepitvi z *Eco0109I* (Slika 15) smo kot kontrolo (K) uporabili produkt PCR vzorca, pri katerem je bila cepitev uspešna in na ta način preverili delovanje encima. Pri cepitvi z *BsaHI* smo upoštevali, da je bila ta uspešna na obeh alelih tudi v primeru, ko se je videla zgornja lisa, ki ustreza 507 bp, le če je bila njena jakost mnogo manjša kot jakost spodnjih dveh lis (primer: Slika 16, vzorec št. 787). Takšen rezultat je posledica nepopolne cepitve in ne prisotnosti preiskovanega polimorfizma.



Slika 15: Elektroforeza produktov cepitve z encimom *Eco0109I* (1067 - 1094: oznake vzorcev; M: označevalec velikosti DNA, K: kontrola – razcepljen produk PCR, PCR pr.: nerazcepljen produk PCR)



Slika 16: Elektroforeza produktov cepitve z encimom *BsaHI* (695 -787: oznake vzorcev; M: označevalec velikosti DNA (marker – slabo viden), PCR pr.: nerazcepljen produkt PCR)

Na osnovi lis smo določili genotipe, kot je predstavljeno v Preglednici XVI. Vseh 715 vzorcev smo uspešno genotipizirali. Rezultati so podani v Prilogi 2.

Preglednica XVI: Določitev genotipa preiskovanca na podlagi analize RFLP

-670 G>C				
	<i>Eco0109I</i>		<i>BsaHI</i>	
genotip	št. fragmentov	velikost fragmentov	št. fragmentov	velikost fragmentov
GG	1	507 bp	2	312 bp in 195 bp
GC	3	507 bp, 312 bp in 195 bp	3	507 bp, 312 bp in 195 bp
CC	2	312 bp in 195 bp	1	507 bp

Če *Eco0109I* ne prepozna restrikcijskega mesta, ne pride do cepitve in dobimo nerazcepljen fragment dolžine 507 bp. Odsotnost restrikcijskega mesta označimo s črko G. Genotip GG predstavlja homozigotno osebo, ki nima restrikcijskega mesta na nobenem alelu. V primeru tranzicije G>C na mestu -670 encim prepozna restrikcijski mesto in ga cepi. Dobimo dva fragmenta velikosti 195 bp in 312 bp. Prisotnost restrikcijskega mesta označimo s črko C. Genotip CC predstavlja homozigotno osebo s prisotnim restrikcijskim mestom na obeh alelih. Genotip GC pa predstavlja heterozigotno osebo s prisotnim restrikcijskim mestom le na enem alelu, zato dobimo tri fragmente velikosti 507 bp, 312 bp in 195 bp.

Če *BsaHI* ne prepozna restrikcijskega mesta, ne pride do cepitve in dobimo nerazcepljen fragment dolžine 507 bp. Odsotnost restrikcijskega mesta označimo s črko C. Genotip CC predstavlja homozigotno osebo, ki nima restrikcijskega mesta na nobenem alelu (ima pa na obeh alelih prisoten preiskovani polimorfizem). Če *BsaHI* prepozna restrikcijski mesto in ga

cepi, dobimo dva fragmenta velikosti 312 bp in 195 bp. Prisotnost restriktijskega mesta označimo s črko G. Genotip GG predstavlja homozigotno osebo s prisotnim restriktijskim mestom na obeh alelih (vendar brez preiskovanega polimorfizma na katerem izmed alelov). Genotip GC pa predstavlja heterozigotno osebo s prisotnim restriktijskim mestom le na enem alelu, zato dobimo tri fragmente velikosti 507 bp, 312 bp in 195 bp.

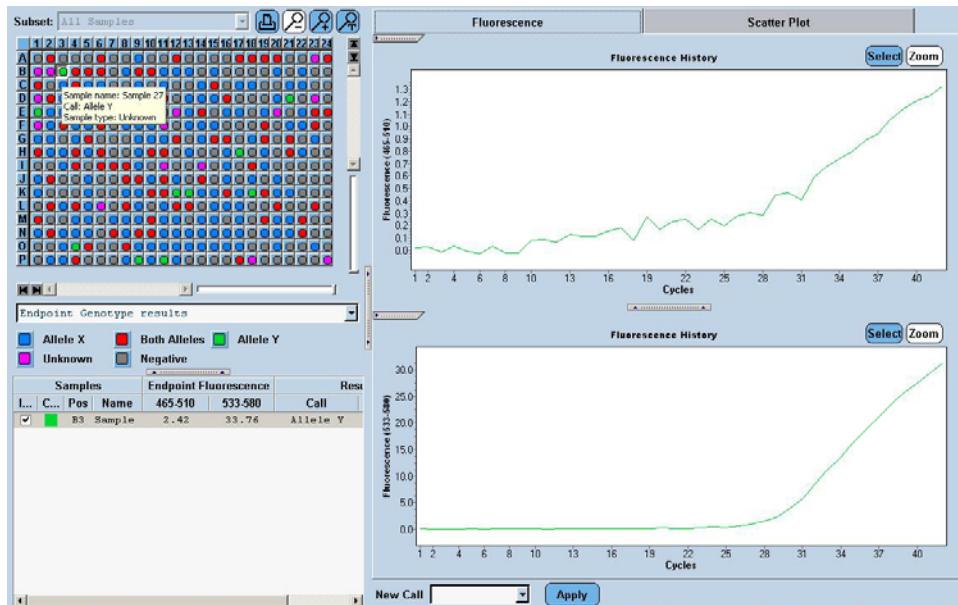
4. GENOTIPIZACIJA S SONDAMI TAQMAN[®]

V primeru *COLIA1* Sp1 polimorfizma smo se odločili za genotipizacijo s sondami TaqMan[®], saj je analiza RFLP po predhodnih izkušnjah precej težavna, zamudna in lahko daje nezanesljive rezultate.

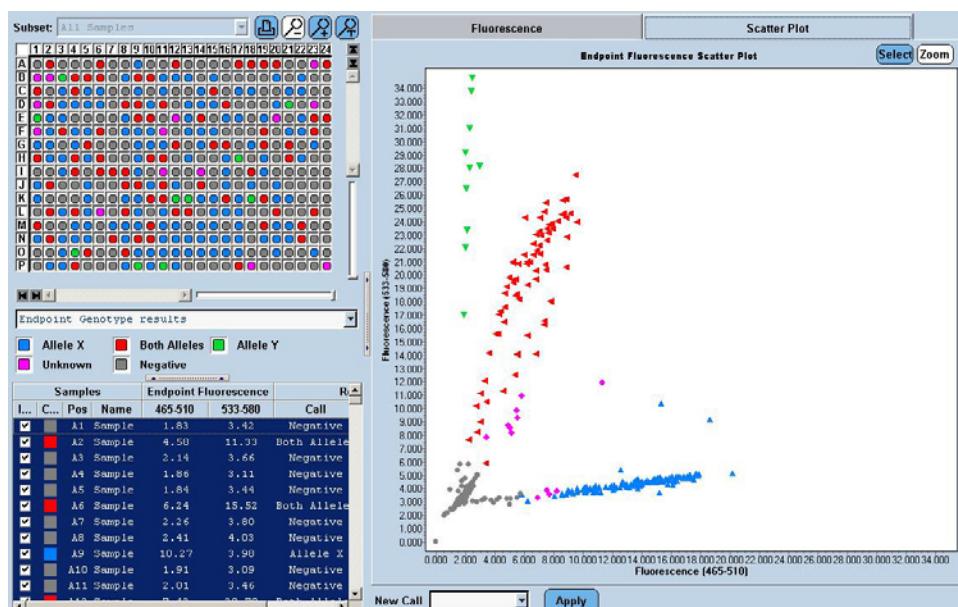
Vse vzorce je bilo potrebno predhodno razredčiti na koncentracijo 20 ng/2,8 µl, ki je optimalna koncentracija DNA za izvedbo genotipizacije. Za pipetiranje reakcijske mešanice in vzorčne DNA smo uporabili avtomatski pipetor EVO[®]75 (Slika 17), zato smo pred pričetkom genotipizacije preverili ustreznost pipetiranja na 32 vzorcih. Genotipizacijo smo izvedli na dveh ploščicah z 384 vdolbinicami, ki smo jih po končanem pipetiranju vstavili v ciklični pomnoževalnik LightCycler[®]480 (Slika 17). Pri preračunu količine reagentov za 384 vzorcev smo zaradi morebitnih izgub na aparaturi upoštevali 12% pribitek. Pogoji reakcije PCR so bili predhodno določeni in jih ni bilo potrebno optimizirati. Reakcija PCR je bila uspešna za 471 vzorcev (Slike 18 in 19). Pri preostalih 250 vzorcih smo osnovne raztopine DNA redčili v razmerju 1:25 (1 µl raztopine DNA + 24 µl vode). Tako pripravljenim raztopinam smo ponovno izmerili koncentracijo DNA, ki je v več primerih nekoliko odstopala od pričakovanih vrednosti oz. predhodno izmerjenih koncentracij. Vzrok za takšno odstopanje bi bil lahko razpad vzorčnih DNA, naključje pri zajemanju vzorca, saj raztopina DNA ni homogena, pa tudi drugačna naprava za merjenje koncentracije raztopine DNA. Ponovno merjenje smo izvedli z spektrofotometrom NanoDrop ND-1000, ki je enostavnejši za uporabo kot spektrofotometer UV-VIS DU 530, s pomočjo katerega so bile prvič izmerjene koncentracije vzorčnih raztopin DNA. Na podlagi dobljenih rezultatov smo pripravljeno raztopino (redčeno 1:25) ponovno redčili do končne koncentracije 20 ng/2,8 µl. Ponovna izvedba reakcije PCR je bila uspešna za 239 vzorcev, pri 21 vzorcih pa ni bila uspešna. To so bili vzorci, pri katerih smo imeli že težave pri reakciji PCR za polimorfizem -670G>C, zato lahko sklepamo na onesnaženost vzorca s proteini ali razpad vzorčne DNA. Takšne vzorce smo izločili iz nadaljnje statistične obdelave.



Slika 17: Avtomatski pipetor EVO®75 in ciklični pomnoževalnik LightCycler® 480



Slika 18: Rezultat genotipizacije s sondami TaqMan® (alelna diskriminacija). Na sliki je krivulja (spodaj) za vzorec z genotipom TT ("Allele Y"), pri katerem pride do porasta fluorescence VIC pri 530-580 nm.



Slika 19: Razpršeni prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan® (alelna diskriminacija). Zelena barva: genotip TT, rdeča barva: genotip GT, modra barva: genotip GG. Sivo in roza barvo so označeni neuspeli vzorci.

II. UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMOV

Genetski polimorfizem pomeni prisotnost dveh ali več različnih alelov enega gena v populaciji, ki se pojavlja s pogostostjo $> 1\%$.

V primeru polimorfizma -670G>C smo z analizo RFLP ugotovili prisotnost restriktivnega mesta le pri 6 preiskovancih, ki so imeli genotip GC. Frekvenca genotipa znaša 0,8 %. Do sedaj so bile za frekvenco genotipa GC objavljene vrednosti v korejski populaciji (24,4%), za Azijce (29,5%) in prebivalce sub-saharske Afrike (8,3%). Za kavkazijce frekvenca genotipa GC še ni bila objavljena. Frekvence proučevanega polimorfizma -670 G>C znašajo 99,2 % : 0,8% : 0% za genotipe GG : GC : CC. Za primerjavo frekvenc smo uporabili χ^2 test za dva neodvisna vzorca in ugotovili, da se v slovenski populaciji frekvence proučevanega polimorfizma -670G>C porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem. Po primerjavi podatkov za vseh šest preiskovancev nismo našli korelacije med polimorfizmom -670 G>C v genu RANK in MKG, saj je imelo vseh šest preiskovancev MKG primerljivo z MKG drugih preiskovancev. Podatki so podani v Preglednici XVII.

Preglednica XVII: Vrednosti izmerjenih parametrov za heterozigote za polimorfizem -670G>C v genu RANK

Oznaka	spol	starost	višina	masa	ITM	MKGfn	MKGtot	MKGls	Tfn	Ttot	Tls
695	Ž	70	164	86	32	0,642	0,808	0,82	-2,5	-1,4	-2,1
794	Ž	77	156	59	24,2	0,588	0,715	1	-2,4	-1,9	-0,4
950	Ž	68	166	70	25,4	0,709	0,843	1,09	-1,9	-1,2	0,38
1124	M	73	188	93	26,3	0,929	1,098	1,43	-1,1	0,1	1,7
71 opg	Ž	46	167	59	21,2	0,78	1,065		0,83	1	
123 F	Ž	75	160	62	24,2	0,398	0,505	0,7			

Frekvenco *COLIA1* Sp1 polimorfizma smo izračunali na osnovi dobljenih genotipov z genotipizacijo s sondami TaqMan®. Rezultati so podani v Preglednici XVIII.

Preglednica XVIII: Frekvence (%) posameznih genotipov za *COLIA1* Sp1 polimorfizem v preučevanih skupinah

Skupina	GG [%]	GT [%]	TT [%]
pomenopavzne preiskovanke	58,5	31,9	6,0
zdrave pomenopavzne preiskovanke	57,0	32,3	6,4
pomenopavzne osteoporozne bolnice	60,0	31,4	5,7
premenopavzne preiskovanke	68,4	26,3	3,5
moški	55,6	35,0	5,1
zdravljene z raloksifenom	66,1	26,8	7,1
zdravljene z alendronatom	57,7	36,5	3,8

Tudi druge raziskave po svetu kažejo podobno frekvenčno porazdelitev genotipov za *COLIA1* Sp1 polimorfizem za kavkazijce, ki znaša približno 65% : 31% : 4% za genotip GG:GT:TT (38). Za primerjavo frekvenc smo uporabili χ^2 test za dva neodvisna vzorca in ugotovili, da se v slovenski populaciji frekvence genotipov za polimorfizem Sp1 v *COLIA1* porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem.

III. OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV Z MINERALNO KOSTNO GOSOTO IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE

1. POMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V statistično obdelavo smo vključili 463 pomenopavznih preiskovank, ki jim je bila izmerjena MKG ledvenih vretenc, kolka in vratu stegnenice ter serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX, kostne alkalne fosfataze in OPG. V Preglednici XIX so podane povprečne vrednosti in rezultati testov ANOVA, ANCOVA in Kruskal-Wallis.

Preglednica XIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah (N - število preiskovancev, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, MKG fn - MKG vratu stegnenice, MKG tot - MKG kolka, OC - osteokalcin, CTX - C-terminalni telopeptid, BALP - kostna alkalna fosfataza)

Genotip	MKG ls [kg/m ²]	MKG fn [kg/m ²]	MKG tot [kg/m ²]	RANKL [pmol/l]	pOC [µg/l]	CTX [pmol/l]	sBALP [µg/l]	sOPG [pmol/l]
GG	0,8584 ± 0,1700 [N=281]	0,6876 ± 0,1262 [N=281]	0,8254 ± 0,1482 [N=280]	0,2842 ± 0,3277 [N=88]	22,1283 ± 13,018 [N=92]	4088,12 ± 2110,895 [N=86]	12,7619 ± 5,6001 [N=94]	107,0310 ± 173,5741 [N=115]
GT	0,8619 ± 0,1627 [N=151]	0,7086 ± 0,1302 [N=153]	0,8542 ± 0,1404 [N=152]	0,4546 ± 0,7003 [N=59]	21,3340 ± 11,6960 [N=47]	3955,26 ± 1883,63 [N=59]	11,6675 ± 3,5220 [N=52]	107,7962 ± 212,5588 [N=72]
TT	0,8325 ± 0,1303 [N=29]	0,6861 ± 0,0954 [N=29]	0,8244 ± 0,1282 [N=29]	0,5187 ± 0,4584 [N=15]	22,3000 ± 11,4529 [N=12]	4843,34 ± 2884,59 [N=14]	12,1055 ± 7,5438 [N=11]	108,3711 ± 150,0392 [N=18]
<i>p</i>	0,458 (NS)	0,234 (NS)	0,114 (NS)	0,074 <i>(mejna S)</i>	0,949 (NS)	0,366 (NS)	0,468 (NS)	0,676 (NS)

Pri pomenopavznih preiskovankah z genotipom GT ($0,4546 \text{ pmol/l} \pm 0,7003 \text{ pmol/l}$) ter TT ($0,5187 \text{ pmol/l} \pm 0,4584 \text{ pmol/l}$) je povprečna vrednost RANKL višja kot pri preiskovankah z genotipom GG ($0,2842 \text{ pmol/l} \pm 0,3277 \text{ pmol/l}$) in lahko govorimo o razliki med povprečnimi vrednostmi, ki pa je statistično mejno značilna ($p=0,074$). Zaradi višje koncentracije RANKL je pospešena osteoklastogeneza in razgradnja kostnine, kar se fenotipsko kaže kot osteoporozu. Rezultat bi bilo potrebno potrditi na večjem številu preiskovancev. V populaciji

pomenopavznih preiskovank nismo dokazali statistično značilne povezave med Sp1 polimorfizmom in MKG.

Nadalje smo skupino pomenopavznih preiskovank razdelili na dve skupini – zdrave preiskovanke in osteoporozne bolnice. Kriterij za razdelitev preiskovank v skupini je bila T-vrednost.

1.1. Zdrave preiskovanke

V statistično obdelavo smo vključili 225 zdravih pomenopavznih preiskovank, s T-vrednostjo $> -2,5$ SD. Izmerjena jim je bila MKG ledvenih vretenc, kolka in vratu stegnenice ter serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX, kostne alkalne fosfataze in OPG. V Preglednici XX so podane povprečne vrednosti in rezultati testov ANOVA in Kruskal-Wallis.

Preglednica XX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah (N - število preiskovancev, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, MKG fn - MKG vratu stegnenice, MKG tot - MKG kolka, OC - osteokalcin, CTX - C-terminalni telopeptid, BALP - kostna alkalna fosfataza)

Genotip	MKG ls [kg/m ²]	MKG fn [kg/m ²]	MKG tot [kg/m ²]	RANKL [pmol/l]	pOC [μg/l]	CTX [pmol/l]	sBALP [μg/l]	sOPG [pmol/l]
GG	0,9852 ± 0,1430 [N=134]	0,7646 ± 0,1254 [N=134]	0,9167 ± 0,1418 [N=133]	0,3441 ± 0,3574 [N=54]	14,8846 ± 6,1791 [N=39]	3961,44 ± 2032,92 [N=51]	12,3873 ± 4,1543 [N=22]	158,3269 ± 184,7567 [N=54]
GT	0,9797 ± 0,1387 [N=75]	0,7836 ± 0,1219 [N=76]	0,9321 ± 0,1361 [N=76]	0,4040 ± 0,6136 [N=40]	15,1148 ± 5,3983 [N=27]	3966,31 ± 1893,83 [N=39]	10,8647 ± 3,3618 [N=15]	121,0968 ± 152,9270 [N=40]
TT	0,9187 ± 0,1083 [N=15]	0,7372 ± 0,0804 [N=15]	0,9053 ± 0,1041 [N=15]	0,4875 ± 0,3980 [N=8]	17,0500 ± 3,3742 [N=8]	3668,59 ± 1690,57 [N=8]	12,2600 ± 4,7557 [N=6]	236,0800 ± 145,3116 [N=8]
<i>p</i>	0,219 (NS)	0,322 (NS)	0,665 (NS)	0,290 (NS)	0,616 (NS)	0,920 (NS)	0,507 (NS)	0,259 (NS)

Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili statistično značilne povezave polimorfizma Sp1 s povprečnimi vrednostmi MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

1.1.1. Primerjava rezultatov z objavljenimi študijami

Keen in sodelavci so v raziskavi, v katero so vključili 185 zdravih pomenopavznih preiskovank, ugotovili statistično značilno povezavo med alejom T in znižano MKG ledvenih vretenc ($p=0,02$) ter s povišano koncentracijo piridinolina v urinu ($p<0,05$) (42).

1.2. Osteoporozne bolnice

V statistično obdelavo smo vključili 238 pomenopavznih osteoporoznih bolnic, s T-vrednostjo $<-2,5$ SD. Izmerjena jim je bila MKG ledvenih vretenc, kolka in vratu stegnenice ter serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX, kostne alkalne fosfataze in OPG. Po primerjavi povprečnih vrednosti izmerjenih parametrov (Preglednica VIII) smo ugotovili, da imajo pomenopavzne osteoporozne bolnice nižje vrednosti MKG kot zdrave pomenopavzne preiskovanke, kar kaže na povečano kostno razgradnjo pri osteoporoznih bolnicah. Vrednosti osteokalcina, BALP (oba biokemijska kazalca kostne tvorbe) in CTX (biokemijski kazalec kostne razgradnje) so višje, vrednosti RANKL in OPG pa nižje v primerjavi zdravimi pomenopavznimi preiskovankami, kar ustrezna povečani inteziteti kostne premene. V Preglednici XXI so podane povprečne vrednosti in rezultati testov ANOVA in Kruskal-Wallis.

Preglednica XXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih osteoporoznih bolnicah (N - število preiskovancev, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, MKG fn - MKG vratu stegnenice, MKG tot - MKG kolka, OC - osteokalcin, CTX - C-terminalni telopeptid, BALP - kostna alkalna fosfataza)

Genotip	MKG ls [kg/m ²]	MKG fn [kg/m ²]	MKG tot [kg/m ²]	RANKL [pmol/l]	pOC [μg/l]	CTX [pmol/l]	sBALP [μg/l]	sOPG [pmol/l]
GG	0,7429 ± 0,0927 [N=147]	0,6175 ± 0,0763 [N=147]	0,7428 ± 0,0964 [N=147]	0,1891 ± 0,2506 [N=34]	27,4585 ± 14,1545 [N=53]	4272,70 ± 2236,73 [N=35]	12,8764 ± 5,9937 [N=72]	61,6215 ± 150,4193 [N=61]
GT	0,7457 ± 0,0799 [N=76]	0,6347 ± 0,0899 [N=77]	0,7764 ± 0,0943 [N=76]	0,5611 ± 0,8641 [N=19]	29,7300 ± 12,7334 [N=20]	3933,71 ± 1912,34 [N=20]	11,9929 ± 3,5778 [N=37]	91,1706 ± 271,1901 [N=32]
TT	0,7401 ± 0,0784 [N=14]	0,6315 ± 0,0802 [N=14]	0,7379 ± 0,0900 [N=14]	0,5543 ± 0,5502 [N=7]	32,8000 ± 15,2933 [N=4]	6409,67 ± 3532,82 [N=6]	11,9200 ± 10,6734 [N=5]	6,2040 ± 1,9405 [N=10]
<i>p</i>	0,963 (NS)	0,302 (NS)	0,038 (S)	0,043 (S)	0,662 (NS)	0,069 (mejna S)	0,714 (NS)	0,981 (NS)

V primeru MKG kolka in RANKL smo ugotovili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi MKG kolka ($p=0,038$) in RANKL ($p=0,043$) v posmeznih genotipskih podskupinah. S Scheffe post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko, in sicer med povprečnimi vrednostmi MKG kolka v genotipskih podskupinah 1 in 2 ($p=0,046$). Med povprečnimi vrednostmi MKG kolka v genotipskih podskupinah 1 in 3 ($p=0,983$) ter 2 in 3 ($p=0,383$) ni bilo statistično značilne razlike. Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma Sp1 na enem izmed alelov statistično značilno vpliva na vrednost MKG kolka pri pomenopavznih osteoporoznih bolnicah, saj je ta pri preiskovankah z genotipom GT ($0,7764 \text{ kg/m}^2 \pm 0,0943 \text{ kg/m}^2$) statistično značilno višja v primerjavi s

preiskovanci z genotipom GG ($0,7428 \text{ kg/m}^2 \pm 0,0964 \text{ kg/m}^2$; $p=0,046$), kar odstopa od pričakovanih rezultatov. Glede na povprečne vrednosti bi lahko sklepali, da je prisotnost Sp1 polimorfizma na obeh alelih (genotip TT) povezana z nižjo MKG kolko ($0,7379 \text{ kg/m}^2 \pm 0,0900 \text{ kg/m}^2$) v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG in GT, vendar ta povezava ni statistično značilna.

Scheffe post-hoc testa v primeru RANKL nismo izdvedli, saj smo za statistično obdelavo uporabili neparametrični test (Kruskal-Wallisov test). Glede na povprečne vrednosti v posameznih genotipskih podskupinah lahko sklepamo, da prisotnost polimorfizma Sp1 statistično značilno vpliva na vrednost RANKL v serumu, in sicer je ta pri preiskovancih z genotipoma GT ($0,5611 \text{ pmol/l} \pm 0,8641 \text{ pmol/l}$) in TT ($0,5543 \text{ pmol/l} \pm 0,5502 \text{ pmol/l}$) višja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG ($0,1891 \text{ pmol/l} \pm 0,2506 \text{ pmol/l}$). Zaradi višje koncentracije RANKL je pospešena osteoklastogeneza, kar se fenotipsko kaže kot osteoporoza, kar pa ne korelira z MKG, ki ni znižana, ampak povišana.

V primeru CTX lahko govorimo o mejno statistično značilni razliki med povprečnimi vrednostmi CTX v posmeznih genotipskih podskupinah ($p=0,069$). Glede na povprečne vrednosti v posameznih genotipskih podskupinah lahko sklepamo, da prisotnost polimorfizma Sp1 na obeh alelih vodi v povečano koncentracijo CTX (C-terminalnega telopeptida) ($6409,67 \text{ pmol/l} \pm 3532,82 \text{ pmol/l}$), ki je biokemijski kazalec kostne razgradnje. Rezultat bi bilo potrebno preveriti na večjem številu preiskovancev.

V primeru OPG lahko opazimo veliko manjšo povprečno vrednost OPG v serumu pri preiskovankah z genotipom TT ($6,2040 \text{ pmol/l} \pm 1,9405 \text{ pmol/l}$) v primerjavi s preiskovankami z genotipom GG ($61,6215 \text{ pmol/l} \pm 150,4193 \text{ pmol/l}$) in genotipom GT ($91,1706 \text{ pmol/l} \pm 271,1901 \text{ pmol/l}$), vendar razlika med povprečnimi vrednostmi v genotipskih podskupinah ni statistično značilna ($p=0,981$). Posledica nižje vrednosti OPG v serumu je manjša blokada RANKL, kar vodi v pospešeno osteoklastogenezo in večjo razgradnjo kostnine, ki se fenotipsko kaže kot osteoporoza.

1.2.1. Primerjava rezultatov z objavljenimi študijami

Do sedaj je bilo objavljenih že več raziskav o povezanosti polimorfizma Sp1 z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah, ki pa ne dajejo enotnih rezultatov. Prvotne raziskave so bile v prid povezanosti med polimorfizmom Sp1 in

znižano MKG (54, 55, 56, 57). V novejših raziskavah, ki so bile opravljene v več evropskih državah (Velika Britanija, Španija, Irska, Nizozemska, Češka, Finska, Grčija, Švedska) pa so raziskovalci bodisi potrdili (38, 58, 59) bodisi ovrgli povezanost med polimorfizmom Sp1 in MKG ter nekaterimi biokemijskimi kazalci kostne premene (60, 61, 62, 63, 64, 65). Raziskava, ki bi proučila povezavo med polimorfizmom Sp1 in serumsko koncentracijo RANKL pri pomenopavznih preiskovankah še ni bila objavljena.

2. PREMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V statistično obdelavo smo vključili 56 premenopavznih preiskovank, ki jim je bila izmerjena MKG ledvenih vretenc, kolka in vratu stegnenice ter serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX, kostne alkalne fosfataze, OPG in katepsina K. V Preglednici XXII so podane povprečne vrednosti in rezultati testov ANOVA in Kruskal-Wallis.

Preglednica XXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah (N - število preiskovancev, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, MKG fn - MKG vratu stegnenice, MKG tot - MKG kolka, OC – osteokalcin, CTX - C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza)

Genotip	MKG ls [kg/m ²]	MKG fn [kg/m ²]	MKG tot [kg/m ²]	RANKL [pmol/l]	pOC [µg/l]	CTX [pmol/l]	sBALP [µg/l]	sOPG [pmol/l]	katepsin K
GG	1,00895 ± 0,12316 [N=39]	0,78485 ± 0,07293 [N=39]	0,92421 ± 0,08954 [N=38]	0,50513 ± 0,49041 [N=39]	10,16410 ± 3,76881 [N=39]	2649,13158 ± 1180,08635 [N=39]	8,2082 ± 1180,08635 [N=39]	320,9615 ± 55,6688 [N=39]	11,0487 ± 23,9486 [N=39]
GT	1,00007 ± 0,10171 [N=15]	0,78987 ± 0,08379 [N=15]	0,93147 ± 0,08424 [N=15]	0,48000 ± 0,34268 [N=15]	11,06000 ± 6,55753 [N=15]	2708,20000 ± 1798,13452 [N=15]	7,8233 ± 3,9036 [N=15]	296,6000 ± 57,1252 [N=15]	3,2533 ± 5,0219 [N=15]
TT	0,93800 ± 0,072125 [N=2]	0,66600 ± 0,08768 [N=2]	0,75900 ± 0,11031 [N=2]	0,35000 ± 0,07071 [N=2]	14,15000 ± 1,76777 [N=2]	3281,50000 ± 2205,46605 [N=2]	10,5900 ± 0,8627 [N=2]	316,5000 ± 6,3640 [N=2]	7,2000 ± 1,9800 [N=2]
<i>p</i>	0,699 (NS)	0,099 (NS)	0,038 (S)	0,816 (NS)	0,444 (NS)	0,822 (NS)	0,494 (NS)	0,359 (NS)	0,257 (NS)

V primeru MKG kolka smo ugotovili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi MKG kolka v posmeznih genotipskih podskupinah ($p=0,038$). S Scheffe post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko, in sicer med povprečnimi vrednostmi MKG kolka v genotipskih podskupinah 2 in 3 ($p=0,043$) ter v genotipskih podskupinah 1 in 3 ($p=0,045$). Med povprečnimi vrednostmi MKG kolka v genotipskih podskupinah 1 in 2 ni bilo statistično značilne razlike ($p=0,965$). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma Sp1 na obeh alelih statistično značilno vpliva na vrednost mineralne kostne gostote kolka pri premenopavznih ženskah, saj je ta pri preiskovankah z genotipom TT ($0,75900 \text{ kg/m}^2 \pm$

$0,11031 \text{ kg/m}^2$) statistično značilno nižja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GT ($0,93147 \text{ kg/m}^2 \pm 0,08424 \text{ kg/m}^2, p=0,043$) in v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG ($0,92421 \text{ kg/m}^2 \pm 0,08954 \text{ kg/m}^2, p=0,045$). Glede na to, da imata genotip TT le dve preiskovanki, bi bilo potrebno rezultate preveriti na večji skupini preiskovancev. V populaciji premenopavznih preiskovank nismo dokazali statistično značilne povezave med polimorfizmom Sp1 in biokemijskimi kazalci kostne premene.

2.1. Primerjava rezultatov z objavljenimi študijami

Garnero in sodelavci so v študiji OFELY, v katero so vključili 220 premenopavznih preiskovank, potrdili povezavo med polimorfizmom Sp1 in znižano MKG vretenc ($p=0,05$), znižano MKG kolka ($p=0,046$) ter znižano serumsko vrednostjo PICP ($p=0,04$). Niso ugotovili povezave med polimorfizmom Sp1 in ostalimi biokemijskimi kazalci kostne premene (66). Nasprotno, raziskava, v katero so Wynne in sodelavci vključili 130 premenopavznih preiskovank, ni potrdila povezave med Sp1 polimorfizmom in MKG vratu stegnenice ter ledvenih vretenc (63).

3. MOŠKI

V statistično obdelavo smo vključili 112 moških, starih od 55 do 84 let, ki jim je bila izmerjena MKG ledvenih vretenc, kolka in vratu stegnenice ter serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX in OPG. V Preglednici XXIII so podane povprečne vrednosti in rezultati testa ANOVA.

Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm SD$) MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene pri moških (N - število preiskovancev, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, MKG fn - MKG vratu stegnenice, MKG tot - MKG kolka, OC - osteokalcin, CTX - C-terminalni telopeptid)

Genotip	MKG fn [kg/m ²]	MKG tot [kg/m ²]	MKG ls [kg/m ²]	RANKL [pmol/l]	pOC [µg/l]	sCTX [pmol/l]	sOPG [pmol/l]
GG	0,7836 ± 0,1426 (N=48)	1,0018 ± 0,1583 (N=48)	1,0536 ± 0,1757 (N=65)	0,1800 ± 0,1229 (N=10)	10,120 ± 3,9807 (N=10)	2073,20 ± 1386,45 (N=8)	5,0230 ± 0,9610 (N=10)
GT	0,8565 ± 0,1667 (N=34)	1,0628 ± 0,1654 (N=34)	1,0939 ± 0,1746 (N=40)	0,1818 ± 0,1250 (N=11)	7,564 ± 4,0297 (N=11)	1739,07 ± 806,87 (N=10)	6,2936 ± 1,7984 (N=11)
TT	0,7773 ± 0,0843 (N=3)	0,9703 ± 0,0385 (N=3)	0,8743 ± 0,0983 (N=4)	0,2000 (N=1)	16,900 (N=1)	2733,00 (N=1)	3,4800 (N=1)
<i>p</i>	0,099 (NS)	0,200 (NS)	0,016 (S)	0,988 (NS)	0,072 (mejno S)	0,624 (NS)	0,070 (mejno S)

V primeru MKG ledvenih vretenc smo ugotovili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi MKG ledvenih vretenc v posmeznih genotipskih podskupinah ($p=0,016$). S Scheffe post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko, in sicer med povprečnimi vrednostmi MKG ledvenih vretenc v genotipskih podskupinah 2 in 3 ($p=0,017$) ter mejno statistično značilno razliko med genotipskima podskupinama 1 in 3 ($p=0,056$). Med povprečnimi vrednostmi MKG ledvenih vretenc v genotipskih podskupinah 1 in 2 ni bilo statistično značilne razlike ($p=0,511$). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma Sp1 na obeh alelih statistično značilno vpliva na vrednost mineralne kostne gostote ledvenih vretenc pri moških, saj je ta pri preiskovancih z genotipom TT ($0,8743 \text{ kg/m}^2 \pm 0,0983 \text{ kg/m}^2$) statistično značilno nižja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GT ($1,0939 \text{ kg/m}^2 \pm 0,1746 \text{ kg/m}^2$, $p=0,017$) in mejno statistično značilno nižja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG ($1,0536 \text{ kg/m}^2 \pm 0,1757 \text{ kg/m}^2$, $p=0,056$). Glede na to, ima genotip TT le nekaj preiskovancev, bi bilo potrebno rezultate preveriti na večji skupini preiskovancev.

V primeru osteokalcina ($p=0,072$) in OPG ($p=0,070$) lahko govorimo o mejni statistično značilni razliki med povprečnimi vrednostmi v posameznih genotipskih podskupinah. Tak rezultat je najverjetnejše posledica le enega preiskovanca z genotipom TT, zato bi bilo potrebno raziskavo ponoviti na večji skupini preiskovancev. Preiskovanca z genotipom TT imata večjo vrednost osteokalcina ($2733,00 \mu\text{g/l}$; $2073,20 \mu\text{g/l} \pm 1386,45 \mu\text{g/l}$ za genotip GG in $1739,07 \mu\text{g/l} \pm 806,87 \mu\text{g/l}$ za genotip GT) in manjšo vrednost OPG ($3,4800 \text{ pmol/l}$; $5,0230 \text{ pmol/l} \pm 0,9610 \text{ pmol/l}$ za genotip GG in $6,2936 \text{ pmol/l} \pm 1,7984 \text{ pmol/l}$ za genotip GT) v serumu, kar ustrezja večji resorpciji kostnine, ki se fenotipsko kaže kot osteoporoza.

3.1. Primerjava rezultatov z objavljenimi študijami

V do sedaj objavljenih študijah raziskovalci niso ugotovili povezave med polimorfizmom Sp1 in znižano MKG ledvenih vretenc pri moških (67, 68). Pluijm in sodelavci so v raziskavi, v katero so vključili 471 moških, ugotovili statistično značilno povezavo med polimorfizmom Sp1 in povišano vrednostjo osteokalcina v serumu pri preiskovancih z genotipom GT in TT v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG ($p=0,02$) (62).

4. FARMAKOGENETSKA ANALIZA

Farmakogenetika obsega proučevanje razlik med posamezniki pri odzivu na zdravila, ki so bodisi neposredna posledica razlik v zaporedju DNA bodisi posledica razlike v beljakovnskih

zaporedjih, zgradbi ali izražanju genov, ki so vključeni v odgovor na zdravljenje in izhajajo iz razlik v zaporedju DNA. Glavni namen farmakogenetike je pomoč pri predpisovanju zdravil bolnikom, ki jim bodo najbolj koristila in je zanje najmanj verjetno, da bodo doživeli neželene reakcije. Čeprav je farmakogenetika trenutno še v predvsem raziskovalni fazi, pričakujemo njeni povečano uporabo v zdravstveni oskrbi v obliki individualizirane terapije (69). Tako bi se lahko v veliki meri izognili neželenim stranskim učinkom zdravil ter tako zagotovili učinkovitejše in varnejše terapije.

Genetski dejavniki imajo veliko vlogo v patogenezi osteoporoze, precej manj pa je raziskana njihova vloga v odzivu na zdravljenje osteoproze. V naši raziskavi smo ugotavljali, ali je prisotnost polimorfizma Sp1 pri osteporoznih bolnikih povezana z odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom.

4.1. Farmakogenetika pri zdravljenju z raloksifenom

V statistično obdelavo smo vključili 56 pomenopavznih osteoporoznih bolnic, starih od 51 do 69 let, ki so se zdravile z raloksifenom v obodaju enega leta. Pred pričetkom in ob koncu zdravljenja jim je bila izmerjena MKG ledvenih vretenc, kolka in vratu stegnenice ter serumske vrednosti osteokalcina, kostne alkalna fosfataze in CROSS (prečna premreževalca – piridinolin in deoksipiridinolin). V Preglednici XXIV so podane povprečne vrednosti sprememb izmerjenih vrednostih in rezultati testov ANOVA in Kruskal-Wallis.

Preglednica XXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) dBmkg in sprembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene pri osteoporoznih bolnicah, ki so se zdravile z raloksifenom (N - število priskovancev, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, MKG fn - MKG vratu stegnenice, MKG tot - MKG kolka, OC - osteokalcin, BALP - kostna alkalna fosfataza)

Genotip	dMKG ls [%]	dMKG fn [%]	dMKG tot [%]	dOC [%]	dBALP [%]	dCROSS [%]
GG	2,5316 ± 4,6310 (N=37)	1,6363 ± 5,1606 (N=37)	- 0,3465 ± 16,9889 (N=37)	- 25,484 ± 19,9071 (N=36)	- 17,9194 ± 31,1515 (N=31)	- 27,0322 ± 28,9291 (N=36)
GT	1,3922 ± 4,5608 (N=15)	2,0415 ± 5,5425 (N=15)	- 1,2410 ± 11,9789 (N=15)	- 28,391 ± 15,9300 (N=15)	- 23,8326 ± 21,4484 (N=14)	- 31,2745 ± 27,5316 (N=15)
TT	0,4156 ± 2,3928 (N=4)	- 0,2100 ± 5,1848 (N=4)	- 0,8594 ± 2,7405 (N=4)	- 0,633 ± 9,8240 (N=4)	- 39,7467 ± 23,0998 (N=3)	- 0,8065 ± 19,7759 (N=4)
p	0,536 (NS)	0,750 (NS)	0,521 (NS)	0,031 (S)	0,410 (NS)	0,161 (NS)

V primeru spremembe OC smo ugotovili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi spremembe OC v posmeznih genotipskih podskupinah ($p=0,031$). S Scheffe post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko, in sicer med povprečnimi vrednostmi

spremembe OC v genotipskih podskupinah 1 in 3 ($p=0,046$) ter v genotipskih podskupinah 2 in 3 ($p=0,035$). Med povprečnimi vrednostmi spremembe OC v genotipskih podskupinah 1 in 2 ni bilo statistično značilne razlike ($p=0,877$). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma Sp1 statistično značilno vpliva na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom, saj se je po enoletnem zdravljenju z raloksifenom statistično značilno najmanj zmanjšala vrednost osteokalcina v serumu pri preiskovancih z genotipom TT ($-0,633\% \pm 9,8240\%$) v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG ($-25,484\% \pm 19,9071\%$; $p=0,046$) in genotipom GT ($-28,391\% \pm 15,9300\%$; $p=0,035$). Osteokalcin je biokemijski kazalec kostne tvorbe in njegova serumska koncentracija je sorazmerna intenziteti sinteze kolagena v kosti. Pri osteoporoznih bolnicah, ki so se zdravile z raloksifenom, nismo dokazali statistično značilne povezave med Sp1 polimorfizmom in spremembijo MKG.

4.1.1. Primerjava rezultatov z objavljenimi študijami

Do sedaj so raziskovalci proučili povezanost med polimorfizmi v *ESR1*, *ESR2*, *VDR* ter *UGT1A1* in odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom, ne pa tudi za Sp1 polimorfizem (70, 71).

4.2. Farmakogenetika pri zdravljenju z alendronatom

V statistično obdelavo smo vključili 51 pomenopavznih osteoporoznih bolnic, starih od 47 do 77 let, ki so se zdravile z alendronatom v obodobju enega leta. Pred pričetkom in ob koncu zdravljenja jim je bila izmerjena MKG ledvenih vretenc in kolka ter serumske vrednosti osteokalcina, kostne alkalne fostafataze in deoksipiridinolina. V Preglednici XXV so podane povprečne vrednosti sprememb izmerjenih vrednostih in rezultati testa ANOVA.

Preglednica XXV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) dBMD in spremebe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene pri bolnicah, ki so se zdravile z alendronatom (N - število priskovancev, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, MKG tot - MKG kolka, OC - osteokalcin, BALP - kostna alkalna fosfataza, DPYR - deoksipiridinolin)

Genotip	dMKG ls [%]	dMKG tot [%]	dOC [%]	dBALP [%]	dDPYR [%]
GG	7,6333 \pm 4,6939 ($N=27$)	4,3159 \pm 2,9436 ($N=27$)	54,9556 \pm 21,9542 ($N=27$)	44,1083 \pm 32,6004 ($N=23$)	69,2975 \pm 29,7761 ($N=28$)
GT	5,3131 \pm 4,0458 ($N=16$)	3,1244 \pm 2,4752 ($N=16$)	57,7775 \pm 24,4178 ($N=16$)	44,4460 \pm 17,2876 ($N=10$)	76,5771 \pm 32,7106 ($N=17$)
TT	3,3950 \pm 0,6859 ($N=2$)	9,1900 \pm 6,3498 ($N=2$)	56,0591 \pm 22,1455 ($N=2$)	35,9 ($N=1$)	39,3600 \pm 7,4671 ($N=2$)
<i>p</i>	0,156 (NS)	0,025 (S)	0,992 (NS)	0,704 (NS)	0,259 (NS)

V primeru spremembe MKG kolka smo ugotovili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi spremembe MKG kolka v posmeznih genotipskih podskupinah ($p=0,025$). S Scheffe post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko, in sicer med povprečnimi vrednostmi spremembe MKG kolka v genotipskih podskupinah 2 in 3 ($p=0,029$). Med povprečnimi vrednostmi spremembe MKG v genotipskih podskupinah 1 in 2 ni bilo statistično značilne razlike ($p=0,440$), prav tako ne med genotipskima podskupinama 1 in 3 ($p=0,086$). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma Sp1 na obeh alelih statistično značilno vpliva na odzivnost na zdravljenje z alendronatom, saj se je po enoletnem zdravljenju z alendronatom statistično značilno povečala MKG kolka pri preiskovancih z genotipom TT ($9,1900\% \pm 6,3498\%$) v primerjavi s preiskovanci z genotipom GT ($3,1244\% \pm 2,4752$; $p=0,029$). Poudariti pa moramo, da je imata genotip TT le dva izmed 56 preiskovancev, zato bi bilo potrebno rezultate preveriti na večji skupini preiskovancev. Pri osteoporoznih bolnicah, ki so se zdravile z alendronatom, nismo dokazali statistično značilne povezave med polimorfizmom Sp1 in spremembo vrednosti preiskovanih biokemijskih kazalcev kostne premene.

4.2.1. Primerjava rezultatov z objavljenimi študijami

Simsek in sodelavci so v raziskavi, v katero so vključili 29 pomenopavznih preiskovank, ugotovili, da se je po enoletnem zdravljenju z 70 mg alendronata dnevno statistično značilno povečala MKG na vratu stegnenice in MKG vretenc pri preiskovankah z genotipom GT za polimorfizem Sp1 (72). Qureshi in sodelavci so v raziskavi, v katero so vključili 108 premenopavznih preiskovank, prav tako dokazali povezavo med polimorfizmom Sp1 in odzivnostjo na zdravljenje z bisfosfonati. Ugotovili so statistično značilno povišano MKG vratu stegnenice po enoletnem zdravljenju z etidronatom pri preiskovancih z TT ali GT genotipom ($p=0,002$) (73).

ZAKLJUČEK

V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti poveznotnost polimorfizmov -670G>C v genu *RANK* in Sp1 v genu *COLIA1* z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene. Spremenjena zaporedja v promotorski regiji gena *RANK* lahko spremenijo vezavo transkripcijskih faktorjev in tako lahko vplivajo na transkripcijo gena oz. na količino novo sintetiziranega proteina. Prisotnost polimorfizma Sp1 poveča afiniteto transkripcijskega faktorja Sp1 do vezave na DNA, tako poveča transkripcijo gena *COLIA1*, kar vodi do povečanega razmerja med COLIA1 in COLIA2 mRNA oz. med $\alpha 1$ in $\alpha 2$ verigo kolagena tipa I. To naj bi vplivalo na mehansko jakost kosti in zmanjšano sposobnost mineralizacije osteoida. Preučevani polimorfizmi bi lahko imeli pomen kot genetski dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze ter bili uporabni tudi kot genetični označevalci pri posredni diagnostiki bolezni.

V primeru polimorfizma -670 G>C smo z analizo RFLP ugotovili prisotnost restrikcijskega mesta le pri 6 preiskovancih od 721 in vseh 6 preiskovancev je imelo genotip GC. Frekvenca genotipa znaša 0,8 % in za kavkazijce še ni objavljena. Frekvence proučevanega polimorfizma -670G>C se porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem. Po primerjavi podatkov za vseh šest preiskovancev nismo našli korelacije med polimorfizmom -670 G>C v genu *RANK* in MKG, saj je imelo vseh šest preiskovancev MKG primerljivo z MKG drugih preiskovancev.

Frekvence proučevanega polimorfizma Sp1 v genu *COLIA1* pri Slovencih se porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem. Podobne so v vseh skupinah preiskovancev in so v razmerju 62% : 32% : 6% za genotipe GG : GT : TT.

Dokazali smo povezanost polimorfizma Sp 1 v genu *COLIA1* z MKG v sledečih primerih:

- MKG kolka pri osteoporoznih pomenopavznih bolnicah ($p=0,038$): pri preiskovankah z genotipom GT je MKG kolka statistično značilno višja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG ($p=0,046$).
- MKG kolka pri premenopavznih preiskovankah ($p=0,038$): pri preiskovankah z genotipom TT je MKG kolka statistično značilno nižja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GT ($p=0,043$) in genotipom GG ($p=0,045$).

- MKG ledvenih vretenc pri moških (p=0,016): pri preiskovancih z genotipom TT je MKG ledvenih vretenc statistično značilno nižja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GT ($p=0,017$) in mejno statistično značilno nižja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG ($p=0,056$).

Nadalje smo poskušali v naši raziskavi dokazati povezanost med polimorfizmom Sp1 in spremenjeno kostno premeno, ki bi se odražala v spremenjenih vrednostih biokemijskih kazalcev kostne premene. Dokazali smo povezanost polimorfizma Sp 1 v genu *COLIA1* z sledečimi biokemijskimi kazalci kostne premene:

- RANKL pri pomenopavznih preiskovankah: prisotnost polimorfizma Sp1 na enem ali obeh alelih vodi v povečano vrednost RANKL, razlika med povprečnimi vrednostmi v posameznih genotipskih podskupinah je mejno statistično značilna ($p=0,074$).
- RANKL pri pomenopavznih osteoporoznih bolnicah (p=0,043): pri preiskovancih z genotipom GT ali TT je serumska koncentracija RANKL statistično značilno višja v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG.
- CTX pri pomenopavznih osteoporoznih bolnicah: prisotnost polimorfizma Sp1 na obeh alelih vodi v povečano koncentracijo CTX, razlika med povprečnimi vrednostmi CTX v posameznih genotipskih podskupinah pa je statistično mejno značilna ($p=0,069$).
- osteokalcin in OPG pri moških preiskovancih: tudi v primeru osteokalcina ($p=0,072$) in OPG ($p=0,070$) lahko govorimo o mejni statistično značilni razliki med povprečnimi vrednostmi v posameznih genotipskih podskupinah.

V raziskavi smo ugotavljali tudi, ali je prisotnost polimorfizma Sp1 pri osteporoznih bolnikih povezana z odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom. Ugotovili smo, da polimorfizem Sp1 statistično značilno vpliva na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom, saj se je po enoletnjem zdravljenju z raloksifenom statistično značilno najmanj zmanjšala vrednost osteokalcina v serumu (biokemijskega markerja tvorbe kostnine) pri preiskovancih z genotipom TT v primerjavi s preiskovanci z genotipom GG ($p=0,046$) in genotipom GT ($p=0,035$). Prisotnost Sp1 polimorfizma na obeh alelih statistično značilno vpliva tudi na odzivnost na zdravljenje z alendronatom, saj se je po enoletnjem zdravljenju z alendronatom statistično značilno povečala MKG kolka pri preiskovancih z genotipom TT v primerjavi s preiskovanci z genotipom GT ($p=0,029$).

Zaključimo lahko, da sta RANK in COLIA1 proteina, ki zahtevata nadaljnje raziskave, tudi na večjem številu preiskovancev. V primeru gena *RANK* bi se bilo potrebno usmeriti v odkrivanje novih polimorfizmov, ki so znotraj vezalnih mest za transkripcijske faktorje in bi lahko bili povezani z MKG. Smiselno bi bilo tudi proučevanje kombinacije različnih genov in polimorfizmov. Znano je namreč, da je vpliv posameznega gena na določeno lastnost pri večgenerskih boleznih, kakršna je osteoporoza, relativno majhen.

Naša raziskava se pridružuje tistim, ki so dokazale povezanost med polimorfizmom Sp1 in MKG kolka ter ledvenih vretenc in nekaterimi biokemijskimi kazalci kostne premene. Smiselno bi bilo preučiti tudi povezavo med polimorfizmi v promotorski regiji *COLIA1*, ki bi lahko imeli skupaj z *COLIA1* Sp1 polimorfizmom večji vpliv na MKG kot le polimorfizem Sp1.

LITERATURA

1. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM, Kronenberg HM. Bone and mineral metabolism in health and disease. V: Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, et al, eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th edition, McGraw-Hill, New York, 2005: 2238-49
2. Raisz LG: Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. Clinical Chemistry 45: 8(B), 1999: 1353-58
3. Kocijančič A: Osteoporozna: diagnostika in zdravljenje. Farmacevtski vestnik, 1999; 50: 1-6
4. Kocijančič A: Presnovne bolezni kosti. V: Kocijančič A, Mravlje F. Interna medicina, EWO d.o.o. in DZS d.d., Ljubljana, 1998: 711-36
5. Smith DM, Nance WE, Kang KW et al. Genetic factors in determining bone mass. J Clin Invest 1973; 52: 2800-8
6. Žorž G. Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. ISIS 2006; XV(3): 34-37
7. Ralston SH. Genetics of osteoporosis. Q J Med 1997; 90: 247-251
8. Ralston SH, de Crombrugghe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. Genes Dev 2006. 20(18): 2492-506
9. Small RE. Uses and limitations of bone mineral density measurements in the management of osteoporosis. Med Gen Med 2005; 7(2): 3
10. Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Wahner HW, Riggs BL. Long-term fracture prediction by bone mineral assessed at different skeletal sites. J Bone Miner Res 1993;8: 1227-33
11. Kirk JK, Nichols M, Spangler JG. Use of a Peripheral Dexa Measurement for Osteoporosis Screening. Fam Med 2002; 34 (3): 201-5.
12. Cremers S, Garnero P. Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease: potential uses and pitfalls. Drugs. 2006; 66(16): 2031-58
13. Garnero P, Shih WJ, Gineyts E, Karpf DB, Delmas PD. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. J Clin Endocrinol Metab 1994; 79: 1693-700
14. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and practice. Osteoporos Int 2009. Epub ahead of print
15. Garnero P. Advances in bone turnover assessment with biochemical markers. Medicographia 2008; 30(4): 339-49

-
16. Povzetek glavnih značilnosti zdravila PROTELOS. 1-12. Dostopno na.:
http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/register/2004/200409218627/anx_8627_sl.pdf
17. Khosla S: Minireview: The OPG/RANK/RANKL System. *Endocrinology*, 2001; 142(12): 5050-55
18. Hofbauer LC, Heufelder AE: Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*, 2001; 79: 243-53
19. Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Experimental Gerontology* 2003; 38: 605–14
20. Walsh MC, Choi Y: Biology of the TRANCE axis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14, 2003: 251-63
21. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 2000; 408: 600-5
22. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, Kim JH, Kobayashi T, Odgren PR, Nakano H, Yeh WC, Lee SK, Lorenzo JA, Choi Y. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med* 2005;202(5): 589-95
23. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- β . *Nature* 2002; 416: 744–49
24. Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of receptor activator of nuclear factor- B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(7): 2355-63
25. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390(6656): 175-9
26. Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 2000; 24(1): 45-8
27. Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A, Moratto D, Mazzolari E, Clayton-Smith J, Orchard P, Coxon FP, Helfrich MH, et al. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *Am J Hum Genet*. 2008; 83: 64-76
28. Hsu YH, Niu T, Terwedow HA, Xu X, Feng Y, Li Z, Brain JD, Rosen CJ, Laird N, Xu X. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are

- associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet* 2006; 118(5): 568-77
29. Koh JM, Park BL, Kim DJ, Kim GS, Cheong HS, Kim TH, Hong JM, Shin HI, Park EK, Kim SY, Shin HD. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2007; 18(3): 323-31
30. Choi JY, Shin A, Park SK, Chung HW, Cho SI, Shin CS, Kim H, Lee KM, Lee KH, Kang C, Cho DY, Kang D. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2005; 77(3): 152-9
31. Leitinger B, Hohenester E: Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 26 2007: 146-55
32. Carter EM, Raggio CL: Genetic and orthopedic aspects of collagen disorders. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21(1): 46-54
33. Koolman J, Röhm KH: Color Atlas of Biochemistry. Thieme, 2nd Edition, 2005: 70, 344 - 46
34. Retief E, Parker MI, Retief AE: Regional chromosome mapping of human collagen genes alpha 2(I) and alpha 1(I) (COLIA2 and COLIA1). *Hum. Genet* 1985; 69: 304-8
35. Kocher MS, Shapiro F: Osteogenesis imperfecta. *J Am Acad Orthop Surg* 1998; 6(4): 225-36
36. Byers PH, Duvic M, Atkinson M et al. Ehlers-Danlos syndrome type VIIA and VIIB result from splice-junction mutations or genomic deletions that involve exon 6 in the COLIA1 and COL1IA2 genes of type I collagen. *Am J Med Genet* 1997; 72(1): 94-105
37. Grant SF, Reid DM, Blake G et al. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet* 1996; 14(2): 203-5
38. Ralston SH, Uitterlinden AG et al. Large-Scale Evidence for the effect of the COLIA1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: The GENOMOS study. *PLoS Med* 2006; 3(4), e90: 0515-23
39. Mann V, Hobson EE, Baohua Li et al. A *COLIA1* Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *J Clin Invest* 2001; 107(7): 899-907
40. Stewart TL, Roschger P, Misof BM et al. Association of COLIA1 Sp1 alleles with defective bone nodule formation in vitro and abnormal bone mineralization in vivo. *Calcif Tissue Int* 2005; 77(2): 113-18

-
41. Stewart TL, Jin H, McGuigan FE et al. Haplotypes defined by promoter and intron 1 polymorphisms of the COLIA1 gene regulate bone mineral density in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9): 3575-83
 42. Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SF, Ralston SH, Lanchbury JS, Spector TD. Association of polymorphism at the type I collagen (COL1A1) locus with reduced bone mineral density, increased fracture risk, and increased collagen turnover. *Arthritis Rheum* 1999; 42(2): 285-90
 43. Miller SA, Dyeks DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1988; 16: 1215
 44. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 6.3 – 6.19, E3 - E7, A8.9 – A8.11
 45. Sambrook J, Russel DW: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 8.18 – 8.25
 46. Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm vestn* 2004; 55: 215-220
 47. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. ABI Applied Biosystems. Tutorial. 1-15. Dostopno na: http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf
 48. TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol. ABI Applied Biosystems 2002. Part Number 4304449. Rev. C. Dostopno na:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042996.pdf
 49. Ranade K, Chang MS, Ting CT, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 2001;11(7): 1262-8
 50. Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian, 2nd Edition. Humana Press, 2006: 85-110
 51. Dostopno na: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>
 52. Mueller RF, Young ID: Emery's Elements of Medical Genetics, 10th Edition. Churchill Livingstone 1998: 113-20
 53. Mrhar A, Primožič S. Statistične metode v farmaciji. SFD, Ljubljana 1983: 37-42, 65-74
 54. Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I 1 gene. *Nat Genet* 1996;14:203-205

55. Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SFA, Lanchbuey JS, Ralston SH, Spector TD. Type I collagen gene polymorphism is associated with osteoporosis and fracture. *J Bone Miner Res* 1997; 12: S489
56. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FEA, Grant SFA, et al. Relation of alleles of the collagen type II gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998;338:1016-21
57. Langdahl BL, Ralston SH, Grant SFA, Eriksen EF. An Sp1 binding site polymorphism in the *COLIA1* gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. *J Bone Miner Res* 1998;13:1384-89
58. Efstathiadou Z, Kranas V et al. The Sp1 COLIA1 gene polymorphism, and not vitamin D receptor or estrogen receptor gene polymorphisms, determines bone mineral density in postmenopausal Greek women. *Osteoporos Int* 2001; 12(4):326-31
59. Gerdhem P, Brändström H, Stiger F et al. Association of the collagen type 1 (COL1A 1) Sp1 binding site polymorphism to femoral neck bone mineral density and wrist fracture in 1044 elderly Swedish women. *Calcif Tissue Int* 2004; 74(3):264-9
60. Hubacek JA, Weichertova M et al. Genetic polymorphisms of TGF-beta, PAI-1, and COL1A-1, and determination of bone mineral density in Caucasian females. *Endocrin regul* 2006; 40(3): 77-81
61. Bandrés E, Pombo I, González-Huarriz M, et al. Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ERalpha, COL1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women. *J Endocrinol Invest* 2005; 28(4):312-21
62. Pluijm SM, van Essen HW et al. Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(1):71-7
63. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K et al. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int* 2002; 71(1): 26-35
64. Ashford RU, Luchetti M, McCloskey EV et al. Studies of bone density, quantitative ultrasound, and vertebral fractures in relation to collagen type I alpha 1 alleles in elderly women. *Calcif Tissue Int* 2001; 68(6): 348-51
65. Välimäki S, Tähtelä R, Kainulainen K et al. Relation of collagen type I alpha 1 (COLIA 1) and vitamin D receptor genotypes to bone mass, turnover, and fractures in early postmenopausal women and to hip fractures in elderly people. *Eur J Intern Med* 2001;12(1): 48-56

-
66. Garnero P, Borel O, Grant SF, Ralston SH, Delmas PD. Collagen Ialpha1 Sp1 polymorphism, bone mass, and bone turnover in healthy French premenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 1998; 13(5):813-7
67. Braga V, Sangalli A, Malerba G et al. Relationship among VDR (BsmI and FokI), COLIA1, and CTR polymorphisms with bone mass, bone turnover markers, and sex hormones in men. *Calcif Tissue Int* 2002; 70(6): 457-62
68. Yazdanpanah N, Rivadeneira F, van Meurs JB et al. The -1997 G/T and Sp1 polymorphisms in the collagen type I alpha1 (COLIA1) gene in relation to changes in femoral neck bone mineral density and the risk of fracture in the elderly: the Rotterdam study. *Calcif Tissue Int* 2007;81(1): 18-25
69. Marini F, Brandi ML. Pharmacogenetics of osteoporosis: future perspectives. *Calcif Tissue Int* 2009; 84(5): 337-47
70. Zhang ZL, He JW, Qin YJ et al. Association of bone metabolism related genes polymorphisms with the effect of raloxifene hydrochloride on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women with osteoporosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 23(2): 129-33
71. Trontelj J, Marc J, Zavratnik A, Bogataj M, Mrhar A. Effects of UGT1A1*28 polymorphism on raloxifene pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Br J Clin Pharmacol.* 2009; 67(4): 437-44
72. Simsek M, Cetin Z, Taskin O. Effects of Hormone Replacement Therapy (HRT) and Alendronate on Bone Mineral Density (BMD) in Patients With Col 1 A1 Sp 1 Binding Site Polymorphism a Prospective Randomized Study. *Fertility and Sterility* 2005; 84(1): S229
73. Qureshi AM, Herd RJ, Blake GM, Fogelman I, Ralston SH. COLIA1 Sp1 polymorphism predicts response of femoral neck bone density to cyclical etidronate therapy. *Calcif Tissue Int* 2002;70(3): 158-63

PRILOGE

PRILOGA 1: Rezultati meritev koncentracij izolirane DNA in razmerje absorbanc ($A_{260/280}$)

Št.	$A_{260/280}$	konz. DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Št.	$A_{260/280}$	konz. DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Št.	$A_{260/280}$	konz. DNA ($\mu\text{g/mL}$)
666	1,49	743,13	710	1,829	1407,2	754	1,778	751,45
667	1,665	2031,9	711	1,796	665,74	755		
668	1,687	1428,6	712	1,821	1344,4	756	1,727	311,32
669	1,492	2301,9	713	1,817	1379,4	757		274,7
670	1,805	1133,9	714	1,792	931,62	758		571,3
671	1,586	1366,7	715	1,606	487,04	759		332,9
672	1,746	1804,9	716	1,802	1300,2	760	1,81	1488,6
673	1,693	1349,7	717	1,778	572,7	761	1,787	1064,9
674	1,718	429,13	718	1,792	807,15	762	1,768	661,44
675	1,504	40,33	719	1,799	1581,7	763		426,4
676	1,788	1155,8	720	1,805	1451,7	764		340,4
677	1,792	1417,1	721	1,81	1358,5	765	1,765	1176,6
678	1,801	1702,7	722	1,803	1275,4	766	1,784	1218,6
679	1,711	972,8	723	1,827	1225,6	767	1,759	931,17
680	1,603	1781,7	724	1,777	603,49	768		372,4
681	1,775	1627,5	725	1,775	1395,9	769		451,6
682	1,773	1410	726	1,795	1279,8	770	1,744	311,03
683	1,741	740,86	727	1,776	504,58	771	1,786	1617,2
684	1,792	760,92	728	1,777	1797,2	772	1,34	291,54
685	1,8	1392,9	729	1,806	1448,7	773	1,771	2084
686	1,809	672,31	730	1,774	1907,9	774	1,588	420,76
687	1,816	1216,4	731	1,454	2087,6	775	1,929	313,4
688	1,795	8047,24	732	1,795	1115,6	776	1,421	252,42
689	1,759	562,12	733	1,775	681,15	777	1,512	339,41
690	1,786	1123,4	734	1,789	1261,3	778	1,386	459,55
691	1,784	725,2	735	1,762	1604,7	779	1,703	3898,3
692	1,765	478,52	736	1,792	1347,8	780	1,817	1797,6
693	1,776	499,96	737	1,797	1083,1	781	1,888	525,56
694	1,8	952,92	738	1,703	330,3	782	1,817	903,26
695	1,801	1138,6	739	1,775	1168,1	783	1,824	929,07
696	1,76	391,78	740	1,782	975,66	784	1,914	189
697	1,747	579,45	741	1,781	1068,5	785	1,873	433,42
698	1,792	1315	742	1,777	921,63	786	1,783	1155,6
699	1,785	1074	743	1,803	1411,6	787	1,824	2195,4
700	1,801	1323	744	1,78	948,54	788	1,347	787,1
701	1,798	1270,2	745	1,778	1676	789	1,824	2515
702	1,74	1115	746	1,771	657,2	790	1,34	694,71
703	1,812	1634,4	747	1,764	1808,6	791	1,229	705,32
704	1,835	1657,6	748	1,757	660,14	792	1,841	1242,2
705	1,824	1392,8	749	1,786	1221,8	793	1,849	1383,9
706	1,812	1154,8	750	1,783	682,77	794	1,793	754,01
707	1,816	1094,3	751	1,8	1293,6	795	1,855	1616,6
708	1,747	470,27	752	1,787	1499,1	796	1,809	731,32
709	1,797	800,83	753	1,754	852,13	797	1,83	1069,1

Št.	A260/280	konz. DNA (µg/mL)	Št.	A260/280	konz. DNA (µg/mL)	Št.	A260/280	konz. DNA (µg/mL)
798	1,776	517,97	930	1,726	1575,9	977	1,806	1536,5
799	1,837	832,51	931	1,746	484,4	978	1,791	657,26
800	1,869	1495,8	932	1,638	297,25	979	1,737	377,22
801	1,847	1096,4	933	1,798	1189,6	980	1,786	1201,2
802	1,852	1051,9	934	1,799	1070,7	981	1,775	757,47
803	1,826	579,65	935	1,788	1106,7	982	1,739	611,8
804	1,849	665,63	936	1,827	2360,1	983	1,817	1442
805	1,847	637,91	937	1,797	1886,4	984	1,781	893,06
806	1,857	1132,3	938	1,792	1735,8	985	1,794	744,45
807	1,814	1214,2	939	1,737	1615,6	986	1,783	572,72
808	1,708	1107,2	940	1,802	2529,6	987	1,816	1234,3
809	1,841	738,74	941	1,772	1436,5	988	1,636	155,69
810	1,854	1653,9	942	1,792	1680,5	989	1,805	763,15
811	1,826	1446,1	943	1,754	888,74	990	1,809	1101,2
812	1,854	1219,5	944	1,792	1127,5	991	1,783	392,78
813	1,848	1073	945	1,697	559,57	992	1,785	773,74
814	1,85	1422,6	946	1,744	1217,9	993	1,735	740,08
815	1,839	1016,2	947	1,75	798,08	994	1,69	382,04
816	1,803	639,36	948	1,782	1054	995	1,862	361,44
817	1,861	1073,9	949	1,773	1283,8	996	1,796	1090,6
818	1,812	678,58	950	1,778	671,18	997	1,78	856,97
819	1,823	1027,9	951	1,728	484,84	998	1,775	1248
820	1,842	1292,6	952	1,425	163,82	999	1,87	876,15
821	1,819	1350,6	953	1,832	2207	1000	1,793	330,37
822	1,843	1422,9	954	1,813	913,18	1001	1,906	896,04
823	1,784	1461	955	1,788	1612,4	1002	1,813	512,04
824	1,784	766,53	956	1,767	2455,3	1003	1,809	837,07
825	1,517	420,95	957	1,586	264,58	1004	1,736	667,15
826	1,689	202,02	958	1,774	2308,1	1005	1,847	1013,3
827	1,86	1046,6	959	1,763	1018,3	1006	1,726	1066,1
913	1,815	1553,5	960	1,747	1412,8	1007	1,834	1234,4
914	1,824	1561,6	961	1,364	240,82	1008	1,8	1432,9
915	1,849	2218,1	962	1,768	808,02	1009	1,834	1181,9
916	1,739	359,8	963	1,796	2018,3	1010	1,808	1068,7
917	1,787	888,04	964	1,742	1187,3	1011	1,84	1084,3
918	1,757	1729,5	965	1,79	1322,9	1012	1,737	1263,7
919	1,819	1892,3	966	1,806	2486,9	1013	1,82	1502,1
920	1,804	939,32	967	1,769	495,43	1014	1,807	1144,1
921	1,836	2063,8	968	1,797	1710,2	1015	1,749	653,56
922	1,831	1787,2	969	1,69	433,5	1016	1,781	854,51
923	1,813	1185,8	970	1,484	179,02	1017	1,72	680,22
924	1,832	1928,3	971	1,35	165,23	1018	1,709	274,05
925	1,828	1618,3	972	1,446	218,8	1019	1,84	1064,6
926	1,815	1652,3	973	1,78	762,34	1020	1,81	1219,2
927	1,795	1178,3	974	1,756	534,48	1021	1,759	1058
928	1,788	1069,3	975	1,796	1086,1	1022	1,782	621,98
929	1,791	1456,5	976	1,798	743,43	1023	1,697	201,4

Št.	$A_{260/280}$	konc. DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Št.	$A_{260/280}$	konc. DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Št.	$A_{260/280}$	konc. DNA ($\mu\text{g/mL}$)
1024	1,675	131,11	1071	1,808	680,49	1118	1,544	271,88
1025	1,758	377,32	1072	1,81	887,92	1119	1,779	189,52
1026	1,672	701,85	1073	1,83	1475,8	1120	1,801	706,32
1027	1,788	819,96	1074	1,836	1019	1121	1,576	268,74
1028	1,736	702,82	1075	1,805	1979,8	1122	1,754	785,37
1029	1,731	743,83	1076	1,842	646,45	1123	1,772	1373,6
1030	1,713	672,14	1077	1,804	1449,7	1124	1,804	888,61
1031	1,648	354,93	1078	1,822	1178,1	1125	1,736	211,08
1032	1,697	452,72	1079	1,828	2009,8	1126	1,833	1323,1
1033	1,751	715,17	1080	1,839	2134,5	1127	1,486	671,39
1034	1,72	571,18	1081	1,832	2031,1	1128	1,42	231,51
1035	1,823	1068,8	1082	1,741	418,56	1129	1,805	511,46
1036	1,691	542,11	1083	1,691	175,62	1130	1,795	1055,9
1037	1,731	714,61	1084	1,816	3133,6	1131	1,823	1041,4
1038	1,661	771,38	1085	1,825	2897,4	1132	1,754	529,61
1039	1,705	1831	1086	1,823	1815,2	1133	1,579	2283,7
1040	1,678	1053	1087	1,768	1122,2	1134	1,797	1646,2
1041	1,79	1468,6	1088	1,865	3570	1135	1,805	509,59
1042	1,763	1969,6	1089	1,821	1470	1136	1,781	1200,4
1043	1,741	975,75	1090	1,776	1759,1	1137	1,685	887,03
1044	1,718	994,27	1091	1,784	875,64	1138	1,806	880,48
1045		61,9	1092	1,74	406,16	1139	1,836	1076,1
1046	1,758	833,22	1093	1,396	143,53	1140	1,778	1346,2
1047	1,799	157,4	1094	1,821	1396,9	1141	1,782	470,47
1048	1,829	132,5	1095	1,805	2142,6	1142	1,777	257,68
1049	1,783	689,79	1096	1,833	1898	1143	1,753	970,8
1050		59,5	1097	1,818	1817,4	1144	1,785	423,41
1051		33,3	1098	1,799	1385	1145	1,801	1063,5
1052	1,837	468,9	1099	1,779	2106,1	1146	1,806	416,05
1053	1,9	87,6	1100	1,642	2204,1	1147	1,826	218,2
1054	1,682	70,2	1101	1,764	372,36	1148		1086,4
1055		59,9	1102	1,72	1556	1149		1001,1
1056		89,3	1103	1,727	2390,9	1150		1763,5
1057	1,855	2413	1104	1,783	2636,1			
1058	1,842	1406,9	1105	1,631	5550,7			
1059	1,81	472,55	1106	1,819	1651,3			
1060	1,856	1929,8	1107	1,764	2638,2			
1061	1,829	936,58	1108	1,756	985,81			
1062	1,825	1441,7	1109	1,784	1341,2			
1063	1,785	1669,4	1110	1,811	1154,1			
1064	1,833	1443,5	1111	1,741	443,86			
1065	1,756	1152,3	1112	1,819	1547			
1066	1,825	934,26	1113	1,827	1046,1			
1067	1,827	1393,4	1114	0,848	347,75			
1068	1,831	1256,4	1115	1,745	896,82			
1069	1,832	1509,4	1116	1,827	1542,3			
1070	1,798	270,01	1117	1,836	1018,3			

PRILOGA 2: Genotipi preiskovancev za polimorfizem -670G>C v genu *RANK* ter polimorfizem Sp1 v genu *COLIA1*

Zap.št	Oznaka	Genotip <i>COLIA1</i>	Genotip <i>RANK</i>	Zap.št	Oznaka	Genotip <i>COLIA1</i>	Genotip <i>RANK</i>
666	Y1	GG	GG	728	Y63	GT	GG
667	Y2	GT	GG	729	Y64	GT	GG
668	Y3	GG	GG	730	Y65	GT	GG
669	Y4	TT	GG	731	Y66	GG	GG
670	Y5	GG	GG	732	Y67	GG	GG
671	Y6	GG	GG	733	Y68	GG	GG
672	Y7	GT	GG	734	Y69	GG	GG
673	Y8	GT	GG	735	Y70	GT	GG
674	Y9	GG	GG	736	Y71	GG	GG
675	Y10	GG	GG	737	Y72	GG	GG
676	Y11	GT	GG	738	Y73	GG	GG
677	Y12	GT	GG	739	Y74	GG	GG
678	Y13	GG	GG	740	Y75	GG	GG
679	Y14	TT	GG	741	Y76	GG	GG
680	Y15	GG	GG	742	Y77	GG	GG
681	Y16	GT	GG	743	Y78	GT	GG
682	Y17	GG	GG	744	Y79	GG	GG
683	Y18	/	GG	745	Y80	GT	GG
684	Y19	GT	GG	746	Y81	GT	GG
685	Y20	GG	GG	747	Y82	GT	GG
686	Y21	GG	GG	748	Y83	GG	GG
687	Y22	GG	GG	749	Y84	GG	GG
688	Y23	GG	GG	750	Y85	GT	GG
689	Y24	GT	GG	751	Y86	GT	GG
690	Y25	GT	GG	752	Y87	GT	GG
691	Y26	GG	GG	753	Y89	GT	GG
692	Y27	GT	GG	754	Y90	GT	GG
693	Y28	GG	GG	755	Y91	/	GG
694	Y29	GT	GG	756	Y92	GG	GG
695	Y30	GT	GC	757	Y93	GG	GG
696	Y31	GG	GG	758	Y94	/	GG
697	Y32	GG	GG	759	Y95	/	GG
698	Y33	TT	GG	760	Y96	GG	GG
699	Y34	GG	GG	761	Y97	GG	GG
700	Y35	GG	GG	762	Y98	TT	GG
701	Y36	GG	GG	763	Y99	/	GG
702	Y37	GT	GG	764	Y100	/	GG
703	Y38	GT	GG	765	Y101	GT	GG
704	Y39	GG	GG	766	Y102	TT	GG
705	Y40	GG	GG	767	Y103	GG	GG
706	Y41	GG	GG	768	Y104	/	/
707	Y42	GT	GG	769	Y105	/	GG
708	Y43	GG	GG	770	Y106	GG	GG
709	Y44	GT	GG	771	Y107	GG	GG
710	Y45	GG	GG	772	Y108	/	/
711	Y46	GG	GG	773	Y109	GG	GG
712	Y47	GG	GG	774	Y110	GT	GG

Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK	Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK
713	Y48	GG	GG	775	Y111	GT	GG
714	Y49	GT	GG	776	Y112	GG	GG
715	Y50	GT	GG	777	Y113	/	GG
716	Y51	GG	GG	778	Y114	GG	GG
717	Y52	GG	GG	779	Y189	GT	GG
718	Y53	GG	GG	780	Y190	GG	GG
719	Y54	GG	GG	781	Y191	TT	GG
720	Y55	GT	GG	782	Y192	GT	GG
721	Y56	GT	GG	783	Y193	GG	GG
722	Y57	GG	GG	784	Y194	GT	GG
723	Y58	GG	GG	785	Y195	GT	GG
724	Y59	GT	GG	786	Y196	GG	GG
725	Y60	GG	GG	787	Y197	GG	GG
726	Y61	GG	GG	788	Y198	/	GG
727	Y62	TT	GG	789	Y199	GT	GG
790	Y200	GG	GG	937	Y138	TT	GG
791	Y201	GG	GG	938	Y139	GT	GG
792	Y202	GG	GG	939	Y140	GG	GG
793	Y203	GG	GG	940	Y141	GT	GG
794	Y204	GG	GC	941	Y142	GG	GG
795	Y205	GG	GG	942	Y143	GT	GG
796	Y206	GT	GG	943	Y144	GT	GG
797	Y207	GT	GG	944	Y145	GG	GG
798	Y208	GG	GG	945	Y146	GT	GG
799	Y209	GT	GG	946	Y147	TT	GG
800	Y210	GG	GG	947	Y148	GT	GG
801	Y211	GG	GG	948	Y149	GT	GG
802	Y212	GT	GG	949	Y150	GT	GG
803	Y213	GG	GG	950	Y151	GT	GC
804	Y214	GG	GG	951	Y152	GG	GG
805	Y215	GG	GG	952	Y153	/	GG
806	Y216	GT	GG	953	Y154	GG	GG
807	Y217	GG	GG	954	Y155	GG	GG
808	Y218	GT	GG	955	Y156	GG	GG
809	Y219	GT	GG	956	Y157	GG	GG
810	Y220	GG	GG	957	Y158	GG	GG
811	Y221	GG	GG	958	Y159	GG	GG
812	Y222	GG	GG	959	Y160	GG	GG
813	Y223	GG	GG	960	Y161	GG	GG
814	Y224	GT	GG	961	Y162	/	GG
815	Y225	GG	GG	962	Y163	GG	GG
816	Y226	GG	GG	963	Y164	GG	GG
817	Y227	GG	GG	964	Y165	GG	GG
818	Y228	GT	GG	965	Y166	TT	GG
819	Y229	GG	GG	966	Y167	GT	GG
820	Y230	TT	GG	967	Y171	GG	GG
821	Y231	GT	GG	968	Y172	GG	GG

Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK	Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK
822	Y232	GT	GG	969	Y173	GG	GG
823	Y233	GT	GG	970	Y174	GG	GG
824	Y234	GG	GG	971	Y175	GT	GG
825	Y168	GT	GG	972	Y176	/	GG
826	Y169	GG	GG	973	Y177	GG	GG
827	Y170	GG	GG	974	Y178	GG	GG
913	Y115	GT	GG	975	Y179	GT	GG
914	Y116	GG	GG	976	Y180	GG	GG
915	Y117	GG	GG	977	Y181	GG	GG
916	Y118	GT	GG	978	Y182	TT	GG
917	Y119	GG	GG	979	Y183	GG	GG
918	Y120	GT	GG	980	Y184	GT	GG
919	Y121	GT	GG	981	Y185	GG	GG
920	Y122	GG	GG	982	Y186	GG	GG
921	Y123	GG	GG	983	Y187	GG	GG
922	Y124	GG	GG	984	Y188	GG	GG
923	Y125	GG	GG	985	Y229	GG	GG
924	Y126	GG	GG	986	Y230	GT	GG
925	Y127	GT	GG	987	Y231	GT	GG
926	Y128	GG	GG	988	Y232	GG	GG
927	Y129	GT	GG	989	Y233	GT	GG
928	Y130	GG	GG	990	Y234	GG	GG
929	Y131	GT	GG	991	Y235	/	GG
930	Y132	GG	GG	992	Y236	GG	GG
931	Y88	GT	GG	993	Y237	GT	GG
932	Y133	GT	GG	994	Y238	GG	GG
933	Y134	GG	GG	995	Y239	GG	GG
934	Y135	GG	GG	996	Y240	GG	GG
935	Y136	GG	GG	997	Y241	GG	GG
936	Y137	GG	GG	998	Y242	GG	GG
999	Y243	GG	GG	1061	Y305	GT	GG
1000	Y244	GG	GG	1062	Y306	GT	GG
1001	Y245	GG	GG	1063	Y307	GG	GG
1002	Y246	GT	GG	1064	Y308	GG	GG
1003	Y247	GT	GG	1065	Y309	GG	GG
1004	Y248	GG	GG	1066	Y310	GT	GG
1005	Y249	GG	GG	1067	Y311	GG	GG
1006	Y250	GT	GG	1068	Y312	GG	GG
1007	Y251	GG	GG	1069	Y313	GG	GG
1008	Y252	GG	GG	1070	Y314	GG	GG
1009	Y253	GT	GG	1071	Y315	GG	GG
1010	Y254	GG	GG	1072	Y316	GG	GG
1011	Y255	GG	GG	1073	Y317	GG	GG
1012	Y256	GG	GG	1074	Y318	GT	GG
1013	Y257	GT	GG	1075	Y320	GG	GG
1014	Y258	GG	GG	1076	Y321	GG	GG
1015	Y259	GT	GG	1077	Y322	GT	GG
1016	Y260	GG	GG	1078	Y323	GG	GG
1017	Y261	GG	GG	1079	Y324	GG	GG
1018	Y262	/	GG	1080	Y325	GG	GG

Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK	Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK
1019	Y263	GT	GG	1081	Y326	GG	GG
1020	Y264	GG	GG	1082	Y327	GT	GG
1021	Y265	GG	GG	1083	Y328	GG	GG
1022	Y266	GG	GG	1084	Y329	GG	GG
1023	Y267	GG	GG	1085	Y330	GT	GG
1024	Y268	/	GG	1086	Y331	GG	GG
1025	Y269	GG	GG	1087	Y332	GG	GG
1026	Y270	TT	GG	1088	Y333	GT	GG
1027	Y271	GG	GG	1089	Y334	GT	GG
1028	Y272	GG	GG	1090	Y335	GT	GG
1029	Y273	GG	GG	1091	Y336	GT	GG
1030	Y274	GG	GG	1092	Y337	GG	GG
1031	Y275	GG	GG	1093	Y338	GG	GG
1032	Y276	GG	GG	1094	Y339	GG	GG
1033	Y277	GG	GG	1095	Y340	GG	GG
1034	Y278	GT	GG	1096	Y341	GG	GG
1035	Y279	GG	GG	1097	Y342	GT	GG
1036	Y280	GG	GG	1098	Y343	GG	GG
1037	Y281	GG	GG	1099	Y344	GG	GG
1038	Y282	GT	GG	1100	Y345	GG	GG
1039	Y283	GT	GG	1101	Y346	GG	GG
1040	Y284	GG	GG	1102	Y347	GG	GG
1041	Y285	GG	GG	1103	Y348	GG	GG
1042	Y286	GG	GG	1104	Y349	GG	GG
1043	Y287	GG	GG	1105	Y350	GG	GG
1044	Y288	TT	GG	1106	Y351	GG	GG
1045	Y289	GG	GG	1107	Y352	GG	GG
1046	Y290	TT	GG	1108	Y353	GG	GG
1047	Y291	/	GG	1109	Y354	GG	GG
1048	Y292	/	GG	1110	Y355	GT	GG
1049	Y293	GG	GG	1111	Y356	GT	GG
1050	Y294	GT	GG	1112	Y357	GG	GG
1051	Y295	TT	GG	1113	Y358	GG	GG
1052	Y296	/	GG	1114	Y359	GT	GG
1053	Y297	/	GG	1115	Y360	GT	GG
1054	Y298	GG	GG	1116	Y361	GT	GG
1055	Y299	GT	GG	1117	Y362	GG	GG
1056	Y300	GT	GG	1118	Y363	GT	GG
1057	Y301	GG	GG	1119	Y364	GT	GG
1058	Y302	GG	GG	1120	Y365	GG	GG
1059	Y303	GG	GG	1121	Y366	GG	GG
1060	Y304	GT	GG	1122	Y367	GT	GG
1123	Y368	GG	GG	135	Fosamax	GT	GG
1124	Y369	GG	GC	136	Fosamax	GG	GG
1125	Y370	GT	GG	137	Fosamax	GG	GG
1126	Y371	GG	GG	138	Fosamax	GG	GG
1127	Y372	GT	GG	139	Fosamax	GT	GG
1128	Y373	GG	GG	140	Fosamax	GG	GG

Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK	Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK
1129	Y374	GG	GG	141	Fosamax	GG	GG
1130	Y375	GG	GG	142	Fosamax	GG	GG
1131	Y376	GG	GG	146	Fosamax	GG	GG
1132	Y377	GG	GG	148	Fosamax	GG	GG
1133	Y378	GG	GG	149	Fosamax	GG	GG
1134	Y379	GT	GG	155	Fosamax	GG	GG
1135	Y380	GT	GG	156	Fosamax	GG	GG
1136	Y381	GG	GG	158	Fosamax	GG	GG
1137	Y382	TT	GG	159	Fosamax	GG	GG
1138	Y383	GG	GG	160	Fosamax	GG	GG
1139	Y384	GG	GG	161	Fosamax	GG	GG
1140	Y385	GG	GG	163	Fosamax	GG	GG
1141	Y386	GT	GG	167	Fosamax	GT	GG
1142	Y387	GG	GG	168	Fosamax	GT	GG
1143	Y388	GG	GG	169	Fosamax	GG	GG
1144	Y389	GT	GG	170	Fosamax	GG	GG
1145	Y390	GT	GG	174	Fosamax	GG	GG
1146	Y391	GG	GG	175	Fosamax	GG	GG
1147	Y118	GG	GG	176	Fosamax	GG	GG
1148	Y319	GT	GG	1	opg	GG	GG
1149	Y392	GT	GG	2	opg	GG	GG
1150	Y393	GG	GG	3	opg	GT	GG
93	Fosamax	GT	GG	4	opg	GG	GG
94	Fosamax	GT	GG	5	opg	GG	GG
95	Fosamax	GT	GG	6	opg	GG	GG
96	Fosamax	GG	GG	7	opg	GG	GG
97	Fosamax	GG	GG	8	opg	GG	GG
98	Fosamax	GG	GG	9	opg	GG	GG
99	Fosamax	GG	GG	10	opg	GG	GG
100	Fosamax	GG	GG	11	opg	GG	GG
101	Fosamax	GT	GG	12	opg	GG	GG
103	Fosamax	GG	GG	13	opg	GT	GG
106	Fosamax	GT	GG	14	opg	GG	GG
108	Fosamax	GT	GG	15	opg	GT	GG
109	Fosamax	GT	GG	16	opg	TT	GG
110	Fosamax	GG	GG	17	opg	GT	GG
111	Fosamax	GG	GG	18	opg	GT	GG
112	Fosamax	GT	GG	19	opg	GG	GG
113	Fosamax	GT	GG	20	opg	GT	GG
114	Fosamax	GG	GG	21	opg	GG	GG
115	Fosamax	GG	GG	22	opg	GT	GG
117	Fosamax	GG	GG	24	opg	GG	GG
118	Fosamax	TT	GG	25	opg	TT	GG
119	Fosamax	TT	GG	26	opg	GG	GG
120	Fosamax	GT	GG	27	opg	GG	GG
121	Fosamax	GT	GG	28	opg	GT	GG
122	Fosamax	GT	GG	29	opg	TT	GG
123	Fosamax	GG	GC	30	opg	GT	GG
124	Fosamax	GG	GG	31	opg	GT	GG
125	Fosamax	GT	GG	32	opg	GT	GG

Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK	Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK
126	Fosamax	GT	GG	33	opg	GG	GG
129	Fosamax	GG	GG	34	opg	GG	GG
130	Fosamax	GT	GG	35	opg	GG	GG
131	Fosamax	GG	GG	36	opg	GT	GG
134	Fosamax	GT	GG	37	opg	GG	GG
38	opg	GG	GG	100	opg	GG	GG
39	opg	GG	GG	101	opg	GG	GG
40	opg	GG	GG	102	opg	GG	GG
41	opg	TT	GG	103	opg	GG	GG
42	opg	TT	GG	104	opg	GG	GG
43	opg	GT	GG	105	opg	GG	GG
44	opg	GG	GG	106	opg	GG	GG
45	opg	GG	GG	107	opg	GG	GG
46	opg	GG	GG	108	opg	GT	GG
47	opg	GG	GG	110	opg	GG	GG
48	opg	GT	GG	111	opg	GG	GG
49	opg	TT	GG	112	opg	GG	GG
50	opg	GG	GG	113	opg	GT	GG
51	opg	GG	GG	114	opg	GG	GG
52	opg	TT	GG	115	opg	GT	GG
53	opg	GT	GG	116	opg	GG	GG
54	opg	GG	GG	117	opg	GG	GG
55	opg	GT	GG	587	ralo	GT	GG
56	opg	GG	GG	588	ralo	GG	GG
57	opg	GG	GG	589	ralo	GT	GG
58	opg	GG	GG	590	ralo	GG	GG
59	opg	GT	GG	591	ralo	GG	GG
60	opg	GG	GG	592	ralo	GG	GG
61	opg	GG	GG	593	ralo	GG	GG
62	opg	GT	GG	594	ralo	GT	GG
63	opg	GT	GG	595	ralo	GT	GG
64	opg	GT	GG	596	ralo	GG	GG
65	opg	GG	GG	597	ralo	GG	GG
66	opg	GT	GG	598	ralo	GG	GG
67	opg	GG	GG	599	ralo	GG	GG
68	opg	GG	GG	600	ralo	GT	GG
69	opg	GG	GG	601	ralo	GT	GG
70	opg	GG	GG	602	ralo	GG	GG
71	opg	GG	GC	603	ralo	GG	GG
72	opg	GG	GG	604	ralo	GG	GG
73	opg	GG	GG	605	ralo	GG	GG
74	opg	GG	GG	606	ralo	GG	GG
75	opg	GG	GG	607	ralo	GG	GG
76	opg	GT	GG	608	ralo	GT	GG
77	opg	GG	GG	609	ralo	GG	GG
78	opg	GT	GG	610	ralo	GT	GG
79	opg	GT	GG	611	ralo	GT	GG
80	opg	GG	GG	612	ralo	GG	GG
81	opg	GG	GG	613	ralo	TT	GG
82	opg	GG	GG	614	ralo	GT	GG

Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK	Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK
83	opg	TT	GG	615	ralo	GT	GG
84	opg	GG	GG	616	ralo	TT	GG
85	opg	GT	GG	617	ralo	GG	GG
86	opg	GG	GG	618	ralo	GT	GG
87	opg	GT	GG	619	ralo	GG	GG
88	opg	GG	GG	620	ralo	GG	GG
89	opg	GG	GG	621	ralo	GG	GG
90	opg	GT	GG	622	ralo	GG	GG
91	opg	GT	GG	623	ralo	GG	GG
92	opg	GT	GG	624	ralo	GG	GG
93	opg	GG	GG	625	ralo	GT	GG
94	opg	GG	GG	626	ralo	GG	GG
95	opg	GT	GG	627	ralo	TT	GG
96	opg	GT	GG	628	ralo	GG	GG
97	opg	GT	GG	629	ralo	GG	GG
98	opg	GT	GG	630	ralo	GG	GG
99	opg	GG	GG	631	ralo	GT	GG
632	ralo	GG	GG	1067	ZIT	GG	GG
633	ralo	GG	GG	1068	ZIT	GT	GG
634	ralo	GG	GG	1069	ZIT	GT	GG
635	ralo	GG	GG	1070	ZIT	GT	GG
636	ralo	GG	GG	1071	ZIT	GG	GG
637	ralo	GG	GG	1072	ZIT	GT	GG
638	ralo	GT	GG	1074	ZIT	GT	GG
639	ralo	GT	GG	1075	ZIT	GG	GG
640	ralo	GG	GG	1076	ZIT	GT	GG
659	ralo	GG	GG	1077	ZIT	GG	GG
660	ralo	GG	GG	1078	ZIT	GG	GG
661	ralo	GG	GG	1079	ZIT	GG	GG
662	ralo	GG	GG	1081	ZIT	GT	GG
663	ralo	GT	GG	1082	ZIT	GG	GG
664	ralo	TT	GG	1083	ZIT	GG	GG
665	ralo	GT	GG	1085	ZIT	GG	GG
666	ralo	GG	GG	1087	ZIT	GT	GG
667	ralo	GG	GG	1088	ZIT	GG	GG
1002	ZIT	GT	GG	1089	ZIT	GT	GG
1003	ZIT	GG	GG	1090	ZIT	GT	GG
1004	ZIT	TT	GG	1091	ZIT	GT	GG
1005	ZIT	GG	GG	1092	ZIT	GG	GG
1006	ZIT	GT	GG	1093	ZIT	GG	GG
1007	ZIT	GG	GG	1094	ZIT	GT	GG
1008	ZIT	GG	GG	1095	ZIT	TT	GG
1009	ZIT	GG	GG	1097	ZIT	GT	GG
1010	ZIT	GG	GG	1098	ZIT	GT	GG
1011	ZIT	TT	GG	1100	ZIT	GG	GG
1012	ZIT	GT	GG	1101	ZIT	GG	GG
1021	ZIT	GT	GG	1102	ZIT	GG	GG
1028	ZIT	TT	GG	1103	ZIT	GT	GG
1030	ZIT	GG	GG	1104	ZIT	GT	GG
1031	ZIT	GG	GG	1105	ZIT	GT	GG

Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK	Zap.št	Oznaka	Genotip COLIA1	Genotip RANK
1032	ZIT	GT	GG	1106	ZIT	GT	GG
1033	ZIT	GG	GG	1107	ZIT	GG	GG
1034	ZIT	GT	GG	1108	ZIT	GG	GG
1035	ZIT	GG	GG	1110	ZIT	GT	GG
1036	ZIT	GT	GG				
1037	ZIT	TT	GG				
1038	ZIT	GG	GG				
1039	ZIT	GT	GG				
1040	ZIT	GT	GG				
1041	ZIT	GG	GG				
1042	ZIT	GG	GG				
1043	ZIT	GG	GG				
1045	ZIT	GT	GG				
1049	ZIT	GG	GG				
1051	ZIT	GG	GG				
1052	ZIT	GG	GG				
1053	ZIT	GT	GG				
1054	ZIT	GT	GG				
1055	ZIT	GG	GG				
1056	ZIT	GT	GG				
1057	ZIT	GT	GG				
1058	ZIT	GT	GG				
1059	ZIT	TT	GG				
1060	ZIT	GG	GG				
1061	ZIT	GG	GG				
1062	ZIT	TT	GG				
1064	ZIT	GG	GG				
1065	ZIT	GT	GG				
1066	ZIT	GT	GG				