

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA VUK

**POVEZANOST POLIMORFIZMA Ala16Val V GENU ZA SUPEROKSIDNO DISMUTAZO
2 Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO TER BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE
REMODELACIJE**

**RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISM Ala16Val SUPEROXIDE DISMUTASE 2
GENE WITH BONE MINERAL DENSITY AND BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE
REMODELING**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. ter asis. Simone Jurkovič, mag. farm.

Izjava:

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

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	iii
POVZETEK/ ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
KAZALO SLIK	ix
KAZALO RAZPREDELNIC	x
KAZALO GRAFOV	xi
1. UVOD	1
1.1 KOSTNINA	1
1.1.1 Zgradba kostnine	1
1.1.2 Kostna remodelacija	2
1.2 OSTEOPOROZA	3
1.2.1 Etiologija osteoporoze	4
1.2.2 Diagnoza osteoporoze	5
1.2.3 Zdravljenje osteoporoze	7
1.3 OKSIDATIVNI STRES in OSTEOPOROZA	8
1.3.1 Reaktivne kisikove spojine (<i>angl.</i> : reactive oxygen species- ROS)	8
1.3.2 Antioksidantni sistem	9
1.3.3 Oksidativni stres	10
1.3.4 Oksidativni stres in osteoporoza	10
1.3.5 Superoksidna dismutaza (SOD)	14
1.3.6 Superoksidna dismutaza 2, SOD2, MnSOD	14
2. NAMEN DELA	18
3. METODE IN MATERIALI	19
3.1 OPIS PREISKOVANCEV	19
3.2 OPIS VZORCEV DNA	21
3.3 ALELNA DISKRIMINACIJA V REALNEM ČASU	21
3.3.1 POMNOŽEVANJE ODSEKA DNA	23
3.3.2 REAGENTI IN OPREMA	26

3.3 STATISTIČNE METODE.....	27
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	28
4.1 OPTIMIZACIJA POGOJEV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO V REALNEM ČASU.....	28
4.2 PRIKAZ ANALIZE REZULTATOV ALELNE DISKRIMINACIJE.....	29
4.2 UGOTAVLJANJE KLINIČNEGA POMENA Ala 16 Val V GENU SOD2.....	32
4.2.1 GENOTIPSKA FREKVENCA POLIMORFIZMA V SLOVENSKI POPULACIJI.....	34
4.2.2 VPLIV POLIMORFIZMA A16V NA MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN KONCENTRACIJO BIOKEMIJSKIH KAZALCEV KOSTNE REMODELACIJE.....	35
5. SKLEP.....	57
6. LITERATURA.....	59
7. PRILOGA.....	63
7.1 PRILOGA 1: REZULTATI GENOTIPIZACIJE.....	63
7.2 PRILOGA 2: NORMALNOST PORAZDELITVE SPREMENLJIVK.....	72

POVZETEK/ ABSTRACT

Povezanost polimorfizma Ala16Val v genu za superoksidno dismutazo 2 z mineralno kostno gostoto ter biokemijskimi kazalci kostne remodelacije

Zaradi staranja prebivalstva se v razvitem svetu povečuje pojavnost osteoporoze. Pomemben faktor tveganja za njen nastanek, povezan s staranjem, je stanje oksidativnega stresa. Obrambo pred njim predstavlja antioksidativni sistem. Pomemben encim tega sistema je superoksidna dismutaza 2 (SOD2), ki ščiti organizem pred negativnimi učinki reaktivnih kisikovih spojin. Eden izmed učinkov oksidacijskega stresa je tudi zmanjšana mineralna gostota, ki lahko privede do nastanka osteoporoze. Genski polimorfizem Ala16Val v genu za SOD2 vpliva na aktivnost encima. V diplomski nalogi smo na 619 preiskovancih z metodo alelne diskriminacije v realnem času genotipizirali DNA vzorce, določili pogostost polimorfizma, nato pa ocenili njegov klinični pomen. Ugotovili smo, da ima genotip A/A 24,05%, genotip A/G 47,47% ter genotip G/G 28,48% preiskovancev. Genotipi so porazdeljeni v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem. Naši rezultati so pokazali povezanost genotipov s serumskimi koncentracijami biokemijskih kazalcev DPD, sBALP in pOC, in sicer v celotni skupini ($p_{\text{DPD}} = 0,007$, $p_{\text{pOC}} = 0,037$, $p_{\text{sBALP}} = 0,045$), v skupini žensk ($p_{\text{DPD}} = 0,007$, $p_{\text{pOC}} = 0,048$, $p_{\text{sBALP}} = 0,021$) ter v skupini pomenopavznih žensk ($p_{\text{DPD}} = 0,006$, $p_{\text{pOC}} = 0,028$, $p_{\text{sBALP}} = 0,053$). V skupini moških povezanosti Ala16Val s serumskimi koncentracijami biokemijskih kazalcev nismo dokazali. Z mineralno kostno gostoto je bil polimorfizem povezan le v skupini žensk, starih od 50 do 59 let, in sicer $p_{\text{BMD}_{\text{fin}}} = 0,032$, $p_{\text{BMD}_{\text{ls}}} = 0,040$, $p_{\text{BMD}_{\text{tot}}} = 0,049$. Raziskavo bi bilo smiselno ponoviti na večjem številu preiskovancev, hkrati pa poskušati boljše razložiti mehanizem vpliva polimorfizma na mineralno kostno gostoto in spremembo v koncentraciji kazalcev kostne remodelacije.

Relationship between polymorphism Ala16Val superoxide dismutase 2 gene with bone mineral density and biochemical markers of bone remodeling

Osteoporosis is a growing issue in modern world as its population gets older. Oxidative stress has an important impact on development of osteoporosis. The organism has antioxidant systems which neutralize the harmful effect of reactive oxygen species (ROS). One of these effects is reduced bone mineral density, which can lead to development of osteoporosis. One of most important antioxidant enzyme that activates the detoxification of ROS is SOD2. A significant association of Ala16Val SOD2 gene polymorphism with SOD2 activity was found. Using allelic discrimination in real time, genotype of 619 DNA samples was determined and the prevalence of polymorphism was investigated in scope of our diploma work. The frequency of the SOD2 A/A genotype was 24,05%, the frequency of A/G genotype was 47,47% and the frequency of G/G genotype was 28,48% in the population of 619 subjects. Genotypes were distributed in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. We estimated clinical impact of Ala16Val polymorphism with statistical tests. There was statistical significance between Ala16Val and concentration of biochemical markers of bone remodeling DPD, pOC and sBALP in different research groups: all subjects ($p_{\text{DPD}} = 0,007$, $p_{\text{pOC}} = 0,037$, $p_{\text{sBALP}} = 0,045$), women ($p_{\text{DPD}} = 0,007$, $p_{\text{pOC}} = 0,048$, $p_{\text{sBALP}} = 0,021$) and women after menopause ($p_{\text{DPD}} = 0,006$, $p_{\text{pOC}} = 0,028$, $p_{\text{sBALP}} = 0,053$). In research group of men no association

between genotype and concentration of biochemical markers of bone remodeling was found. Statistical significance between Ala16Val and bone mineral density was only found in research group of women, between 50 and 59 years of age ($p_{\text{BMD}_{\text{in}}}$ = 0,032, $p_{\text{BMD}_{\text{is}}}$ = 0,040, $p_{\text{BMD}_{\text{tot}}}$ = 0,049). For broader understanding of relationship between polymorphism and bone mineral density and concentration of biochemical markers of bone remodeling, the research would have to be repeated on much larger group of subjects.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ala – aminokislina alanin

ALP – alkalna fosfataza

ANCOVA – analiza kovariance

ANOVA – analiza variance

ATP – adenzin trifosfat

BFM – telesna masa maščobe (*angl.*: body fatt mass)

BMD – mineralna kostna gostota (*angl.*: bone mineral density)

BMDfn – BMD v predelu vratu stegenice

BMDls – BMD v predelu ledvenih vretenc od L2 do L4

BMDtot – BMD v predelu celotnega kolka

CAT - katalaza

CTX - Prečni povezovalci C- telopeptidov kolagena tipa I v urinu in serumu

DEXA – dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (*angl.*: Dual- Energy X- Ray absorptiometry)

DNA – deoksiribonukleinska kislina

dNTP – deoksiribonukleozid trifosfat

DPD - deoksi piridinolin

ESR1 – etrogenski receptor 1

FoxO – transkripcijski faktorji Forkhead box

GPX - glutation peroksidaza

GSR – glutation reduktaza

GST – glutation S transferaza

ITM – indeks telesne mase

KOPB - kronična obstruktivna pljučna bolezen

NTX - Prečni povezovalci N- telopeptidov kolagena tipa I v urinu in serumu

OPG – osteoprotegrin

PBM – povprečna kostna masa odraslih moških (*angl.*: peak bone mass)

PCR - verižna reakcija s polimerazo (*angl.*: polymerase chain reaction)

PMO – postmenopavzalna osteoporoza PTH - parathormon

pOC – plazemska koncentracija osteokalcina

PTH – parathormon

qPCR – kvantitativni PCR

RANK – receptor za aktivacijo jedrnega faktorja kappa- B

RANKL- ligand receptorja za aktivacijo jedrnega faktorja kappa- B

ROS – reaktivne kisikove spojine (*angl.*: reactive oxygen species)

RNS – reaktivne dušikove spojine *angl.*: reactive oxygen species)

TNF – dejavnik tumorske nekroze

WHO – World Human Organization

sBALP – kostno- specifična alkalna fosfataza

SD – standardna deviacija

SERM – selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev

SNP – polimorfizem enega nukleotida (*angl.*: single nucleotide polymorphism)

SOD – superoksidna dismutaza

TAS – skupen antioksidativni status (*angl.*: total antioxidant status)

TCF – T- celični faktor

t_{fn} – t vrednost za glavo stegnenice

t_{ls} – t vrednost za ledvena vretenca

TOS – skupen oksidacijski status (*angl.*: total oxidant status)

TRAP - Tartrat- rezistentna kislina fosfataza

t_{tot} – t vrednost za celoten kolk

UV – ultravijolična svetloba

Val – aminokislina valin

KAZALO SLIK

Slika 1: Faze kostne remodelacije	2
Slika 2: Doseganje kostne mase pri ženskah (PBM: <i>angl.</i> : peak bone mass- najvišja kostna masa) ...	3
Slika 3: Izguba višine, značilna za kompresijske zlome vretenc	3
Slika 4: Model za določanje stanja kosti pri merjenju BMD.	5
Slika 5: Mehanizem delovanja antioksidantnih encimov.....	10
Slika 6: Shema preusmeritva beta- katenina iz TCF- na FoxO- posredovano transkripcijo.....	13
Slika 7: Prikaz kromosoma 6 in lega gena za SOD2 na njem.....	15
Slika 8: Prikaz poteka alelne diskriminacije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času	22
Slika 9: Razporeditev genotipov po klastrih.	29
Slika 10: Prikaz pomnoževanja produktov za vse vzorce skupaj.	30
Slika 11: Primer krivulj za genotip G/G.	31
Slika 12 : Primer krivulj za genotip A/G.	31
Slika 13: Primer krivulj za genotip A/A.	32

KAZALO RAZPREDELNIC

Razpredelnica 1: Vzroki za sekundarno osteoporozo.	5
Razpredelnica 2: Različne tehnologije za merjenje BMD	6
Razpredelnica 3: Kazalci kostne remodelacije in njihova razdelitev glede tvorbe in resorpcije kostnine.	7
Razpredelnica 4: Razdelitev terapije in posamezna zdravila	8
Razpredelnica 5: Prikaz porazdelitve alela G med različnimi svetovnimi narodi in rasami	15
Razpredelnica 6: Povprečne vrednosti in standardna deviacija različnih parametrov za moške, ženske in celotno populacijo preiskovancev.	20
Razpredelnica 7: Povprečne vrednosti in standardna deviacija različnih parametrov za ženske pred menopavzo in po njej.	21
Razpredelnica 8: Pregled statističnih testov, uporabljenih v diplomski nalogi.	27
Razpredelnica 9: Shema poteka reakcije po optimizaciji protokola reakcije.....	28
Razpredelnica 10: Frekvenca genotipov v različnih preiskovalnih skupinah v naši raziskavi.	34
Razpredelnica 11: Povprečne vrednosti in SD nekaterih spremenljivk pri pomenopavznih in premenopavznih ženskah.	46
Razpredelnica 12: Zbrani genotipi za posamezne vzorce.	71
Razpredelnica 13: Prikaz porazdelitve spremenljivk po skupinah.	72
Razpredelnica 14: Prikaz porazdelitve spremenljivk za ženske	73

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečna vrednost koncentracije sBALP v odvisnosti od genotipa	35
Graf 2: povprečna vrednost DPD v odvisnosti od genotipa.....	37
Graf 3: povprečna vrednost pOC v odvisnosti od genotipa.	37
Graf 4: Povprečna vrednost pOC glede na model dedovanja.	39
Graf 5: Povprečna vrednost BMDls v odvisnosti od genotipa.....	40
Graf 6: Povprečna vrednost BMDtot v odvisnosti od genotipa	41
Graf 7: Povprečna vrednost sBALP v odvisnosti od genotipa.....	39
Graf 8: Povprečna vrednost pOC v odvisnosti od genotipa.....	42
Graf 9: Povprečna vrednost DPD v odvisnosti od genotipa.	42
Graf 10: Povprečna vrednost DPD glede na model dedovanja.....	40
Graf 11: Povprečna vrednost pOC glede na model.....	44
Graf 12: Povprečna vrednost sBALP v odvisnosti.....	42
Graf 13: Povprečna vrednost DPD v odvisnosti od	47
Graf 14: Povprečna vrednost pOC glede na model dedovanja.	48
Graf 15: Povprečna vrednost BMDfn v odvisnosti od genotipa.....	44
Graf 16: Povprečna vrednost BMDls v odvisnosti od genotipa.....	50
Graf 17: Povprečna vrednost BMDtot v odvisnosti od genotipa.	50
Graf 18: Povprečna vrednost BMDls glede na model dedovanja.....	45
Graf 19: Povprečna vrednost BMDtot glede na model dedovanja	51
Graf 20: Povprečna vrednost BMDfn glede na model dedovanja.	52
Graf 21: Povprečna vrednost sBALP v odvisnosti od genotipa.....	47
Graf 22: Povprečna vrednost DPD v odvisnosti od genotipa	53
Graf 23: Povprečna vrednost ALP v odvisnosti od genotipa.....	54
Graf 24: Povprečna vrednost ALP glede na model dedovanja.....	48
Graf 25: Povprečna vrednost sBALP glede na	55
Graf 26: Povprečna vrednost DPD glede na model dedovanja.....	55

1. UVOD

1.1 KOSTNINA

Kostnina je kompleksno tkivo, ki daje telesu oporo, varuje življenjsko pomembne organe, nanj so pripete mišice, hkrati pa je shramba za kostni mozeg in minerale, predvsem kalcij (1, 2, 3, 4).

1.1.1 Zgradba kostnine

Kostnino tvorita dve različni komponenti, organska in anorganska in od njiju je odvisna trdnost in prožnost kostnine (5). Obe komponenti sta pomembni tudi za mehansko moč kosti. Le- ta je sestavljena iz kortikalnega, zunanega in trabekularnega, notranjega dela. Kortikalni del večinoma prenaša mehanske obremenitve, trabekularni del pa je bolj občutljiv na hormone in ostale biološke faktorje, vključene v kostni metabolizem (5). Organski del kosti sestavljajo tudi kostne celice:

-osteoblasti so odgovorni za rast kosti. So monojedrne celice, ki se razvijejo iz mezenhimskih progenitorskih celic, ki so multipotentne in se lahko razvijejo tudi v stromalne celice kostnega mozga ali adipocite. Signal za tvorbo osteoblastov še ni popolnoma razumljen, dokazano pa je, da so vanj vključene Wnt signalne poti (2).

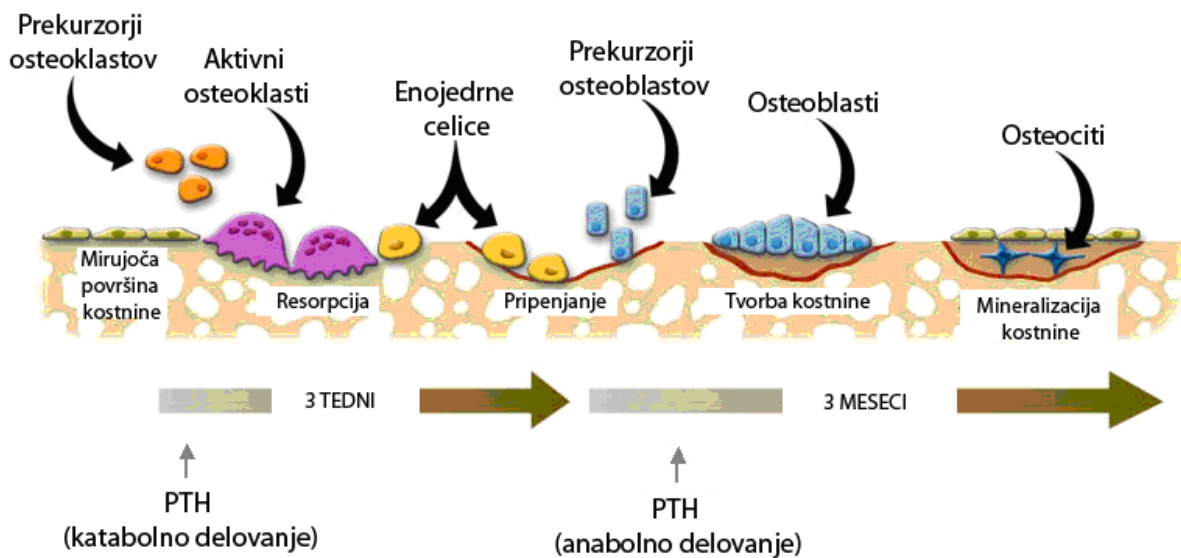
-osteoklasti kost razgrajujejo. So večjedrne gigantske celice, ki se razvijejo iz mieloidnega roda hematopoetskih celic, iz katerih nastajajo tudi makrofagi (2, 3). Osteoklastogeneza zanimivo potrebuje interakcije med osteoklasti in osteoblasti (2).

-osteociti so v zgrajeni kosti zagozdeni osteoblasti. Te celice naj bi začutile mehansko silo na kost in poslale signale celicam, ki regulirajo kostno remodelacijo na kostni površini. Osteociti se med seboj in s celicami na površini kosti povezujejo s celičnimi povezavami, na ta način nastanejo kanalčki v mineralizirani kosti, imenovani kanalikuli (2). Skupno delovanje naštetih celic je odločilno za nenehno presnovo kosti.

1.1.2 Kostna remodelacija

Kostnina je dinamično tkivo, ki se nahaja v ravnotežju nenehne tvorbe in razgradnje (3, 4, 6, 7). Ta proces imenujemo kostna remodelacija (Slika 1). Osteoklasti se tipično povezujejo in odstranjujejo kostnino v obdobju treh tednov. Za tem delujejo osteoblasti in odlagajo nov kostni matriks (4, 8). Nova kostnina se odlaga v koncentričnih krogih, imenovanih lamele (4).

Proces kostne remodelacije

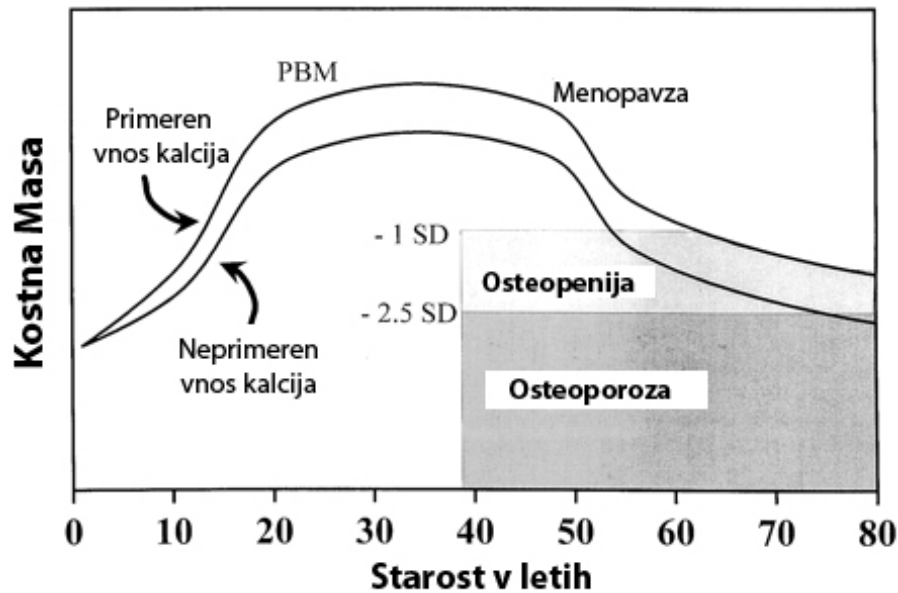


Slika 1: Faze kostne remodelacije (9)

Približno 10 % celotnega okostja se obnovi v enem letu. Naloga tega procesa je:

- prilagoditev kostne oblike in debeline kot odziv na okoljski in mišični stres ter
- nadomestitev stare kostnine, ki je šibkejša od novo naloženega matriksa (4).

Remodelacija je uravnavana z estrogenom, parathormonom, RANK ligandom, kalcitoninom, vitaminom D, prostaglandini, interlevkini, rastnimi faktorji, družino TNF in nekaterimi ostalimi hormoni in citokini (6, 7).



Slika 2: Doseganje kostne mase pri ženskah (10) (PBM: *angl.*: peak bone mass- najvišja kostna masa)

Najvišja kostna masa (*angl.*: peak bone mass - PBM) se doseže pri tridesetih letih (Slika 2). Moški dosežejo večjo (6). To je povezano z dejstvom, da mišične kontrakcije inducirajo napetost v kosti, čemur sledi kostna remodelacija in s tem povečanje kostne mase in njene moči. Mišice pa so ena izmed tarč delovanja moških spolnih hormonov, androgenov. Ti povečajo rast mišične mase (11).

1.2 OSTEOPOROZA

Po WHO je definirana kot sistemska bolezen skeleta, za katero je značilno stanje, pri katerem je vrednost mineralne kostne gostote (*angl.*: Bone Mineral Density- BMD) vsaj 2,5 SD pod povprečno vrednostjo BMD pri odrasli populaciji (5, 12). Okarakterizirana je kot zmanjšanje kostnine in poslabšanje kostne mikroarhitekture (5). Osteoporoza je povezana s povečanim tveganjem za zlome. Najbolj pogosti so zlomi vretenc (Slika 3), najbolj ogožujoči za življenje pa zlomi kolka (6). Zaradi podaljševanja človeške življenjske dobe predstavlja osteoporoza čedalje večji problem v zdravstvu (1, 8).



Slika 3: Izguba višine, značilna za kompresijske zlome vretenc (13)

1.2.1 Etiologija osteoporoze

Osteoporoza je povezana z neravnovesjem v aktivnosti osteoblastov in osteoklastov in izgubo kostnine zaradi povečane stopnje resorpcije (6). Lahko je **primarna** ali **sekundarna**.

Največkrat pride do **primarne osteoporoze**, še posebej pri starostnikih. Vključuje tip I (postmenopavzalna) in tip II (senilna) osteoporoze (6). Tip I je posledica pomanjkanja estrogena, kar poveča ekspresijo nekaterih citokinov in s tem resorpcijo kostnine (6, 8, 14, 15). Za to vrsto so najbolj značilni zlomi vretenc v notranji porozni kostnini (trabekularna kostnina). Faktorji tveganja za razvoj osteoporoze pri postmenopavzalnih ženskah so:

- kavkazijski ali azijski izvor,
- prezgodnja menopavza (zadnja menstruacija pred 40. letom starosti),
- zgodnja menopavza (zadnja menstruacija pred 45. letom starosti) (16),
- pojav osteoporoze v družini,
- nizek indeks telesne mase (ITM),
- malnutricija,
- fizična neaktivnost,
- kajenje
- pretirano uživanje alkohola.

Tip II prizadane starostnike, starejše od 70 let. Ženske prizadane v dvakrat večjem številu kot moške. Za to vrsto pa so značilni zlomi zunanje, kortikalne kostnine dolgih kosti, kot je na primer zlom vratu stegenice. Nastane lahko kot posledica starostnega pomanjkanja vitamina D, zato pride do hipokalcemije in zaradi tega do kompenzatornega povišanja parathormona (PTH) in s tem kostne resorpcije (6).

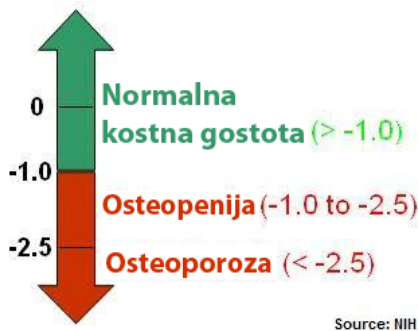
Dejavniki za nastanek **sekundarne osteoporoze** pa so (Razpredelnica 1) (4, 6):

POGOSTI VZROKI ZA SEKUNDARNO OSTEOPOROZO
<ul style="list-style-type: none"> • hipogonadizem pri moških
<ul style="list-style-type: none"> • hiperparatiroidizem
<ul style="list-style-type: none"> • kronična uporaba glukokortikoidov
<ul style="list-style-type: none"> • malabsorpcija
<ul style="list-style-type: none"> • anoreksija in hujšanje

Razpredelnica 1: Vzroki za sekundarno osteoporozo.

1.2.2 Diagnoza osteoporoze

BMD meritev je ključnega pomena pri odločitvi za zdravljenje osteoporoze. Enako merjenje se uporablja tudi za spremljanje učinkovitosti zdravljenja (12). BMD je ponavadi podan kot t-vrednost ali z- vrednost. T- vrednost pod -2,5 pomeni osteoporozo (Slika 4) (12).



Slika 4: Model za določanje stanja kosti pri merjenju BMD (17).

Za merjenje BMD se uporabljajo različne metode, največkrat uporabljena pa je dvoenergijska X-žarkovna absorpciometrija (*angl.*: Dual- Energy X- Ray; DEXA), ker je enostavna in omogoča nizko izpostavljenost sevanju (Razpredelnica 2) (6).

TIP MERITVE	POTREBEN ČAS	MESTA MERITEV	DOZA RADIACIJE	SLABOSTI	PREDNOSTI	STROŠKI
QCT (kvantitativna računalniška tomografija)	15-20 min	Vretenca, kolk	Precej visoka	Napaka pri točnosti in natančnosti	Trabekularni kostni deli se lahko merijo ločeno od kortikalnih	visoki
DEXA	10-20 minut	Vretenca, kolki	nizka	Osteoartritis v vretencih lahko moti interpretacijo	Visoka natančnost	Relativno visoki
SPA (enofotonska absorpciometrija)	10- 15 minut	Podlaktica, peta	nizka		Visoka natančnost	nizki
Ultrazvok		Različna	nič	Slaba natančnost	Edina tehnika, ki meri arhitekturo kosti	
Rentgenski žarki	<5 minut	Različna	nič	Relativno neobčutljiva, neprimerna za "screening test"	Velika dostopnost	

Razpredelnica 2: Različne tehnologije za merjenje BMD

Vendar pa samo merjenje BMD ni dovolj. Pogosto se namreč zgodi, da se zlomi pojavijo pri pacientih, ki imajo t- vrednost > -2,5, hkrati pa so lahko nekateri bolniki z znižanim BMD zaščiteni pred zlomi (12). Zaradi teh dejstev je potrebno še merjenje kazalcev kostne remodelacije v serumu ali urinu (Razpredelnica 3) (6).

KAZALCI TVORBE KOSTI	KAZALCI KOSTNE RESORPCIJE
Serumski osteokalcin	Hidroksiprolin v urinu
Serumska totalna alkalna fosfataza (ALP)	Prosti piridinolin v urinu
Serumska kostno- specifična AP (BSAP)	Prosti deoksipiridinolin v urinu (DPD)
Serumski C- terminalni propeptid kolagena tipa I	Prečni povezovalci C- telopeptidov kolagena tipa I v urinu in serumu (CTX)
Serumski N- terminalni propeptid kolagena tipa I	Prečni povezovalci N- telopeptidov kolagena tipa I v urinu in serumu (NTX)
	Serumski C- telopeptid
	Totalni piridinolin v urinu
	Totalni deoksipiridinolin v urinu
	Tartrat- rezistentna kislina fosfataza (TRAP)

Razpredelnica 3: Kazalci kostne remodelacije in njihova razdelitev glede tvorbe in resorpcije kostnine.

Stabilizacija kazalcev kostne remodelacije se ponavadi zgodi pri tridesetih letih in pri zdravih ostane približno enaka do 70. leta starosti (18). V retrospektivni študiji so Akkenson in sodelavci pri ženskah z zlomi v šestih letih odkrili zmanjšano serumsko koncentracijo osteokalcina, vendar pa normalno stopnjo resorpcije. V Rotterdamski študiji, izvedeni na velikem vzorcu žensk, od katerih je bilo 60 odstotkov starih nad 55 let, so odkrili, da so imele povišano koncentracijo deoksipiridinolina (DPD) v urinu. S tem se je povečalo tveganje za zlom kolka, neodvisno od BMD (18). Pri neki drugi študiji so pri pacientih, starejših od 75 let, odkrili signifikantne povezave med serumskimi prečnimi povezovalci C- telopeptidov kolagena tipa I (CTX), tartrat- rezistentne kisle fosfataze (TRAP) in DPD in BMD, merjeno v nogi. Ni pa bilo nobenih povezav z BMD v predelu vretenc. Verjetno bi kostni kazalci z boljšo specifičnostjo in natančnostjo povečali možnost napovedovanja stopnje izgube kostnine. Zaenkrat pa samo merjenje kostnih kazalcev ni dovolj za ugotovitev diagnoze (6, 12). Lahko pa se z merjenjem kazalcev remodelacije spremlja učinkovitost terapije ali pa sploh določi vrsto terapije (18).

1.2.3 Zdravljenje osteoporoze

Ker je osteoporoza bolezen, ki zadeva precejšen delež razvitega sveta in lahko s staranjem prebivalstva le-ta postane še večji, se moramo truditi, da bi boljše poskrbeli za njeno preventivo. Dejavniki, ki ugodno vplivajo na razvoj kosti so: vadba, dovolj visok nivo kalcija v krvi, zmerno

izpostavljanje soncu in s tem tvorba vitamina D ali pa jemanje kalcija in analogov vitamina D v obliki prehranskih dopolnil starostnikov. Pri starostnikih je potrebno tudi preprečevanje naključnih zlomov (4).

Če je osteoporoza že diagnosticirana, je potrebno pričeti s terapijo. Zdravila za zdravljenje osteoporoze se delijo na takšna, ki zmanjšajo resorpcijo kostnine in takšna, ki povečajo njeno tvorbo (Razpredelnica 4) (12, 18, 19).

ANTIRESORPTIVNA TERAPIJA	TERAPIJA, KI POVEČA TVORBO KOSTNINE
BISFOSFONATI	TERIPARATID
SELEKTIVNI MODULATORJI ESTROGENSKIH RECEPTORJEV (SERM)	VITAMIN D IN ANALOGI
HORMONSKA TERAPIJA Z ESTROGENI	
KALCIJ	
KALCITONIN SALMON	
DENOSUMAB	

Razpredelnica 4: Razdelitev terapije in posamezna zdravila (12)

1.3 OKSIDATIVNI STRES in OSTEOPOROZA

1.3.1 Reaktivne kisikove spojine (*angl.: reactive oxygen species-ROS*)

Prosti radikali so nestabilne, visoko reaktivne zvrsti. Stabilni postanejo, ko vežejo elektron iz nukleinskih kislin, lipidov, proteinov in s tem povzročijo različne verižne reakcije, ki imajo za posledico celične poškodbe. Poznamo dve veliki skupini: reaktivne kisikove spojine (ROS) in reaktivne dušikove spojine (RNS) (20, 21). ROS se tvorijo v sesalskih celicah kot posledica aerobnega dihanja. V primerjavi z anaerobnimi organizmi aerobni lahko s pomočjo mitohondrijske dihalne verige dosežejo veliko večjo učinkovitost tvorbe energije. Slabost takega dihanja pa je sproščanje elektronov med mitohondrijsko sintezo ATP. Prvi redukcijski produkt O_2 je $O_2^{\cdot -}$. Poleg oksidativne fosforilacije se ROS tvorijo še v peroksisomih, citokromih P450 in vnetnih celicah (nevtrofilcih, eozinofilcih in makrofagih) (22). V organizmu imajo dve nasprotujoči si vlogi:

- so ključne signalne molekule v fizioloških procesih ter
- imajo pomembno vlogo v patofizioloških procesih. Ocenili so, da naj bi sodelovali pri stotih boleznih (21).

Obstaja nekaj eksogenih virov ROS: ionizirajoče sevanje, ozon in številna kemoterapevtska zdravila (22).

Med ROS uvrščamo: hidrosilni radikal ($\text{OH}\cdot$), superoksidni radikal ($\text{O}_2\cdot^-$) in vodikov peroksid (H_2O_2) (21).

Superoksidni radikal

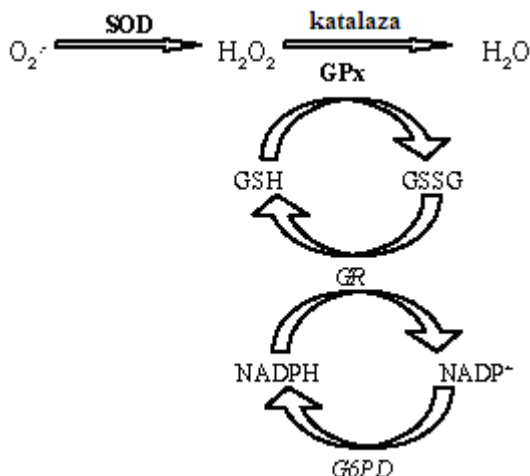
Največji del $\text{O}_2\cdot^-$ nastane v mitohondrijski transportni verigi, v manjšem obsegu nastaja tudi v fagocitih. V elektronski transportni verigi poznamo 2 kompleksa, kompleks I in kompleks III. Oba tvorita $\text{O}_2\cdot^-$. Ker je v anionski obliki, ne more prehajati lipidnih membran, zato ga je največ v mitohondrijih. Nedavno narejene študije so pokazale, da se $\text{O}_2\cdot^-$, ki se sprošča iz kompleksa I, sprošča le v matriks mitohondrija. Ta odkritja ustrezajo mestu, na katerem lahko $\text{O}_2\cdot^-$ inducira pot tvorbe celičnih poškodb, in sicer so to Fe-S klastri. Študije na kompleksu III so pokazale, da le- ta sprošča $\text{O}_2\cdot^-$ direktno v ekstramitohondrijski prostor, vendar pa je to le majhen odstotek $\text{O}_2\cdot^-$. V manj reaktivno obliko ga pretvarja encim superoksidna dismutaza (SOD). Če ni primerno razgrajen v mitohondriju, lahko prebitek $\text{O}_2\cdot^-$ inhibira mitohondrijsko funkcijo z inaktiviranjem Fe-S centrov v elektronski transportni verigi. Sproščen Fe^{2+} sodeluje v Fentonovi reakciji. To čez čas povzroči poškodbe celic in nato njihovo apoptozo (22, 23, 24).

1.3.2 Antioksidantni sistem

Telo je razvilo vrsto obrambnih mehanizmov, da bi se zaščitilo pred škodljivimi učinki ROS (15, 20, 21). Poznamo endogeno in eksogeno komponento antioksidantnega sistema. Prvo komponento predstavljajo encimski antioksidanti. Encimi so znani tudi kot naravni antioksidanti in nevtralizirajo prebitek ROS. Med najbolj znane in proučevane uvrščamo: superoksidno

dismutazo (SOD), katalazo (CAT), glutation peroksidazo (GPX) ter glutation reduktazo (GSR) (Slika 5) (20, 21).

V pomoč encimom v boju proti ROS služijo še neencimski antioksidanti. Ti so: vitamina C in E, selen, cink, taurin, hipotaurin in karotenoidi (20, 21).



Slika 5: Mehanizem delovanja antioksidantnih encimov (43). (SOD: superoksidna dismutaza, GPx: glutation peroksidaza, GSH: glutation, GSSG: oksidirani glutation, GR: glutation reduktaza, G6PD: glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, NADPH: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat)

1.3.3 Oksidativni stres

Navadno je nastanek prostih radikalov uravnotežen z antioksidantnim obrambnim sistemom. V kolikor pa koncentracija antioksidantov pade ali se poveča produkcija ROS, se kot rezultat pojavi oksidativni stres (1, 8, 20, 21, 22, 23).

Oksidativni stres je vključen v proces staranja in v številne bolezni. To so: rak, diabetes, hipertenzija, kronična okvara ledvic, ateroskleroza, v zadnjem času ga povezujejo tudi z osteoporozo (8, 22, 25). Večina teh bolezni je povezana s staranjem in prevladuje hipoteza, da se staranje kaže kot nalaganje oksidativnih poškodb na proteinih, lipidih, genomski in mitohondrijski DNA (25).

1.3.4 Oksidativni stres in osteoporoz

Nedavno opravljene študije razkrivajo, da ima oksidativni stres pomemben vpliv na diferenciacijo in funkcijo osteoklastov in osteoblastov (1). Te študije so razkrile, da ROS, še

posebej $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 , stimulirajo diferenciacijo osteoklastov in jih aktivirajo (1, 8). Predlagali so, da naj bi povečana aktivnost osteoklastov povečala tvorbo superoksidnega aniona in zmanjšala aktivnost SOD in GPX (14, 15). V študiji, narejeni na bolnikih z osteoporozo in zdravih preiskovancih, so ugotovili znižano stopnjo celokupnega antioksidantnega statusa (*angl.*: total antioxidative status - TAS) in zvišano stopnjo celokupnega oksidacijskega statusa (*angl.*: total oxidative status - TOS) (8). Zaradi teh ugotovitev bi lahko novo terapevtsko linijo zdravljenja osteoporoze predstavljala dieta, bogata z antioksidanti (8, 14, 15).

Na aktivnost osteoklastov vpliva več mehanizmov, povezanih z nastankom osteoporoze.

Izguba estrogena signifikantno vpliva na pospešeno izgubo kostnine v postmenopavzalnem obdobju (PMO) žensk (8). Podgane z odstranjenimi jajčniki so uporaben model za proučevanje osteoporoze. Ta model kaže progresivno izgubljanje kostnega matriksa preko podobnega procesa kot poteka pri PMO. V tej študiji so odkrili, da so ROS vključeni v osteoklastogenezo in resorpcijo kostnine. Osteoklasti pri resorpciji tvorijo visoke količine $O_2^{\cdot -}$. Hkrati so odkrili signifikantna znižanja stopenj aktivnosti SOD, GPX in GST v stegenici podgan z odstranjenimi jajčniki. Zaradi teh odkritij so predlagali hipotezo, da zaradi znižanja estrogena organizem ne uspe premagovati oksidativnega stresa (15). Poleg znižane stopnje TAS pa se zaradi znižanja stopnje estrogena indirektno aktivirajo osteoklasti, kar povzroči redukcijo kostne mase in nastanek osteoporoze (14).

Pri študijah na ljudeh se je težko izogniti zavajajočim faktorjem proučevanja oksidativnega stresa kot so: način življenja, prehrana, kajenje, stanje psihičnega in fizičnega stresa (1). Vsi ti dejavniki so tudi povezani z nastankom osteoporoze (8, 15). Zato sam mehanizem delovanja ROS na kostnino še ni popolnoma znan.

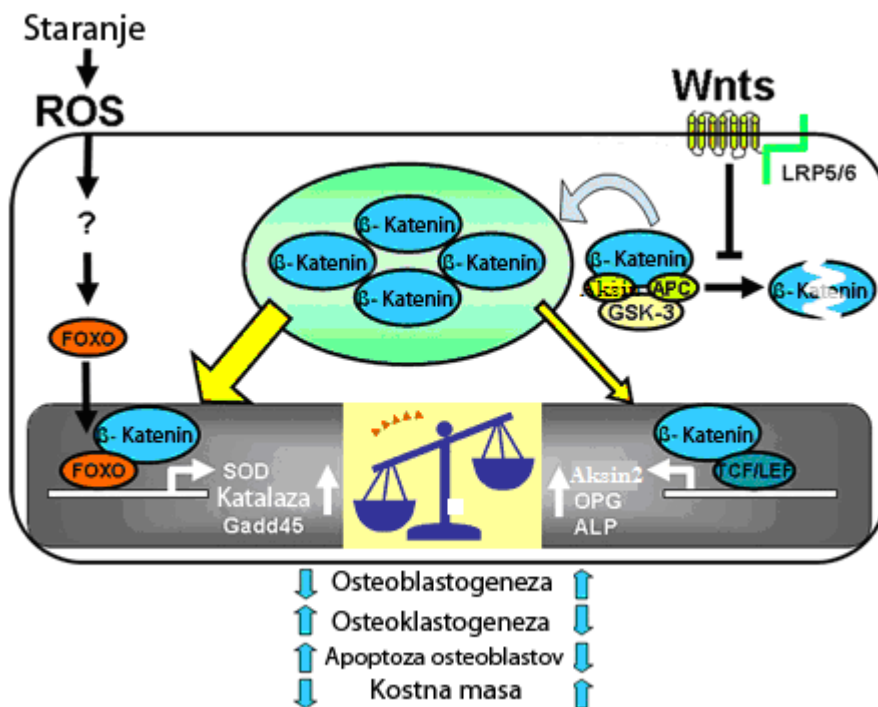
Nova odkritja so pokazala, da mora za aktivacijo osteoklastov in s tem stimulacijo resorpcije priti do interakcij med osteoklasti in osteoblasti (2, 7). Takšen molekularni mehanizem so poimenovali "coupling hipoteza" (2). V mehanizem so vključeni trije člani TNF družine (2, 3, 7). Osteoblasti tvorijo **RANKL** (*angl.*: receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand), ki aktivira diferenciacijo razvoj osteoklastov. Osteoblasti tvorijo in izločajo tudi osteoprotegerin (**OPG**), receptor, ki lahko prekine RANK/ RANKL interakcije. Stimulatorji kostne resorpcije

povečajo izražanje RANKL-a v osteoblastih, nekateri tudi zmanjšajo izražanje OPG. Kostne celice izražajo na membrano vezano obliko RANKL-a in zato morajo osteoblasti fizično reagirati s prekursorji osteoklastov, ki aktivirajo **RANK** (*angl.*: receptor activator of nuclear factor-kappaB). RANK je biološko aktiven receptor za RANKL in se nahaja na zrelih osteoklastih in njihovih prekursorjih. Povečano signaliziranje RANK-a poveča tvorbo in aktivacijo osteoklastov (2, 3, 7). Pokazano je bilo, da se pri ženskah v zgodnji postmenopavzi na površini kostnega mozga poveča stopnja RANKL-a (7).

Zadnje presenetljivo odkritje je, da izražanje OPG-ja, ki je potencialni inhibitor tvorbe osteoklastov, regulira Wnt/ beta-katenin signalna pot v osteoblastih in da enaka pot regulira tudi tvorbo osteoblastov. Torej na kostno maso vplivata dve veliki signalni poti: RANK/RANKL in Wnt/ beta- katenin (3).

S tem so se odprle nove možne poti, po katerih ROS povzročajo izgubo kostne mase. Signaliziranje **Wnt/ beta- katenina** povečuje maso kosti s stimulacijo osteoblastogeneze in zaviranje apoptoze osteoblastov (26). Beta- katenin je protein, ki je potreben za transkripcijsko aktivnost družine T- celičnih faktorjev (TCF) transkripcijskih faktorjev. Postavili so hipotezo, da ROS zavrejo osteoblastogenezo z antagoniziranjem Wnt/ TCF posredovane transkripcije v osteoblastih in da bi ta mehanizem lahko bil pomemben patogeni faktor za poškodbe skeleta, povezane s starostjo. Po tej hipotezi se beta- katenin veže na FoxO transkripcijske faktorje in tako se zavre osteoblastogeneza. V podporo tej hipotezi so odkrili, da se v osteoblastnih celičnih modelih, izpostavljenih H₂O₂, beta- katenin in FoxO3a fizično povežeta. V študiji so odkrili tudi, da je povečano izražanje FoxO zmanjšalo z Wnt inducirano diferenciacijo osteoblastov. Vse te ugotovitve so pokazale, da ROS zmanjšujejo diferenciacijo osteoblastov s preusmerjanjem omejene količine beta- katenina iz TCF na FoxO komplekse. FoxO je družina transkripcijskih faktorjev imenovanih Forkhead box O. Sestavljena je iz FoxO1, FoxO3a, FoxO4 in FoxO6. Ta družina pospešuje preživetje sesalskih celic tako, da zaustavlja celični ciklus in celico pošlje v mirovanje kot odziv na oksidativni stres. Študije na miših z izbrisanimi FoxO so dokazale, da izguba Foxo izčrpa hematopoetske izvorne celice z induciranjem njihove apoptoze. FoxO transkripcijski faktorji prav tako povečajo transkripcijo antioksidantnih encimov, kot sta MnSOD in CAT ter transkripcijo DNA popravljalnih genov, kot je Gadd 45. Stopnja teh tarčnih FoxO genov je bila povišana v starajočih se miših, medtem ko je bila stopnja Wnt tarčnih genov znižana. To dejstvo spet kaže na to, da pri oksidativnem stresu beta- katenin reagira s Foxo, s

čimer se zmanjša Wnt/TCF izražanje v osteoblastih (25, 26, 27). Glede na vse našeta dejstva imajo FoxO transkripcijski faktorji paradoksalno vlogo v nastanku osteoporozе v povezavi z oksidativnim stresom. Zaradi delovanja ROS pride do preusmeritve Wnt/ beta- katenin/ TCF poti na beta- katenin/FoxO pot. Posledica tega je znižanje osteoblastogeneze in povišane osteoklastogeneze, kar je lahko vzrok za nastanek osteoporozе. Vendar pa zaradi povišane stopnje FoxO transkripcijskih faktorjev pride do povišane stopnje antioksidantnih encimov MnSOD in CAT in posledičnega znižanja stopnje ROS (slika 6). Ves ta mehanizem delovanja še ni popolnoma razjasnen, je pa gotovo pomemben za poznavanje vpliva oksidacijskega stresa na osteoporozo. Ta odkritja bi lahko kazala na to, da je oksidativni stres neodvisen faktor tveganja za osteoporozo (28).



Slika 6: Shema preusmeritve beta- katenina iz TCF- na FoxO- posredovano transkripcijo (27). Na levi strani je prikazana preko FoxO posredovana transkripcija, na desni pa Wnt signalna pot. Signalna kaskada, ki vodi do aktivacije FoxO preko ROS, vsaj v tej študiji na celičnih modelih, ostaja nepoznana. Wnt se veže in aktivira LRP5/6- Frizzled receptorski kompleks. Tako preprečuje proteosomalno razgradnjo beta- katenina. Namesto tega se beta- katenin veže na APC, Aksin in glikogen sintazno kinazo 3 (GSK), kar pospeši nalaganje beta- katenina v citoplazmi. Beta- katenin se nato premesti v jedro, kjer se poveže s Tcf/ LEF transkripcijskimi faktorji in na tak način uravnava izražanje Wnt tarčnih genov. S staranjem se poveča tvorba ROS, ki preusmeri omejeno količino beta- katenina iz Tcf- na FoxO- posredovano transkripcijo. Ravnotežje se premakne v levo.

1.3.5 Superoksidna dismutaza (SOD)

Superoksidna dismutaza je ime za družino encimov, ki so vsi metaloproteini in katalizirajo isto reakcijo (34):

$$2 \text{O}_2^{\cdot -} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$$

Obstaja v treh različnih izoformah, ki se razlikujejo v naravi aktivnega kovinskega centra, aminokislinski zgradbi, številu podenot in nahajanju v celicah (23, 24, 29, 30, 31):

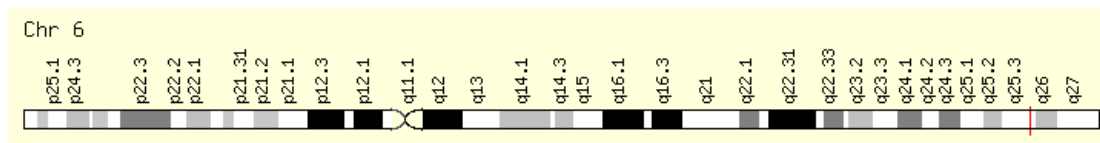
- SOD1, pri kateri sta kot kovini zastopana baker in cink in se nahaja v citoplazmi, drugo ime zanjo je Cu,ZnSOD;
- SOD2, pri kateri je kovina mangan in se nahaja v matriksu mitohondrija, drugo ime zanjo je MnSOD (24, 29, 30);
- SOD3, ki je ekstracelularna, drugo ime zanjo je EC-SOD (30, 31).

SOD tesno sodeluje z encimi, ki odstranjujejo H_2O_2 , to sta katalaza in glutation peroksidaza.

Pri proučevanju vpliva oksidativnega stresa na osteoporozo so nekatere študije pokazale zmanjšano aktivnost SOD (1, 8, 15). Študija oksidativnega stresa na podganah z odstranjenimi jajčniki poroča o signifikantno nižji aktivnosti SOD, kar lahko vodi v povečano nalaganje $\text{O}_2^{\cdot -}$, ki dokazano inhibira ostale antioksidantne encime (15). Spet druga študija na starejših Mehičanih, obolelih za osteoporozo, ni pokazala signifikantnih razlik v aktivnosti SOD med bolnimi in zdravimi. Vzorec preiskovancev je bil premajhen (N zdravih= 44, N obolelih= 50), da bi lahko z gotovostjo potrdili rezultate raziskave (28). Upoštevati moramo tudi, da je oksidativni stres dinamičen in kompleksen proces, zaradi česar bi kazalo pri študijah upoštevati moteče dejavnike, ki so: način življenja, hormonske spremembe, stanje psihičnega in fizičnega stresa in staranje (1, 28). V študiji na Mehičanih so bili nekateri od teh tudi izmerjeni (28).

1.3.6 Superoksidna dismutaza 2, SOD2, MnSOD

Gen za encim SOD2 kodira za mitohondrijski protein, ki tvori homotetramer in ima vezan en ion Mn na vsako podenoto. Ta protein se veže na superoksidne stranske produkte fosforilacije in jih pretvarja v H_2O_2 in dvoatomarni kisik (32). Gen je sestavljen iz petih eksonov in je dolg skoraj 20kbp. V 5'- regiji ni zaporedij TAAT ali CAAT, je pa bogata z GC regijami (okoli 78%) (33). Gen za encim se nahaja na položaju 6q25.3 (Slika 7) (32, 33).



Slika 7: Prikaz kromosoma 6 in lega gena za SOD2 na njem (32)

Z regijo na kromosomu 6, 6q25, je bila narejena študija povezave med debelostjo in osteoporozo, in sicer preko merjenja Body Fatt Mass (BFM) in BMD z bivariantno “linkage” analizo (34). Rezultati so pokazali, da obstajajo kompatibilni povezovalni signali okoli položaja 6q25. Tam je bil najden kandidatni gen, estrogenski receptor 1 (ESR1), ki je povezan tako z BMD kot debelostjo. S proučevanjem ESR1 gena bi lahko določili povezavo med tako kompleksnima boleznima, kot sta debelost in osteoporozo (34).

Pri miših z odstranjenim genom za *MnSOD* je prišlo do pojava metabolne acidoze, degeneracije nevronov in kardialnih miocitov ter so umrle prezgodaj zaradi dilatirane kardiomiopatije (22, 33). SOD1 in SOD3 nista bili pomembni za preživetje.

Encim MnSOD se nahaja v mitohondrijih, katerih največ vsebujejo najbolj dejavne vrste celic kot npr. srčne celice, celice trebušne slinavke in celice v jetrih. Najdemo jih tudi v kostnem mozgu (32).

V genu za *SOD2* so odkrili polimorfizem pri pacientih z genetskimi boleznimi prezgodnjega staranja. Na mestu 47 gena za SOD2 pride do tranzicijske substitucije G nukleotida v A nukleotid, kar ima za rezultat spremembo aminokislinskega zaporedja, in sicer CGA (Ala) v CAA (Val) na kodonu 16. Polimorfizem se imenuje rs4880 ali Ala16Val (32, 33, 35). Njegov položaj na kromosomu 6 je 160033862(-) in sekvenca CCGTTCGACCGAGGCCA/GAAACCCCATAGACCC (35). Pogostost G alela v različnih populacijah je prikazana v razpredelnici :

Populacija	Frekvenca G alela
Evropejci	0,398
Afro- Američani	0,500
Azijci	0,107
Podsaharski Afričani	0,360

Razpredelnica 5: Prikaz porazdelitve alela G med različnimi svetovnimi narodi in rasami (32).

Ala varianta *SOD2* omogoča bolj aktiven prehod encima v mitohondrijski matriks in s tem producira bolj aktivno *SOD2* v primerjavi z Val varianto (31). Val varianta spremeni alfa heliksno strukturo vijačnice, zaradi tega ostane encim na stopnji mitohondrijske membrane. Tak mutiran protein ima 30 - 40% manjšo aktivnost, organizem pa s tem povečano možnost za oksidativni stres. Predvidevamo torej, da imajo Ala/Ala homozigoti višjo aktivnost encima MnSOD (31). Na osnovi proučevanja polimorfizma Ala16Val so bile narejene že študije nekaterih bolezni, na primer raku na mehurju, raku prostate in Behcetovi bolezni (29, 30, 31, 33, 36). Študija, opravljena z verižno reakcijo s polimerazo na 230 zdravih prostovoljcih je pokazala, da imajo ženske, neodvisno od njihovega genotipa, za 15 odstotkov višjo aktivnost SOD2 od moških (33).

Študija Behcetove bolezni pri Japoncih je pokazala signifikantno povišanje 16 Val variante *MnSOD* pri obolelih v primerjavi z zdravimi kontrolnimi preiskovanci (30). V tej raziskavi so ugotovili tudi, da je Ala alel širše razširjen pri belcih, medtem ko je bila razširjenost Ala variante pri Azijcih signifikantno nižja. Val/ Val genotip naj bi bil torej najbolj pogost pri Azijcih (30). Druga podobna študija je bila opravljena pri kadilcih s KOPB, pri katerih je tudi povečan oksidativen stres. Študija je preučevala tveganje za nastanek KOPB zaradi polimorfizma Ala16Val. Signifikantnih razlik v distribuciji genotipov med bolnimi in zdravimi ni bilo. Pri tej študiji bi lahko izboljšali nekatere parametre, in sicer pacienti niso bili primerno vezani na kontrole po spolu ali statusu bivšega ali trenutnega kadilca, tudi meritve SOD2 so bile narejene v naključnem časovnem obdobju. Vemo, da so v različnih časih možna nihanja v aktivnosti (36). Tudi pri študiji polimorfizma *SOD2* pri pacientih z rakom na mehurju ni bilo povezave med *SOD2* polimorfizmom Ala16Val in incidenco raka (29). Tukaj je bil vzorec preiskovancev premajhen (N bolnih = 51, N zdravih = 53), da bi lahko dokončno ovrgli možnost vpliva polimorfizma na pojavnost raka (29). Opravljena je bila tudi študija vpliva polimorfizma Ala16Val na incidenco raka prostate (31). Pričakovali bi, da bo Ala varianta *SOD2* pri Kavkazijcih bolj aktivna in s tem bolje zavirala prostatno kancerogenezo. Paradokсно pa je študija pokazala, da je bila Ala varianta povezana z nekaj večjim tveganjem za raka prostate, še posebej pri pacientih z nižjo vsebnostjo vitamina E. Pri preiskovancih z Ala varianto *SOD2* so v rakavih celicah odkrili povišano količino H_2O_2 , kar so povezali s povečanim izražanjem SOD2 in posledično povečano tvorbo H_2O_2 . Iz tega vidika bi lahko Ala varianta SOD2 tudi povečala tveganje za pojav različnih bolezni (31).

2. NAMEN DELA

Eden izmed pomembnih faktorjev za zmanjšanje mineralne kostne gostote in nastanek osteoporoze je verjetno tudi oksidativni stres, saj prosti radikali povečujejo aktivnost osteoklastov in zmanjšujejo razvoj osteoblastov. V uvodu smo pokazali, da je za obrambo proti oksidativnemu stresu zelo pomemben antioksidantni encim superoksidna dismutaza 2 (SOD2). Na aktivnost SOD2 lahko vpliva tudi zamenjava G nukleotida z A nukleotidom, ki povzroči zamenjavo aminokislina alanin v valin (polimorfizem Ala16Val). Dokazali so, da ta sprememba zmanjša encimsko aktivnost. Namen naše raziskave je ugotoviti, ali je ta polimorfizem povezan z mineralno kostno gostoto oziroma s koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije. Zato bomo v raziskavo vključili 619 preiskovancev, 523 žensk in 96 moških. Pri preiskovancih je bila predhodno z metodo DEXA izmerjena mineralna kostna gostota v predelu kolka, ledvenih vretenc in vratu stegenice. Preiskovancem je bila izmerjena še serumska koncentracija biokemijskih kazalcev kostne remodelacije.

Raziskava bo obsegala:

- optimizacijo verižne reakcije s polimerazo v realnem času za genotipizacijo naših vzorcev DNA
- genotipizacijo 619 vzorcev DNA z metodo alelne diskriminacije v realnem času
- oceno vpliva polimorfizma Ala16Val na mineralno kostno gostoto in koncentracijo biokemičnih kazalcev kostne remodelacije s statističnimi testi

3. METODE IN MATERIALI

3.1 OPIS PREISKOVANCEV

V našo študijo smo vključili 619 preiskovancev, med katerimi je bilo 523 žensk in 96 moških. Preiskovanci so bili izbrani v Sloveniji in sicer na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, v Ambulanti za osteoporozo Zdravilišča Dolenjske toplice in v Splošni bolnišnici Celje. V vseh ustanovah so preiskovancem izmerili mineralno kostno gostoto (BMD) v predelu vratu stegenice (del kolka), celotnega kolka in ledvenih vretenc. BMD so merili z metodo DEXA. Pred preiskavo preiskovanci niso jemali zdravil za zdravljenje osteoporoze, prav tako so jim z rutinskimi biokemijskimi testi izključili možnost za sistemske in metabolne kostne bolezni.

Vsi preiskovanci so dali soglasje za vključitev njihovih vzorcev v študijo. Le- ta je bila odobrena tudi s strani etične komisije.

Preiskovance smo razdelili na različne skupine:

- vsi preiskovanci (619)
- ženske preiskovanke (523)
- moški preiskovanci (96)
- pomenopavzne ženske (480); če ni bilo podatka o menopavzi, smo v to skupino šteli vse ženske, stare nad 60 let
- premenopavzne ženske (43)
- ženske, mlajše od 50 let (48)
- ženske med 50. in 59. letom starosti (181)
- ženske med 60. in 69. letom starosti (182)
- ženske, starejše od 70 let (112)

Na Kliniki za nuklearno v Kliničnem centru v Ljubljani so preiskovancem predhodno izmerili še koncentracije biokemijskih kazalcev kostne remodelacije. Povprečne vrednosti le- teh, starosti in BMD so prikazane v razpredelnicah 6 in 7.

Serumsko koncentracijo prečno povezanih C- terminalnih telopeptidov kolgena 1 (CTX) so izmerili z encimskoimunsko metodo po navodilih testa Serum CrossLaps (Osteometer Bio Tech). Serumsko koncentracijo alkalne fosfataze (ALP) so določili z rutinsko metodo z uporabo p-nitrofenilafosfata. Serumsko koncentracijo kostno- specifične alkalne fosfataze so izmerili z radioimunološko metodo s pomočjo testa Tandem- R Ostase (Beckman Coulter). Urinsko koncentracijo deoksipiridinolina (DPD) so merili z encimskoimunsko metodo s testom Pyrilinks-D (Metra Biosystems). Koncentracijo plazemskega osteokalcina (pOC) so določili s pomočjo kemiluminiscentno imunometrične metode (test Immulite Osteocalcin, Diagnostic products Corporation). Serumski koncentracija RANKL je bila izmerjena z encimskoimunskim testom sRANKL ELISA (Biochemica GmbH, Dunaj, Avstrija). Koncentracijo celotnega serumskega osteoprotegerina (OPG) pa so izmerili z encimskoimunsko metodo po navodilih testa Human Osteoprotegrin ELISA (Biochemica GmbH, Dunaj, Avstrija).

Spremenljivka	Vsi (N= 619)	Ženske (N= 523)	Moški (N= 196)
Starost (leta)	62,04 ± 9,795	60,86 ± 9,999	67,96 ± 6,009
ITM	27,12 ± 4,461	26,93 ± 4,590	27,84 ± 3,734
Menopavza (leta)	49,61 ± 4,163	49,67 ± 4,172	/
Leta menopavze	11,85 ± 9,595	12,28 ± 9,741	/
BMDfn (g/ cm ³)	0,72 ± 0,136	0,71 ± 0,124	0,81 ± 0,147
BMDtot (g/ cm ³)	0,88 ± 0,160	0,85 ± 0,142	1,02 ± 0,159
BMDls (g/ cm ³)	0,91 ± 0,180	0,87 ± 0,165	1,06 ± 0,174
RANKL (pmol/L)	0,37 ± 0,463	0,39 ± 0,482	0,18 ± 0,113
pOC (µg/L)	18,59 ± 11,452	19,44 ± 11,540	9,54 ± 5,282
sBALP (pmol/L)	11,24 ± 5,057	11,20 ± 5,037	/
sOPG (pmol/L)	4,95 ± 1,666	4,90 ± 1,675	5,44 ± 1,569

Razpredelnica 6: Povprečne vrednosti in standardna deviacija različnih parametrov za moške, ženske in celotno populacijo preiskovancev.

Spremenljivka	Pomenopavzne ženske (N= 480)	Premenopavzne ženske (N= 43)
Starost (leta)	62,34 ± 8,932	44,64 ± 3,890
ITM	27,27 ± 4,603	23,87 ± 3,204
Menopavza (leta)	49,60 ± 4,174	/
Leta menopavze	11,91 ± 9,606	/
BMD _{fn} (g/ cm ³)	0,70 ± 0,125	0,78 ± 0,084
BMD _{tot} (g/ cm ³)	0,84 ± 0,144	0,91 ± 0,094
BMD _{ls} (g/ cm ³)	0,86 ± 0,163	1,00 ± 0,117
RANKL (pmol/L)	0,38 ± 0,488	0,48 ± 0,448
pOC (µg/L)	21, 21 ± 11,658	10,46 ± 4,770
sBALP	12, 11 ± 5,150	8,07 ± 3,237
sOPG	5,19 ± 1,741	3,93 ± 0,854

Razpredelnica 7: Povprečne vrednosti in standardna deviacija različnih parametrov za ženske pred menopavzo in po njej.

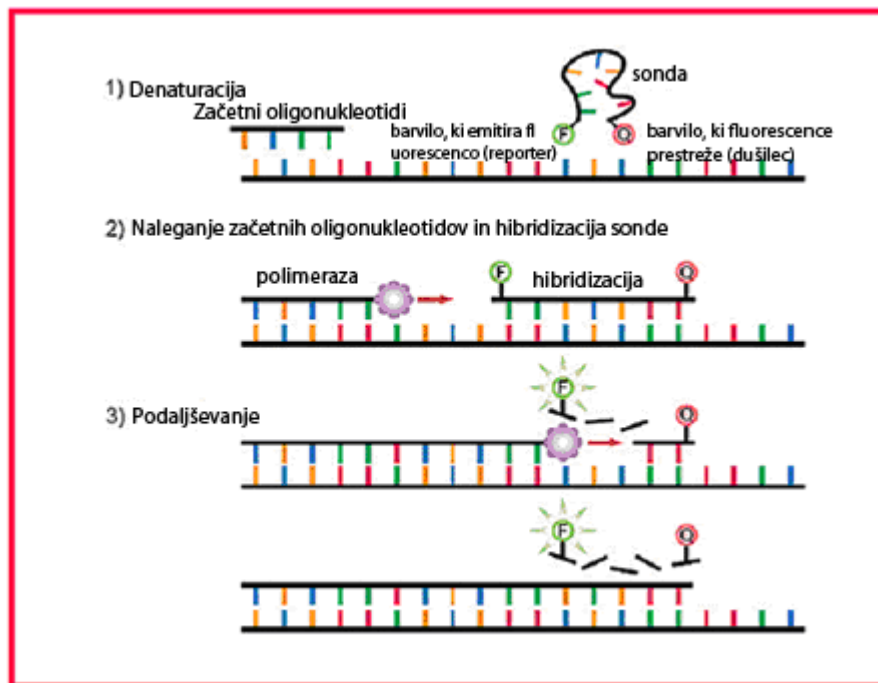
3.2 OPIS VZORCEV DNA

Preiskovancem so odvzeli periferno vensko kri, ki so je shranili pri -20°C. V manj kot v petih dneh je bila iz levkocitov odvzete krvi izolirana genomska DNA. To je bilo storjeno z metodo izsoljevanja po Millerju (37).

3.3 ALELNA DISKRIMINACIJA V REALNEM ČASU

Alelna diskriminacija je hitra, avtomatizirana in občutljiva metoda za določevanje znanih polimorfizmov. Vključuje verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (*angl.*: Real Time PCR) in detekcijo specifičnih nukleotidov. S pomočjo verižne reakcije v realnem času pomnožimo želen odsek DNA, ki ga želimo genotipizirati. Za genotipizacijo vzorca sta potrebni dve specifični sondi, ki prepoznata določeno nukleotidno zaporedje, za vsak alel posebej in se nanju vežeta, vsaka na svoje zaporedje. Vsaka od obeh sond je označena z dvema barviloma. Na 5' koncu je vezano barvilo, ki emitira fluorescenco (reporter -R), na 3' koncu pa je vezano barvilo, ki le-to barvilo prepreči (dušilec, *angl.*: quencher- Q). Med podvojevanjem tarčnega dela DNA- polimeraza zaradi svoje eksonukleazne aktivnosti razgradi sondo in pri tem se barvili ločita. Ker se razdalja med njima

poveča, dušilec ne prestreže več fluorescence reporterskega barvila, kar ima za posledico porast fluorescence, ki jo detektiramo (Slika 8).



Slika 8: Prikaz poteka alelna diskriminacije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času (38).

Uporabljata se dve TaqMan® sonde, vsaka za svoj alel. To pomeni, da je zaporedje ene sonde komplementarno zaporedju za alel 1 in zaporedje druge sonde komplementarno zaporedju za alel 2. Na sondo za detekcijo alela 1 se na 5'konec kovalentno veže barvilo FAM®. Na sondo za detekcijo alela 2 pa se na 5' konec kovalentno veže barvilo VIC/ Hex/ Yelloow 555. Ti barvili sta reporterski in ob razpadu sonde se poveča njuna fluorescenca, katere valovna dolžina je za vsako barvilo drugačna. Z detekcijo valovne dolžine svetlobe ločimo med dvema aleloma. V našem primeru je valovna dolžina emitirane svetlobe barvila FAM 465-510nm in označuje G alel. Valovna dolžina emitirane svetlobe barvila VIC/ Hex/ Yelllow 555 je 535-580nm in označuje A alel. Real Time PCR naprava (Light Cycler® 480 II) izmeri valovno dolžino in določi barvo za vsak vzorec posebej. Iz jakosti fluorescence smo razbrali, ali se je pomnožilo dovolj produkta, z barvo pa genotipizirali vzorec. (Razpredelnica 11).

Genotip	Barva	Valovna dolžina svetlobe (nm)
A/A	zelena (VIC®)	535-580
G/G	modra (FAM®)	465-510
A/G	rdeča	465-510 in 535-580
Neopredljen	roza	
Premalo produkta	siva	

Razpredelnica 8: Genotipizacija vzorcev z merjenjem valovne dolžine emitirane svetlobe reporterskih barvil.

3.3.1 POMNOŽEVANJE ODSEKA DNA

Pogoj za uspešno alelnu diskriminacijo je uspešno pomnoževanje specifičnega DNA zaporedja, drugače ne pride do razpada sonde in posledičnega emitiranja reporterske fluorescence. DNA zaporedja pomnožujemo z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

3.3.1.1. PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI

Reakcijska zmes za PCR reakcijo je močno občutljiva na kontaminacijo z DNA iz okolja, ki je nočemo pomnožiti. Zato je pomembno, da reakcijo izvajamo v laboratoriju, namenjenem za PCR reakcije. Vedno smo uporabljali čisto delovno haljo in rokavice brez smukca. Te smo po potrebi tudi večkrat med pipetiranjem zamenjali, da ne bi okužili reakcijske zmesi. Reakcijska zmes se pripravlja v za to namenjeni delovni komori. Pipete, ki se uporabljajo za delo v komori, se ne jemljejo ven iz komore, ker so bile predhodno avtoklavirane. Nastavke za pipete in plastične epruvete s pokrovčkom smo pred uporabo prav tako avtoklavirali. Delovno površino komore smo pred začetkom dela očistili z 10% etanolom, delovne pripomočke pa s 3% hipokloritom. S hipokloritom smo vedno očistili vse, kar smo od zunaj prinašali v komoro. Vse pripomočke, potrebne za delo, smo pred začetkom dela postavili v komoro in izpostavili UV svetlobi za 30 minut. Kot reagente za reakcijo smo uporabljali destilirano vodo, TagMan® Genotyping MasterMix in sonde. Sondo in vodo smo vedno shranjevali v zmrzovalniku pri -20 °C, MasterMix pa v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Vodo smo vedno pred delom odmrznili, sondo pa smo iz zmrzovalnika prestavili v hladilnik in ovili s folijo, ker je bila občutljiva na svetlobo. Pri sobni temperaturi se namreč aktivnost sonde zmanjša. Delovne raztopine DNA smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Reagente, razen delovne raztopine DNA, smo naročili pri proizvajalcu AB Applied Biosystem. Sestava TaqMan® Genotyping MasterMix:

- pufer, z optimizirano sestavo;
- deoksiribonukleotidi trifosfati (dNTPji);
- Amplitaq Gold® DNA polimeraza, ultračista;
- ROX pasivna referenca, ki služi kot interna referenca za normalizacijo reporterskega signala med analizo.

Podatki za sondo (39):

- 40x SNP Genotyping Assay, sonda za polimorfizem rs4880
- Okvir sekvence za VIC/FAM:

CTGCCTGGAGCCCAGATACCCAAA[A/G]CCGGAGCCAGCTGCCTGCTGGTGCT

3.3.1.2 PRIPRAVA VZORCEV - ROČNO

Vzorci smo pipetirali v ploščico s kapaciteto 96 vzorcev. Za večjo natančnost smo si vedno pred pripravo vzorcev narisali tabelo s 96 polji in v njih vpisali številke vzorcev. Po tem vrstnem redu smo potem nanašali vzorce. Reakcijsko zmes smo pripravili po predpisu (Razpredelnica 8), vendar brez DNA. Pripravili smo jo v 96kratni količini. Vedno smo k tej količino prišteli še 5 odstotni prebitek zaradi izgub pri delu. V vsako polje v ploščici smo odpipetirali 5,25 µl zmesi. V vsako polje razen v zadnje smo nato dodali 4,75 µl delovne raztopine vzorčne DNA. V zadnje polje smo dodali 4,75 µl destilirane vode in nam je služilo kot slepi vzorec za preverjanje nečistoč. Vsa polja smo po pipetiranju neprodušno zaprli s posebno folijo za ploščice s 96 polji.

Reagent	Volumen (µl)
TaqMan® MasterMix	5
40x sonda	0,25
DNA	4,75
Končni volumen zmesi	10

Razpredelnica 9: Sestava reakcijske zmesi pri ročnem pipetiranju.

3.3.1.3 PRIPRAVA VZORCEV S PIPETORJEM Freedom evo TECAN

Zaradi večje natančnosti smo pred pričetkom dela narisali tabelo za vzorce, tokrat s 384 polji. V njih smo vpisali vzorce v takem zaporedju, kot so bili nanešeni v ploščicah s 96 vzorci. Te ploščice smo dali v pipetor in potem je le- ta v zaporedju pipetiral vzorce v ploščico s 384 polji. Pipetor smo uporabili, ker smo želeli bolj avtomatizirat delo in s tem zmanjšat napake zaradi človeškega faktorja. Zato smo pripravili manjši volumen reakcijske zmesi (Razpredelnica 9). V komori smo pripravili le reakcijsko zmes brez DNA v 1,5 mililitrsko plastično epruveto s pokrovčkom. Odprto smo jo nato dali v pipetor. Pred pričetkom smo nastavili še program za pipetiranje določenega volumna reakcijske zmesi. Po zaključenem pipetiranju smo ploščico neprodušno zaprli s posebno folijo za ploščice s 384 polji.

Reagent	Volumen (µl)
TagMan® MasterMix	3
40x sonda	0,15
DNA	2,85
Končni volumen zmesi	6

Razpredelnica 10: Sestava zmesi za pipetiranje z napravo

3.3.1.4 POTEK REAKCIJE

Zaprto ploščico z vzorci smo postavili v posebno centrifugo za ploščice ter dobro centrifugirali, da je bila vsa zmes homogena, brez mehurčkov in na dnu. To je omogočalo optimalen potek reakcije. Ploščico smo nato prestavili v napravo za Real- Time PCR. Pri tem smo zelo pazili, da se nismo s prsti dotaknili folije na ploščici. Prav tako smo pazili, da smo ploščico pravilno obrnili. Za pomnoževanje vzorčne DNA smo uporabili temperaturni program, predpisan s strani proizvajalca reagentov. (Razpredelnica 10).

ZAČETNI KORAK		DENATURACIJA		PRILEGANJE IN PODALJŠEVANJE	
ČAS (min)	TEMPERATURA (°C)	ČAS (s)	TEMPERATURA (°C)	ČAS (min)	TEMPERATURA (°C)
10	95	15	92	1	60
ŠTEVILO CIKLOV		40X			

Razpredelnica 11: Shema temperaturnega programa reakcije Real- Time PCR.

3.3.2 REAGENTI IN OPREMA

REAGENTI:

- avtoklavirana ultračista voda (aparatus Elga, Purelab Classic)
- TagMan® Genotyping MasterMix (proizvajalec AB Applied Biosystems); sestava: pufer, z optimizirano sestavo; deoksiribonukleotidi trifosfati (dNTPji); Amplitaq Gold® DNA polimeraza, ultračista; ROX pasivna referenca
- Sonda; 40x SNP Genotyping Assay

APARATURE IN PRIBOR:

- avtoklav A- 21 (Kambič, laboratorijska oprema)
- delovna komora za PCR (Biosan DNA/RNA UV- Cleaner WC/T- M- AR)
- polavtomatske pipete (Eppendorf Research; 2,5 µl; 20 µl; 200 µl)
- centrifuga Mikro- 242 (Tehtnica, Železniki)
- centrifuga 322A Tehtnica (Tehtnica, Železniki)
- ploščice za 96 vzorcev, MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (AB Applied Biosystems)
- Real- Time PCR naprava LightCycler® 480 II
- naprava za pipetiranje freedom evo TECAN
- ploščice za 384 vzorcev, MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate (AB Applied Biosystems)
- škatlice z avtoklaviranimi nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- sterilni nastavki za pipette s filtrom e.p.T.I.P.S. (Eppendorf, Nemčija)

- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom; 0,5 mL in 1,5 mL (Eppendorf, Nemčija)
- rokavice Kimberly- Clark, velikost S

3.3 STATISTIČNE METODE

Najprej smo dobljene genotipe razvrstili na mutirane homozigote, nemutirane homozigote in heterozigote. Iz teh podatkov smo nato izračunali Hardy- Weinbergovo ravnotežje. Za izračun statističnih parametrov smo uporabili program SPSS 17.0 for Windows, proizvajalca SPSS Inc., ZDA. Najprej smo s Kolmogorov- Smirnovim testom preverili, če se spremenljivke porazdeljujejo normalno ali nenormalno. Glede na normalnost porazdelitve smo se odločali za različne teste za testiranje povezanosti med posameznimi našimi genotipi in neodvisnimi spremenljivkami (Razpredelnica 12):

STATISTIČNI TEST	VRSTA PORAZDELITVE	VSEBINA STATISTIČNEGA TESTA
One- Way ANOVA (analiza variance)	normalna	ugotavljanje razlik v povprečni vrednosti spremenljivke (npr. BMD) med vsaj tremi skupinami (v našem primeru trije genotipi)
Fisherjev LSD (Least significant difference) Post Hoc	normalna	ugotavljanje razlik v povprečni vrednosti spremenljivke (npr. BMD) med dvema skupinama (med dvema genotipoma)
ANCOVA (analiza kovariance)	normalna	ugotavljanje, ali ima nek faktor vpliva na povprečno vrednost spremenljivke (npr. ali ITM vpliva na vrednosti BMD)
Kruskal- Wallis	nenormalna	identičen testu One- Way ANOVA pri nenormalni porazdelitvi spremenljivk

Razpredelnica 8: Pregled statističnih testov, uporabljenih v diplomski nalogi.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA POGOJEV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Tako kot pri konvencionalni metodi PCR tudi pri PCR v realnem času proizvajalci reagentov in inštrumentov za PCR predpišejo postopke za izvajanje reakcije. Ti po izkušnjah proizvajalcev dajejo najboljše rezultate. Vendar že prvi poskusi v laboratoriju pokažejo, da temu ni ravno tako. Zato moramo omenjene postopke prilagoditi našim pogojem v laboratoriju.

Ker so reagenti za Real- Time PCR zelo dragi, smo želeli čimprej preizkusiti pipetor. Protokol dela s pipetorjem predvideva volumen vzorca 6 μ l, kar je za 4 μ l na vzorec manj kot pri ročnem pipetiranju. Izvedli smo poskusno avtomatizirano pipetiranje 34-ih vzorcev. Dobili smo zelo malo dobrih rezultatov, izkoristek je bil le 44 odstoten. Predvidevali smo, da je zaradi majhnega volumna vzorca v njem neustrezna količina DNA, da bi se primerno pomnožila.

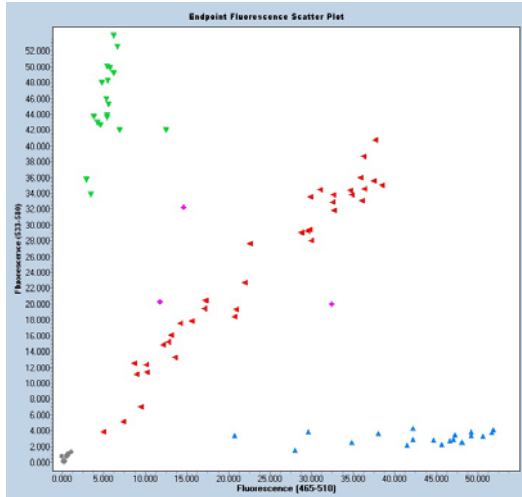
Zato smo se odločili za nadaljevanje naše raziskave z ročnim pipetiranjem in genotipiziranjem 96-ih vzorcev. Zaradi nekajkratnih slabih izkoristkov pri rezultatih smo bili primorani volumen vzorca pri ročnem pipetiranju iz 10 μ l zmanjšati na 8 μ l. Skrb, da se zaradi tega vzorci ne bi ustrezno pomnoževali, je bila odveč. Smo pa za ustrezno pomnoževanje odsekov DNA morali povečati število ciklov iz 40 na 50 (Razpredelnica 13). Na ta način se je DNA vzorcev uspešno pomnožila, pri slepem vzorcu pa ni bilo produkta, ki bi sicer lahko nastal zaradi nečistoč.

ZAČETNI KORAK		DENATURACIJA		PRILEGANJE IN PODALJŠEVANJE	
ČAS (min)	TEMPERATURA (°C)	ČAS (s)	TEMPERATURA (°C)	ČAS (min)	TEMPERATURA (°C)
10	95	15	92	1	60
ŠTEVILO CIKLOV		50x			

Razpredelnica 9: Shema poteka reakcije po optimizaciji protokola reakcije.

4.2 PRIKAZ ANALIZE REZULTATOV ALELNE DISKRIMINACIJE

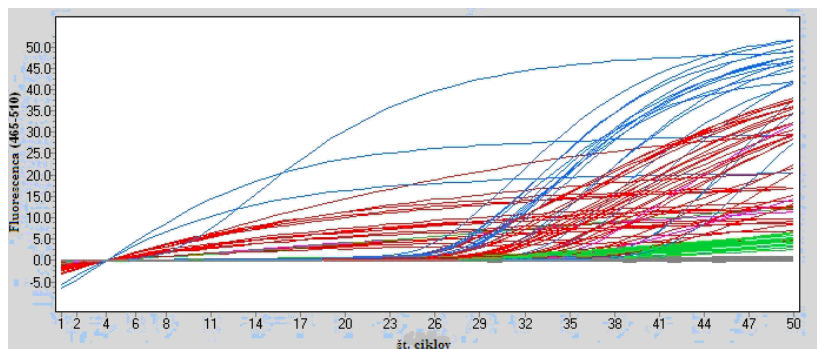
Najprej smo analizirali vse genotipe skupaj (Slika 9). Najboljši rezultati so bili s fluorescenco nad 25.000. To pomeni, da se je pomnožilo dovolj želenega DNA odseka in smo lahko z večjo gotovostjo določili genotip.



Slika 9: Razporeditev genotipov po klastrih.

Slika 9 prikazuje razporeditev vzorcev glede na genotip in glede na jakost fluorescence. Na osi Y je prikazana fluorescenca barvila VIC/ Hex/ Yellow, zato so tam razporejeni vzorci z genotipom A/A. Na osi X je prikazana fluorescenca barvila FAM®, zato so tam porazdeljeni vzorci z genotipom G/G. Vmes pa so razporejeni vzorci z genotipom A/G. Táko razporeditev imenujemo klastri. Zeleni klastri predstavljajo A/A genotip, modri klastri predstavaljajo G/G genotip, rdeči predstavljajo A/G genotip, roza klastri predstavljajo neopredeljen genotip in sivi klastri imajo premalo pomnoženega DNA odseka.

Nato smo pogledali vse krivulje pomnoževanja produktov (Slika 10).

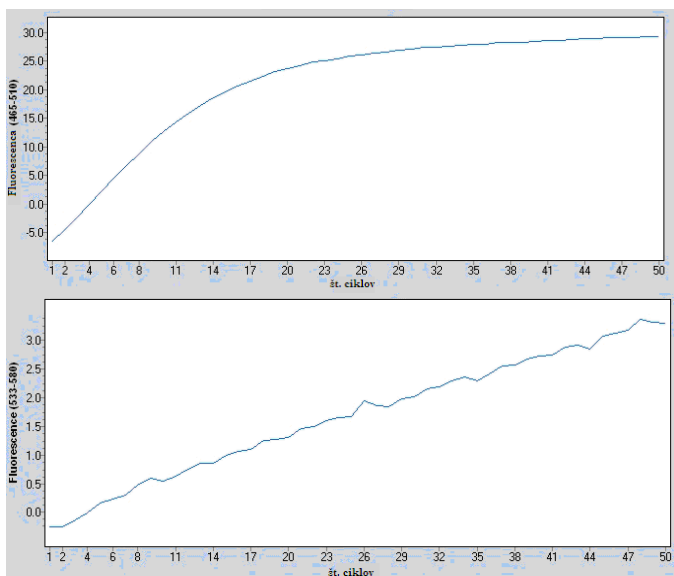


Slika 10: Prikaz pomnoževanja produktov za vse vzorce skupaj.

Iz slike 10 je razvidno, v katerem ciklu so se produkti pričeli pomnoževati in kakšno jakost fluorescence so dosegli, torej koliko produkta je nastalo tekom reakcije.

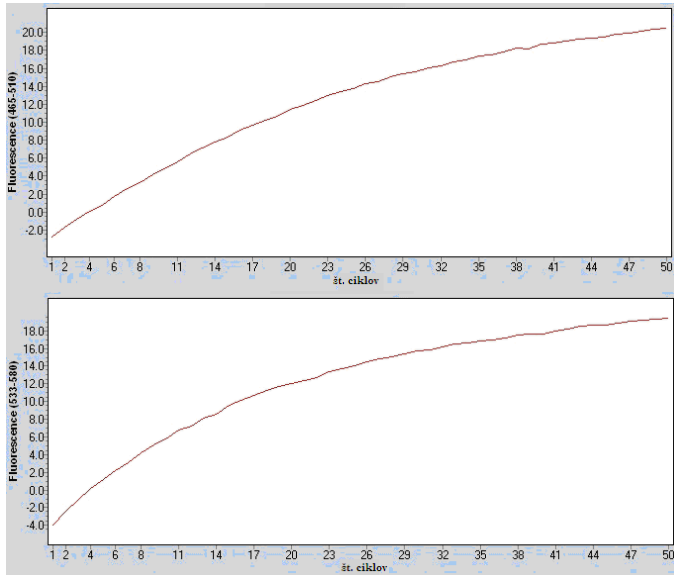
Načeloma bi že iz teh podatkov lahko našim produktom določili genotip, vendar smo na koncu analize rezultatov za vsak vzorec pogledali posebej krivuljo pomnoževanja in tako natančneje določili genotip (Slika 11, 12, 13).

Na sliki 11 prva krivulja prikazuje naraščanje fluorescence barvila FAM® in kaže na prisotnost alela G. Druga krivulja prikazuje naraščanje barvila VIC®. Naraščanje druge krivulje je majhno, kar kaže na odsotnost alela A. iz tega lahko sklepamo, da gre za genotip G/G.



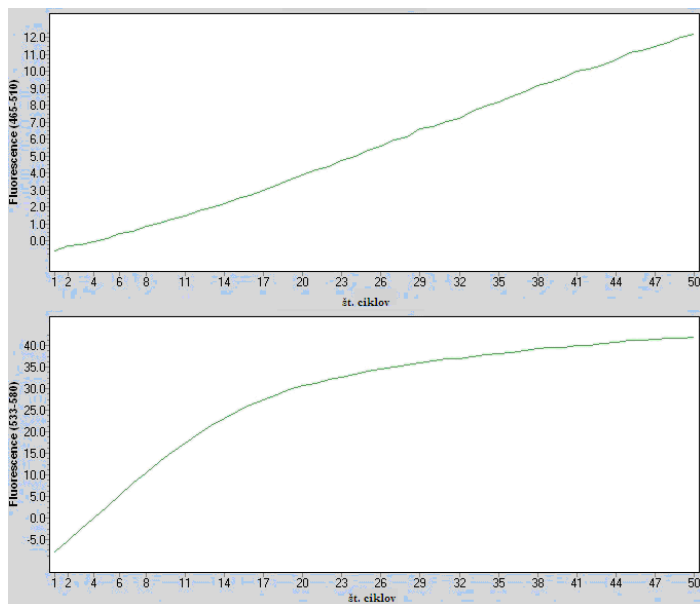
Slika 11: Primer krivulj za genotip G/G.

Na sliki 12 prva krivulja prikazuje naraščanje fluorescence barvila FAM® in kaže na prisotnost alela G. Druga krivulja prikazuje naraščanje barvila VIC® in kaže na prisotnost alela A. Naraščanje obeh krivulj je približno enako, iz česar lahko sklepamo, da gre za genotip A/G.



Slika 12 : Primer krivulj za genotip A/G.

Na sliki 13 druga krivulja prikazuje naraščanje fluorescence barvila VIC® in kaže na prisotnost alela A. Prva krivulja prikazuje naraščanje barvila FAM®. To naraščanje je majhno in kaže na odsotnost alela G. Iz tega lahko sklepamo, da gre za genotip A/A.



Slika 13: Primer krivulj za genotip A/A.

4.2 UGOTAVLJANJE KLINIČNEGA POMENA Ala 16 Val V GENU SOD2

Raziskave zadnjih let kažejo, da na razvoj osteoporoze vpliva stanje oksidativnega stresa. Vsi mehanizmi za ta pojav še niso čisto znani. Eden glavnih antioksidativnih encimov, ki služi kot obramba pred ROS, je mitohondrijska superoksidna dismutaza SOD2. Za zmanjšanje njene aktivnosti je lahko odgovoren polimorfizem Ala16Val, in sicer alel A. Nekatere študije so že nakazale njegovo povezanost z razvojem bolezni, na katere prav tako kot na osteoporozo vpliva stanje oksidativnega stresa. Z diplomskim delom smo želeli ugotoviti, ali obstaja povezava med polimorfizmom A16V v genu za SOD2 in mineralno kostno gostoto ter koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije.

Z alelno diskriminacijo v realnem času smo zelenim odsekom vzorčnih DNA določili genotip. To smo naredili na 619 vzorcih. Vsem preiskovancem, katerih vzorčne DNA smo genotipizirali, je bila predhodno izmerjena mineralna kostna gostota vratu stegenice, ledvenega vretenca in celokupna BMD. Pri večini od preiskovancev je bila določena še starost, ITM, t-vrednost ter pri ženskah starost, ko se je začela menopavza in leta njenega trajanja. Pri nekaj manj preiskovancih je bila določena še koncentracija biokemijskih kazalcev kostne remodelacije: RANKL, CTX, PTH, ALP, sBALP, DPD, sOPG in pOC.

Vse dobljene vrednosti smo analizirali s statističnim programom SPSS 17.0. Preiskovance smo najprej obravnavali kot celoto (619), nato smo jih razdelili po skupinah: ženske (523) in moške (96). Ženske preiskovanke smo nato razdelili še na več skupin po dveh kriterijih, menopavzi in starosti. Glede na menopavzo smo jih razdelili na pomenopavzne (43) in premenopavzne (480). Glede na starost smo jih razdelili na: ženske, mlajše od 50 let (48), ženske med 50. in 59. letom (181), ženske med 60. in 69. letom (182), ter ženske, starejše od 70 let (112).

Najprej smo s pomočjo Kolmogorov- Smirnov testa ugotovili, ali se določena spremenljivka v populaciji porazdeljuje normalno ali nenormalno. Test predpostavlja, da se vse spremenljivke porazdeljujejo normalno ($p > 0,05$). Pri rezultatih s $p < 0,05$ smo vse vrednosti spremenljivke še logaritmirali po naravnem logaritmu. Če je bil še vedno $p < 0,05$, smo ničelno hipotezo ovrgli, take spremenljivke se torej porazdeljujejo nenormalno. Vrednosti spremenljivk oziroma njihovi naravni logaritmi so se večinoma porazdeljevali normalno, razen vrednosti RANKL so se večinoma porazdeljevale nenormalno. Porazdelitev za vsako spremenljivko posebej je prikazana v razpredelnicah v Prilogi 2 (Razpredelnici 13 in 14).

Od vrste porazdelitve je odvisna nadaljna izbira statističnih testov. Če so se spremenljivke porazdeljevale normalno, smo uporabili parametrične teste, v našem primeru so to ANOVA, Fisherjev LSD Post Hoc test in ANCOVA. Pri ANOVA testu smo postavili ničelno hipotezo, da so povprečne vrednosti neke spremenljivke, npr. BMD, statistično signifikantno različne med posameznimi genotipi. Pri tem je bil $p < 0,05$. Zaključili smo lahko, da je genotip povezan z vrednostmi te spremenljivke oziroma vpliva na njene vrednosti. V nadaljevanju nas je seveda zanimalo, ali so bile vrednosti spremenljivk pri mutiranem homozigotu (genotip A/A) višje ali nižje kot pri ostalih dveh genotipih.

Če pri ANOVA testu nismo mogli sprejeti ničelne hipoteze ($p > 0,05$), smo uporabili LSD Post Hoc test. Ta test ugotavlja povezanost genotipa s spremenljivkami na enak način kot ANOVA, vendar ne primerja razlik v povprečni vrednosti spremenljivke med vsemi tremi tipi genotipov, temveč primerja samo dva. Če pri nobenem od teh dveh testov nismo mogli potrditi ničelne hipoteze, smo sklepali, da spremenljivka in genotip nista povezana. Test ANCOVA je identičen ANOVA testu, le da upošteva še izbrano kovarianco. Mi smo izbrali 2 parametra, za katera že iz prejšnjih študij vemo, da imata signifikantni vpliv na BMD, to sta starost in indeks telesne teže (ITM). Če smo pri

ANCOVI lahko potrdili ničelno hipotezo povezanosti teh dveh parametrov z npr. vrednostjo BMD in tipom genotipa, pomeni, da smo lahko izključili vpliv npr. starosti na vrednost spremenljivke (npr. BMD). Taka ugotovitev poveča statistično moč testa, saj na vrednost spremenljivke v našem primeru vpliva izključno genotip.

Če so se vrednosti spremenljivke porazdeljevale nenormalno, smo uporabili neparametrični test, Kruskal- Wallis test, ki je identičen testu ANOVA.

4.2.1 GENOTIPSKA FREKVENCA POLIMORFIZMA V SLOVENSKI POPULACIJI

Najprej smo določili frekvenco genotipov v naši preiskovalni skupini. Ta je bila za A/A genotip 24,05%, za G/G genotip 28,48% ter za A/G genotip 47,47%.

Nato smo želeli preveriti, ali se genotipi v naši populaciji preiskovancev porazdeljujejo v skladu s Hardy- Weinbergovim ravnotežjem. Zakon pravi, da se v velikih populacijah pri naključnem razmnoževanju osebkov enakih sposobnosti razmerja genov ohranjajo (40). To pomeni, da frekvence tako alelov kot genotipov v populaciji ostajajo konstantne, v ravnotežju (41). Izračuna se po formuli: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (42). P genotipov v naši populaciji je bil 0,383. Idealno bi bilo, da bi bila vrednost p blizu 1, vendar tudi $p = 0,383$ pomeni, da se genotipi porazdeljujejo v skladu s Hardy- Weinbergovim ravnotežjem. Razpredelnici 10 in 11 prikazujeta frekvenco genotipov v različnih preiskovalnih skupinah naše raziskave in različnih narodih in rasah sveta.

Preiskovalne skupine	Frekvenca genotipa A/A	Frekvenca genotipa A/G	Frekvenca genotipa G/G
MOŠKI	15,63 %	53,13%	29,17 %
ŽENSKE	25,62%	46,08%	28,30%
ZDRAVE ŽENSKE	32,34%	36,84%	30,82%
ŽENSKE Z OSTEOPOROZO	21,81%	52,26%	25,93%

Razpredelnica 10: Frekvenca genotipov v različnih preiskovalnih skupinah v naši raziskavi.

Preiskovalne skupine	Frekvenca genotipa A/A	Frekvenca genotipa A/G	Frekvenca genotipa G/G
SLOVENC	24,05 %	47,47%	28,48 %
EVROPEJCI	35,20%	50,00%	14,80%
AFRO- AMERIČANI	25,00%	50,00%	25,00%
AZIJC	81,00%	16,17%	2,30%
PODSAHAHARSKI AFRIČANI	42,10%	43,90%	14,00%

Razpredelnica 11: Frekvenca genotipov v različnih svetovnih narodih in rasah (35).

4.2.2 VPLIV POLIMORFIZMA A16V NA MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN KONCENTRACIJO BIOKEMIJSKIH KAZALCEV KOSTNE REMODELACIJE

Genetska zasnova vpliva na fiziološke značilnosti kostnine. Vpliva na vrednost najvišje kostne gostote (PBM), na starost posameznika, pri kateri se začne kostna gostota manjšati in na hitrost tega procesa. Na vse te parametre pa vplivajo tudi številni dejavniki iz življenjskega okolja, ki lahko zakrijejo genetski vpliv.

4.2.2.1 OCENA KLINIČNEGA VPLIVA Ala16Val V CELOTNI POPULACIJI PREISKOVANCEV (N= 619)

Najprej smo vpliv polimorfizma želeli preučiti na celotni populaciji preiskovancev. Z metodo alelne diskriminacije smo vsem vzorcem določili genotip polimorfizma Ala16Val. Preiskovance smo razdelili glede na genotipe v tri različne skupine: normalne homozigote (G/G), mutirane homozigote (A/A) in heterozigote (A/G).

Želeli smo preveriti, kako se vrednosti spremenljivk porazdeljujejo med različnimi genotipskimi podskupinami. S statističnimi testi ANOVA, LSD Post Hoc test, ANCOVA in Kruskal- Wallis testom smo želeli preveriti, ali so povprečne vrednosti spremenljivk značilno različne med posameznimi genotipskimi podskupinami. Naše spremenljivke so bile: BMD v različnih predelih kosti in biokemijski kazalci kostne remodelacije.

Zmanjšanje BMD je najboljši pokazatelj osteoporoze. V naši raziskavi smo želeli najprej preveriti, ali obstajajo značilne razlike v povprečnih vrednostih BMD med različnimi genotipi v celotni

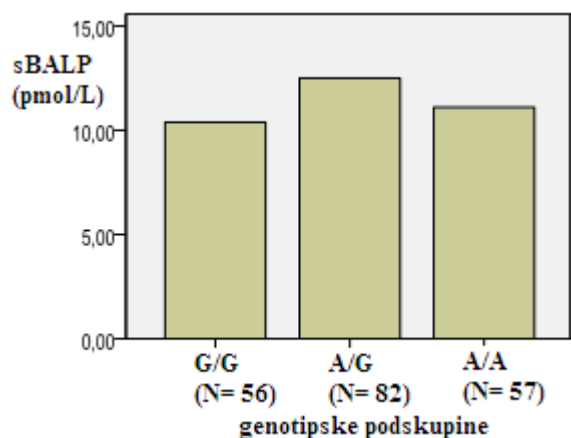
populaciji. Statistični testi teh razlik niso pokazali, torej lahko zaključimo, da v celotni preiskovalni skupini genotip ni povezan z vrednostmi BMD oziroma nanje nima vpliva.

Koncentracija kazalcev kostne remodelacije kaže na stanje trenutne kostne remodelacije v kostnini. Merjenje koncentracije nam lahko služi kot dopolnilo k boljši diagnostiki ali za spremljanje zdravljenja in odziva kostnine nanj. Pri osteoporozi pride do povečane stopnje kostne remodelacije, torej se v krvi ali urinu poveča koncentracija biokemijskih kostnih kazalcev. Mi smo s statističnimi testi ANOVA, LSD Post Hoc, Kruskal- Wallis ter ANCOVA želeli preveriti, ali obstajajo značilne razlike v povprečnih vrednostih koncentracij kostnih kazalcev med posameznimi genotipskimi podskupinami.

Ugotovili smo, da so povprečne vrednosti koncentracij kostno- specifične alkalne fosfataze (sBALP; $p= 0,045$), deoksipiridinolina (DPD; $p= 0,007$) ter plazemskega osteokalcina (pOC; $p= 0,037$) statistično različne med posameznimi genotipskimi podskupinami. Iz rezultatov statističnih testov lahko zaključimo, da je polimorfizem Ala16Val povezan z vrednostmi koncentracij sBALP, pOC in DPD oziroma, da nanje vpliva. sBALP je kostno specifična alkalna fosfataza in je kazalec kostne tvorbe. pOC pomeni plazemsko koncentracijo osteokalcina, ki je tudi kazalec kostne tvorbe. Deoksipiridinolin (DPD) pa je kazalec kostne resorpcije, saj se sprošča iz kosti ob razgradnji kolagena. Osebe z genotipom A/A (mutiran homozigot) so imele v povprečju značilno višje vrednosti sBALP in pOC v primerjavi z osebami z genotipom G/G (graf 1 in 3). To kaže, da imajo te osebe višjo kostno tvorbo. Osebe z genotipom A/A so imele tudi višje vrednosti DPD v primerjavi z osebami z genotipom G/G (graf 2). To kaže, da imajo te osebe tudi višjo kostno razgradnjo. Povišana kostna tvorba in razgradnja sta značilni za povišano kostno remodelacijo, ki je značilna za osteoporozo. Pri osteoporozi pa je kostna tvorba v primerjavi z razgradnjo vseeno manjša, zato pride do ožanja trabekularnih kosti. Zaključimo torej lahko, da bi osebe z genotipom A/A lahko uvrstili med osebe s povečanim tveganjem za razvoj osteoporoze.

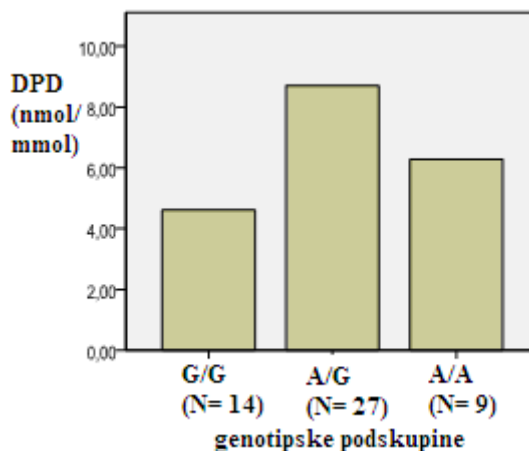
Pri vrednostih koncentracij pOC smo s statističnim testom ANCOVA uspeli izključiti vpliv starosti in indeksa telesne teže na vrednosti teh dveh spremenljivk ($p= 0,016$). S tem smo statistično še povečali vpliv genotipa na to spremenljivko.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracij kostno- specifične alkalne fosfataze med posameznimi genotipskimi podskupinami.



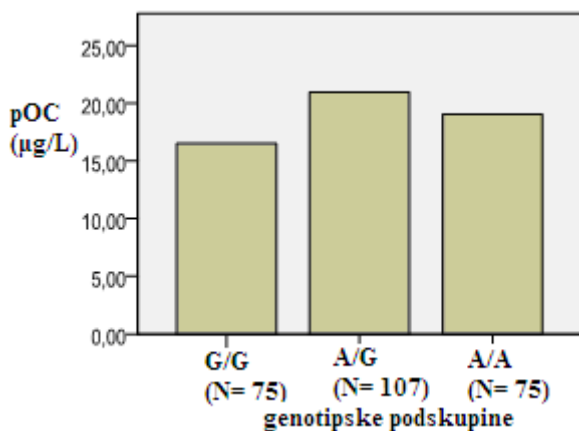
Graf 1: Povprečne vrednosti koncentracij sBALP v različnih genotipskih podskupinah ($p=0,045$; ANOVA)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti deoksipiridinolina med posameznimi genotipskimi podskupinami.



Graf 2: Povprečne vrednosti koncentracij DPD v različnih genotipskih podskupinah ($p=0,007$; ANOVA)

C) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracije pOC med posameznimi genotipskimi podskupinami.



Graf 3: Povprečne vrednosti koncentracij osteokalcina v plazmi v različnih genotipskih podskupinah ($p=0,037$; ANOVA)

Poleg povezanosti spremenljivk z genotipom nas je zanimal še način dedovanja naših spremenljivk, npr. vrednosti BMD. Način dedovanja nas je zanimal zato, da bi ugotovili, kateri alel bolj prispeva k izražanju določene spremenljivke. Na ta način lažje razložimo, kako naj bi se spremenljivka izražala pri heterozigotnih osebah, ki imajo oba alela. Poleg te ugotovitve pa s testiranjem modela dedovanja

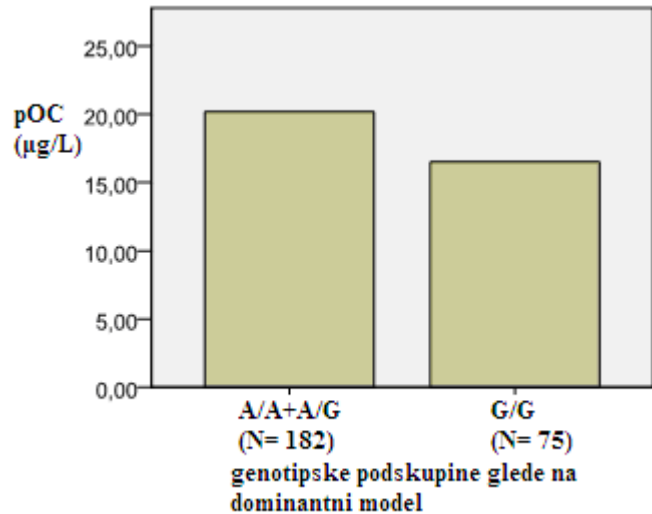
povečamo statistično moč testa vpliva genotipa, saj združimo dve genotipski podskupini in s tem povečamo vzorec testiranja.

Najprej smo preiskovance razdelili na dve skupini, in sicer na osebe, pri katerih je prisoten alel A (osebe z genotipom A/A + A/G) ter osebe, pri katerih ni prisotnega alela A (osebe z genotipom G/G). Taka razdelitev omogoča preverjanje vpliva alela A na neko spremenljivko po **dominantnem modelu dedovanja**. S statističnima testoma ANOVA in ANCOVA smo želeli preveriti, ali obstajajo značilne razlike v povprečnih vrednostih naših spremenljivk med skupinama A/A + A/G ter G/G. Če smo te razlike ugotovili, smo lahko zaključili, da alel A vpliva dominantno na fenotip spremenljivke. To pomeni, da je za izražanje spremenljivke dovolj samo alel A in da se bo izrazila pri homozigotih z genotipom A/A ter pri heterozigotih.

Želeli smo preveriti še drug model dedovanja. Pri tem smo preiskovance razdelili na dve skupini, in sicer na osebe, pri katerih je prisoten alel G (osebe z genotipom G/G + A/G) in na osebe, pri katerih ni prisotnega alela G (osebe z genotipom A/A). Taka razdelitev omogoča preverjanje vpliva alela A na neko spremenljivko po **recesivnem modelu dedovanja**. S statističnima testoma ANOVA in ANCOVA smo ponovno želeli preveriti, ali obstajajo značilne razlike v povprečnih vrednostih naših spremenljivk med skupinama G/G + A/G ter A/A. Če smo te razlike ugotovili, smo lahko zaključili, da alel A vpliva recesivno na fenotip spremenljivke. To pomeni, da morata biti za izražanje spremenljivke prisotna dva alela A, torej se lastnost izrazi le pri homozigotih z genotipom A/A, pri heterozigotih pa ne.

Statistični test ANOVA za celotno populacijo je pri dominantnem modelu dedovanja pokazal značilno razliko v povprečni vrednosti koncentracije osteokalcina v plazmi (pOC; $p = 0,020$) med osebami s prisotnim alelom A in osebami, ki tega alela nimajo. Torej lahko zaključimo, da je koncentracija kazalca kostne tvorbe pOC povezana z alelom oziroma, da alel vpliva nanjo. Osebe z alelom A so imele v povprečju višje vrednosti pOC od oseb, ki nimajo alela A (graf 4). Pri dominantnem dedovanju to pomeni, da alel A vpliva na povišano koncentracijo pOC dominantno. Torej se bo povišana koncentracija pOC izrazila pri vseh osebah vsaj z enim alelom A. Da bi te osebe lahko uvrstili med osebe s povečanim tveganjem za razvoj osteoporoze, bi morale imeti še povečano koncentracijo kazalcev kostne razgradnje, česar pa v tem primeru nismo ugotovili. Z ANCOVO smo izključili vpliv starosti in indeksa telesne teže ($p = 0,006$) na pOC ter s tem povečali vpliv alela A.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracije osteokalcina v plazmi med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



Graf 4: Povprečni vrednosti koncentracij pOC v različnih genotipskih podskupina glede na dominantni model ($p=0,020$; ANOVA)

Zaključimo lahko, da je v preiskovalni skupini celotne populacije polimorfizem Ala16Val povezan z vrednostmi koncentracij kostnih kazalcev DPD, sBALP, pOC, medtem ko na mineralno kostno gostoto nima vpliva. Pri preverjanju povezanosti alela s spremenljivkami smo ugotovili povezanost alela A in povprečne vrednosti koncentracije pOC.

Vzorec preiskovancev z določeno koncentracijo DPD je bil majhen ($N=50$), zato je težko posplošiti vpliv genotipa na njegovo koncentracijo na celotno preiskovalno skupino.

Vpliva genotipa na vrednosti BMD kljub povišani kostni remodelaciji torej nismo dokazali. Predvidevamo lahko, da encim SOD2 v kostnih celicah ni glavni antioksidantni encim, oziroma, da lahko organizem zmanjšano aktivnost SOD2 kompenzira preko drugih antioksidantnih encimov in zaradi tega ne pride do zmanjšanja mineralne kostne gostote. Med te antioksidantne encime spadata na primer glutathion peroksidaza (GPX) ali glutathion S transferaza (GST). V raziskavi na podganah z odstranjenimi jajčniki so namreč ugotovili značilne razlike v aktivnosti encimov SOD2, GPX in GST v primerjavi z zdravimi kontrolami (4). Zaradi tega je možna zgoraj omenjena kompenzacija. Možno je tudi, da so imeli naši preiskovanci zdrav način življenja in v njihovem življenjskem okolju dejavnike, ki delujejo zaščitno na BMD. Za bolj zanesljivo oceno vpliva Ala16Val bi bilo smiselno raziskavo ponoviti na večjem številu preiskovancev.

4.2.2.2 OCENA KLINIČNEGA VPLIVA Ala16Val V SKUPINI MOŠKIH PREISKOVANCEV (N= 96)

Enako kot pri celotni populaciji smo tudi samo pri moških hoteli preučiti vpliv polimorfizma Ala16Val na BMD in koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije. Predvsem smo želeli preveriti razlike med žensko in moško populacijo preiskovancev. Vemo namreč, da obstajajo precejšnje razlike v doseganju PBM in izgubi kostnine med tema dvema skupinama. Žal pa statistični testi niso pokazali značilnih razlik v povprečnih vrednostih spremenljivk med posameznimi genotipskimi podskupinami v skupini moških preiskovancev. Torej lahko zaključimo, da genotip ne vpliva na vrednosti spremenljivk. Statistični testi tudi niso pokazali značilnih razlik v povprečnih vrednosti spremenljivk med aleli. Lahko bi bili naši rezultati tudi povezani z dejstvom, da imajo moški 15 odstotkov manjšo aktivnost encima SOD2 v primerjavi z ženskami (35), torej tudi polimorfizem manj vpliva na BMD in koncentracijo kostnih kazalcev.

Zaradi premajhnega števila preiskovancev v moški populaciji (N= 96) ne moremo dajati zaključkov glede vpliva polimorfizma. Smiselno bi bilo v nadaljnjih študijah povečati vzorec in nato še enkrat preučiti vpliv polimorfizma na BMD in koncentracijo kostnih biokazalcev.

4.2.2.3 OCENA KLINIČNEGA VPLIVA Ala16Val V SKUPINI ŽENSKIH PREISKOVANK (N= 523)

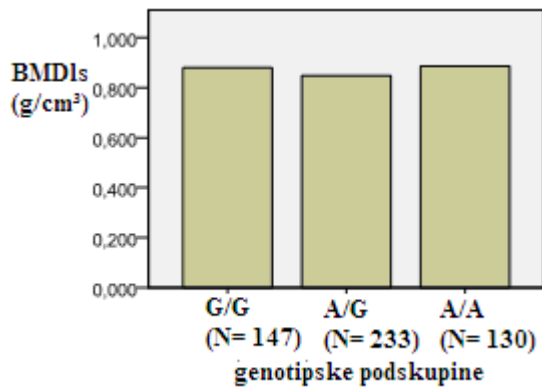
Kot že povedano med žensko in moško populacijo obstajajo precejšnje razlike v doseganju najvišje kostne mase ter stopnji kostne remodelacije in starostni izgubi kostnine. Ženske hitreje izgubljajo BMD na račun povečane kostne remodelacije preko različnih mehanizmov. Ženske naj bi imele tudi 15 odstotkov višjo aktivnost encima SOD2 (35), torej naj bi bila vloga polimorfizma v tej preiskovalni skupini večja. Zato smo želeli preučiti vpliv polimorfizma Ala16Val v genu SOD2 na vrednosti BMD in koncentracij kostnih biokazalcev v skupini samo ženskih preiskovank.

Vzorcem DNA smo z metodo alelne diskriminacije v realnem času določili genotip. Preiskovanke smo nato najprej razdelili glede na genotip. S statističnimi testi Kruskal- Wallis, ANOVA, LSD Post Hoc testom ter ANCOVO smo rezultate analizirali.

Statističen LSD Post Hoc test je pokazal značilne razlike v povprečnih vrednostih BMD_{tot} ($p=0,036$) med genotipoma A/G in G/G. Pokazal je tudi značilne razlike v povprečnih vrednostih BMD_{ls} ($p=0,035$) med genotipoma A/G in A/A. Torej sta BMD_{ls} (BMD v predelu vratnih vretenc)

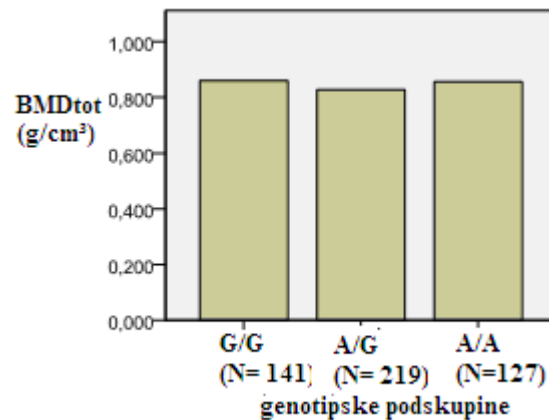
in BMDtot (BMD v predelu celotnega kolka) povezani z genotipom. Po nadaljnjem pregledu rezultatov pa smo ugotovili, da vrednosti BMD pri mutiranih homozigotih niso močnejše znižane v primerjavi z ostalimi genotipi (graf 5 in 6), torej polimorfizma Ala16Val ne moremo povezati z možnostjo nastanka osteoporoze.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti BMDv predelu vratnih vretenc med posameznimi genotipskimi podskupinami.



Graf 5: Povprečne vrednosti BMDs v različnih genotipskih podskupinah
($p= 0,035$; LSD – A/G in G/G)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti BMD v predelu celotnega kolka med posameznimi genotipskimi podskupinami.

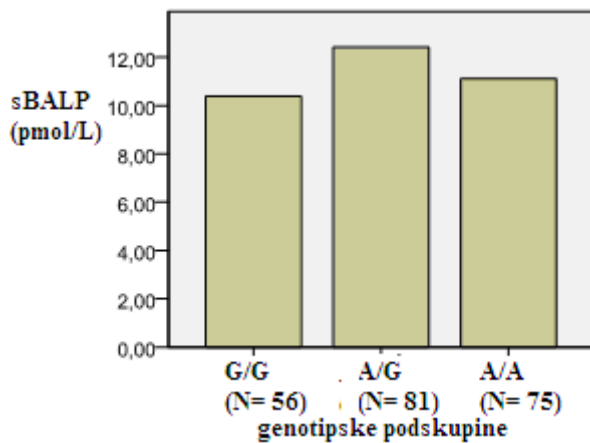


Graf 6: Povprečna vrednost BMDtot v različnih genotipskih podskupinah
($p= 0,036$; LSD – A/G in G/G)

Statističen LSD Post Hoc test je pokazal značilne razlike v povprečnih vrednostih koncentracij sBALP ($p= 0,021$) ter pOC ($p= 0,048$) med genotipoma A/G in G/G. Statistični test ANOVA je pokazal še značilne razlike v povprečnih vrednostih koncentracij DPD ($p= 0,029$) med tremi genotipskimi podskupinami. sBALP in pOC sta kazalca kostne tvrobe, DPD pa kazalec kostne resorpcije. Zaključimo lahko, da so povprečne vrednosti koncentracij prej naštetih spremenljivk povezane z genotipom oziroma, da Ala16Val vpliva na njihove vrednosti. Osebe z genotipom A/A so imele v povprečju značilno višje vrednosti sBALP (graf 7), pOC (graf 8) in DPD (graf 9) v primerjavi z osebami z genotipom G/G. To kaže, da imajo te osebe povišano kostno remodelacijo in s tem povečano tveganje za razvoj osteoporoze.

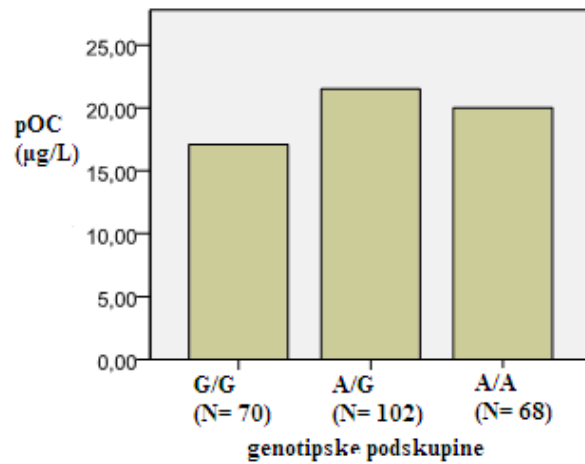
Število preiskovancev z določeno vrednostjo za DPD je bilo premajhno ($N = 50$), da bi te rezultate lahko upoštevali. Z ANCOVO smo lahko izključili vpliv starosti in ITM na vrednosti koncentracije pOC ($p = 0,029$), torej je pri tej spremenljivki vpliv genotipa še močnejši.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracij kostno- specifične alkalne fosfataze med posameznimi genotipskimi podskupinami.



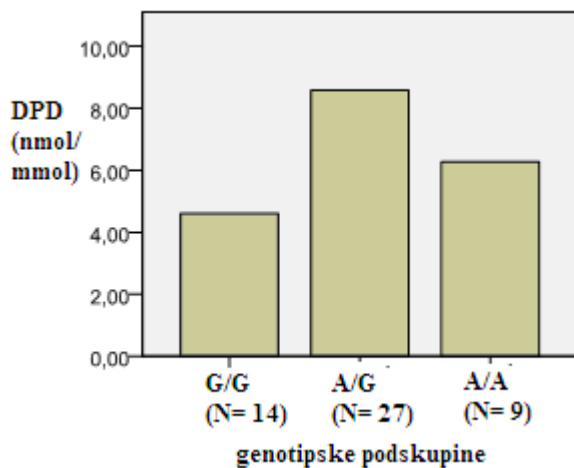
Graf 7: Povprečne vrednosti koncentracij sBALP v posameznih genotipskih podskupinah ($p = 0,021$; LSD – A/G in G/G)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti osteokalcina v plazmi med posameznimi genotipskimi podskupinami.



Graf 8: Povprečne vrednosti koncentracij pOC v posameznih genotipskih podskupinah ($p = 0,048$; LSD – A/G in G/G)

C) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracij deokspiridinolina med posameznimi genotipskimi podskupinami.

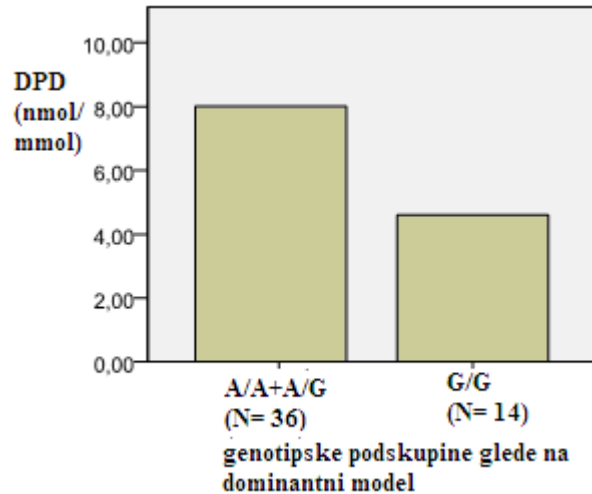


Graf 9: Povprečne vrednosti koncentracij DPD v posameznih genotipskih podskupinah ($p = 0,007$; ANOVA)

Ponovno nas je zanimal tudi način dedovanja naših spremenljivk. S preverjanjem le- tega ugotovimo, kateri alel bolj prispeva k izražanju določene spremenljivke. Na ta način lažje razložimo, kako naj bi se spremenljivka izražala pri heterozigotnih osebah, ki imajo oba alela, hkrati pa povečamo statistično moč testa vpliva genotipa.

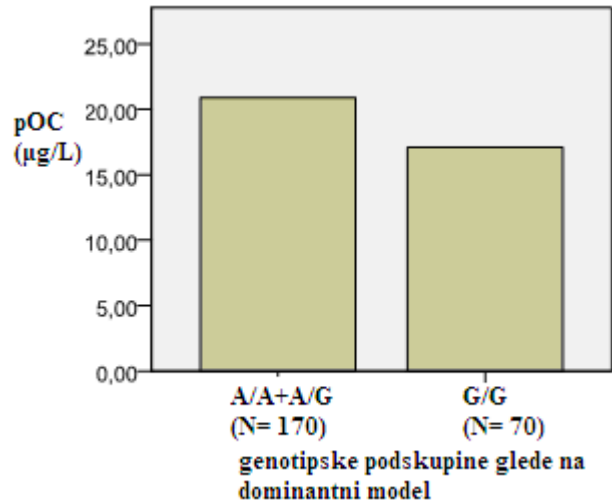
Najprej smo preiskovance razdelili na dve skupini, in sicer na osebe, pri katerih je prisoten alel A (osebe z genotipoma A/A + A/G) ter osebe, pri katerih ni prisotnega alela A (osebe z genotipom G/G). Taka razdelitev omogoča preverjanje vpliva alela A na neko spremenljivko po dominantnem modelu dedovanja. S statističnim testom ANOVA smo ugotovili značilne razlike v povprečni koncentraciji osteokalcina v plazmi (pOC; $p=0,020$) ter deoksi piridinolina v urinu (DPD; $p=0,006$) med skupinama (A/A + A/G) in (G/G). Torej lahko zaključimo, da sta koncentraciji kazalca kostne tvorbe, pOC, in koncentracija kazalca kostne razgradnje, DPD, povezani z alelom. Osebe z alelom A so imele v povprečju višje vrednosti pOC in DPD od oseb, ki nimajo alela A (graf 10 in 11). Pri dominantnem dedovanju to pomeni, da alel A vpliva na povišano koncentracijo pOC ter DPD dominantno. Torej se bo povišana koncentracija pOC in DPD izrazila pri vseh osebah z alelom A. To kaže, da imajo te osebe povišano kostno remodelacijo, ki je značilna za osteoporozne bolnike. Torej bi lahko osebe z alelom A uvrstili med osebe s povečanim tveganjem za osteoporozo. Spet pa je bil vzorec preiskovank z določeno koncentracijo DPD premajhen ($N=50$), da bi lahko to z gotovostjo trdili. Pri obeh spremenljivkah smo z ANCOVO lahko izključili vpliv starosti in indeksa telesne teže ($p_{DPD}=0,009$, $p_{pOC}=0,029$), ter tako statistično še povečali vpliv alela A.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracije deoksidipiridinolina med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



Graf 10: Povprečna vrednost koncentracij DPD v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model ($p=0,006$; ANOVA)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracije osteokalcina v plazmi med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



Graf 11: Povprečna vrednost koncentracij pOC v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model ($p=0,020$; ANOVA)

Zaključimo lahko, da je pri ženskah polimorfizem Ala16Val povezan z vrednostmi koncentracij kazalcev kostne remodelacije sBALP, pOC ter DPD, na mineralno kostno gostoto pa nima vpliva. Osebe z genotipom A/A so bile vrednosti koncentracije teh kazalcev značilno višje v primerjavi z genotipom G/G. Osebe z alelom A so tudi imele značilno višje vrednosti koncentracij pOC in DPD. Torej polimorfizem Ala16Val vpliva na povečano kostno remodelacijo. Zaradi povečane kostne remodelacije bi morale priti tudi do sprememb v BMD. Predvidevamo lahko, da organizem preko drugih mehanizmov uspe zaščititi kostnino pred izgubo kostne gostote. Spet lahko predvidevamo tudi, da zmanjšana aktivnost encima SOD 2 ne igra ključne vloge pri zmanjšanju BMD ali pa so v življenjskem okolju preiskovank prisotni zaščitni dejavniki.

4.2.2.4 OCENA KLINIČNEGA VPLIVA Ala16Val V SKUPINI ŽENSK PRED MENOPAVZO (N= 43)

Za razdelitev ženskih preiskovank glede na status menopavze smo se odločili, ker vemo, da izguba estrogena značilno vpliva na zmanjšanje mineralne kostne gostote. Ženske pred menopavzo naj bi torej imele višje vrednosti BMD (Razpredelnica 11). Če pa bi polimorfizem Ala16Val dejansko vplival na doseganje najvišje kostne mase (PBM), bi morale imeti ženske s tem polimorfizmom vseeno nižje vrednosti BMD. Želeli smo torej preučiti povezanost vrste genotipa z vrednostmi BMD in koncentracij kazalcev kostne remodelacije pri ženskah pred izgubo estrogena.

Rezultate za analizo s statističnimi testi smo pridobili na enak način kot pri prejšnjih preiskovalnih skupinah. Preiskovanke smo razdelili glede na genotip.

Statistični testi niso pokazali značilnih razlik v povprečnih vrednostih spremenljivk med različnimi genotipskimi podskupinami. Ravno tako niso pokazali značilnih razlik v povprečnih vrednostih spremenljivk med aleli. Torej naj polimorfizem ne bi vplival na BMD ali koncentracijo kostnih kazalcev. To lahko poskušamo razložiti s tem, da ženske pred menopavzo še niso utrpeli izgube estrogena in zato tudi ni znižanja BMD. Torej je genetski vpliv na stanje v kostnini zakrit. Pri tem očitno polimorfizem v genu SOD2 nima večje vloge. V tej preiskovalni skupini polimorfizem tudi ni povezan z vrednostmi koncentracij kostnih kazalcev, tako kot je pri ostali preiskovalnih skupinah.

Vzorec te skupine je bil premajhen (N=43), da bi lahko z gotovostjo napovedali vpliv polimorfizma, zato bi bilo smiselno študijo ponoviti na večjem vzorcu preiskovank.

4.2.2.5 OCENA KLINIČNEGA VPLIVA Ala16Val V SKUPINI POMENOPAVZNIH ŽENSK (N= 480)

V primerjavi z ženskami pred menopavzo bi morale imeti ženske po menopavzi nižje vrednosti BMD ter višjo koncentracijo kostnih biokazalcev. To predpostavko smo hoteli preveriti. Rezultati pokažejo, da je bila pravilna (Razpredelnica 11).

Spremenljivka	Pomenopavzne ženske	Premenopavzne ženske
BMDfn (g/ cm ³)	0,70 ± 0,125	0,78 ± 0,084
BMDtot (g/ cm ³)	0,84 ± 0,144	0,91 ± 0,094
BMDls (g/ cm ³)	0,86 ± 0,163	1,00 ± 0,117
pOC (µg/L)	21, 21 ± 11,658	10,46 ± 4,770
sBALP	12, 11 ± 5,150	8,07 ± 3,237
sOPG	5,19 ± 1,741	3,93 ± 0,854

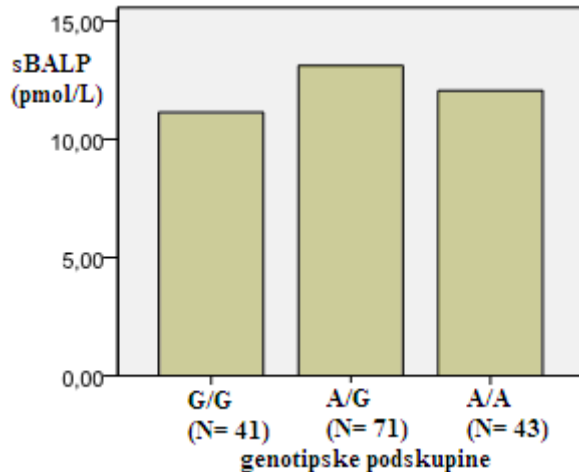
Razpredelnica 11: Povprečne vrednosti in SD nekaterih spremenljivk pri pomenopavznih in premenopavznih ženskah.

Želeli pa smo preveriti, kakšen vpliv ima pri tem polimorfizem Ala16Val v genu SOD2. Zato smo z alelna diskriminacijo določili genotipe vzorčnim DNA ter vzorce razdelili glede na genotip.

Statistični LSD Post Hoc test je pokazal mejno značilno razliko v povprečnih vrednostih koncentracij sBALP ($p= 0,053$) med genotipskima podskupinama G/G in A/G. Test ANOVA je pokazal značilno razliko v povprečnih vrednostih koncentracij DPD ($p= 0,006$) med posameznimi genotipi. Zaključimo lahko, da je polimorfizem Ala16Val povezan z vrednostmi koncentracij sBALP in DPD, oziroma da na njih vpliva. sBALP je kazalec kostne tvorbe, DPD pa kazalec kostne tvorbe. Povišane vrednosti teh dveh kazalcev kažejo na povečano stopnjo kostne remodelacije. V naši raziskavi so imele osebe z genotipom A/A v povprečju značilno višje vrednosti sBALP in DPD v primerjavi z osebami z genotipom G/G. Zato lahko rečemo, da polimorfizem Ala16Val vpliva na povišano kostno remodelacijo in s tem na spremembe v strukturi kosti.

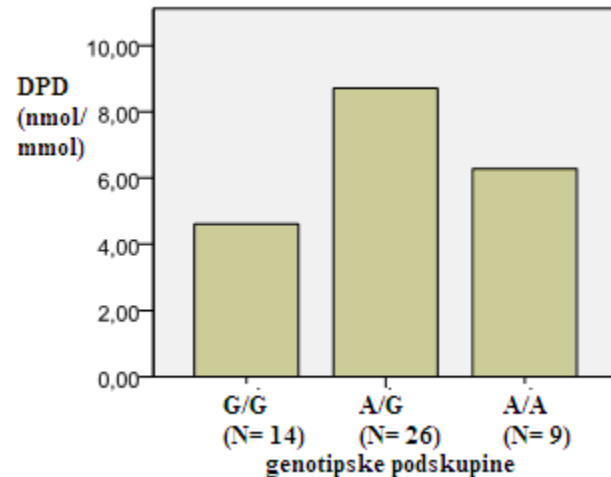
Spet je bil vzorec preiskovank z določeno koncentracijo DPD premajhen ($N =49$), da bi lahko delali zaključke.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracij kostno- specifične alkalne fosfataze med posameznimi genotipskimi podskupinami.



Graf 12: Povprečne vrednosti koncentracij sBALP različnih genotipskih podskupinah ($p=0,053$; LSD-A/G in G/G)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti deoksimiridinolina v plazmi med posameznimi genotipskimi podskupinami.

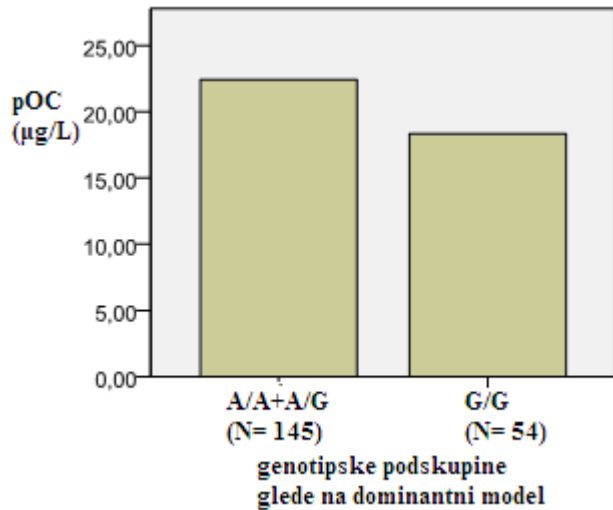


Graf 13: Povprečne vrednosti koncentracije DPD v različnih genotipskih podskupinah ($p= 0,006$; ANOVA)

Ponovno nas je zanimalo, kateri alel, A ali G, bolj vpliva na izražanje spremenljivke, zato nas je zanimal način dedovanja spremenljivk. Na ta način lažje razložimo, kako naj bi se spremenljivka izražala pri heterozigotnih osebah, ki imajo oba alela.

Preiskovance smo razdelili na osebe z alelom A (osebe z genotipom A/A + A/G) ter osebe brez alela A (osebe z genotipom G/G). Taka razdelitev omogoča preverjanje vpliva alela A na neko spremenljivko po dominantnem modelu dedovanja, torej se le- ta deduje dominantno preko alela A. S statističnima testoma ANOVA in ANCOVA smo ugotovili značilne razlike v povprečnih vrednostih plazemskega osteokalcina ($p= 0,028$) med skupinama (A/A + A/G) ter (G/G). Torej alel A vpliva dominantno na koncentracijo kazalca kostne tvorbe, pOC. Osebe z alelom A so imele v povprečju višje vrednosti pOC od oseb, ki nimajo alela A (graf 14). Torej imajo te osebe višjo kostno tvorbo. Ob povišani kostni razgradnji bi te osebe lahko uvrstili med osebe s povečanim tveganjem za osteoporozo. Vendar naši rezultati povišane kostne razgradnje niso pokazali. Z ANCOVO smo lahko izključili vpliv starosti in indeksa telesne teže na vrednosti pOC ($p= 0,013$) ter tako statistično še povečali povezanost vrednosti spremenljivke z alelom A.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracije osteokalcina v plazmi med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



Graf 14: Povprečni vrednosti koncentracij pOC v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model ($p=0,028$; ANOVA)

Zaključimo lahko, da je v preiskovalni skupini celotne populacije polimorfizem Ala16Val povezan z vrednostmi koncentracij kostnih kazalcev DPD, sBALP, medtem ko na mineralno kostno gostoto nima vpliva. Pri preverjanju povezanosti alela s spremenljivkami smo ugotovili povezanost alela A s povprečno vrednostjo koncentracije pOC.

Kljub ugotovitvi, da imajo ženske preiskovanke po menopavzi v primerjavi z ženskami pred menopavzo nižje vrednosti BMD, naša študija ni pokazala vpliva polimorfizma na takšno stanje oziroma sploh ni pokazala vpliva genotipa na vrednosti BMD. Predvidevamo lahko, da sam encim SOD2 nima večje vloge pri odpravljanju škode v kosteh, povzročene zaradi izgube estrogena, ali da je pri preiskovankah prisotnih veliko zaščitnih negenetskih faktorjev, ki zakrijejo vpliv genotipa.

4.2.2.6 OCENA KLINIČNEGA VPLIVA Ala16Val V SKUPINI ŽENSK, MLAJŠIH OD 50 LET (N= 48)

Pri izgubi BMD ter stopnje kostne remodelacije je starost zelo pomemben faktor. Pri ženskah, mlajših od 50 let naj BMD še ne bi bila znižana, prav tako naj bi bila stopnja remodelacije zmerna in zaradi tega nižje koncentracije biokemijskih kostnih kazalcev v primerjavi s starejšimi

preiskovankami. Želeli smo preučiti, kakšen je vpliv polimorfizma na BMD in kostne biokazalce pri tej starostni skupini.

Statistični testi niso pokazali značilnih razlik v povprečnih vrednostih spremenljivk med različnimi genotipskimi ali alelnimi podskupinami. Torej naj polimorfizem ne bi vplival na BMD ali koncentracijo kostnih kazalcev. Vendar pa je bil vzorec premajhen (N=48), zato ne moremo z gotovostjo trditi, da polimorfizem ne vpliva na BMD ter kazalce. Smiselno bi bilo raziskavo ponoviti na večjem vzorcu.

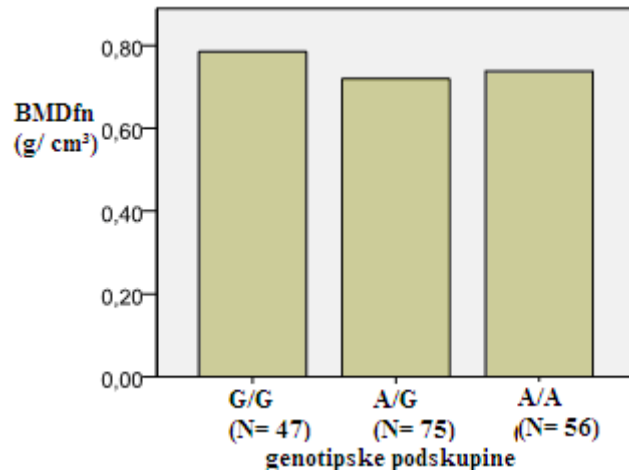
4.2.2.7 OCENA KLINIČNEGA VPLIVA Ala16Val V SKUPINI ŽENSK, STARIH OD 50 DO 59 LET (N= 181)

Ženske v tej starosti večinoma pridejo v menopavzo. V prvih šestih letih menopavze se kažejo največje spremembe v kostni mikroarhitekturi, tako z zmanjšanjem BMD kot z zelo povečano stopnjo kostne remodelacije. Na račun večje resorpcije kostnine od njene tvorbe pride do tanjšanja trabekularnih kosti. Naš namen je bil ugotoviti, ali ima na odvijanje teh procesov vpliv genetski faktor, v našem primeru polimorfizem Ala16Val.

Z alelno diskriminacijo v realnem času smo tudi tem vzorcem določili genotip ter s statističnimi testi analizirali rezultate. Najprej smo vzorce razdelili glede na genotip.

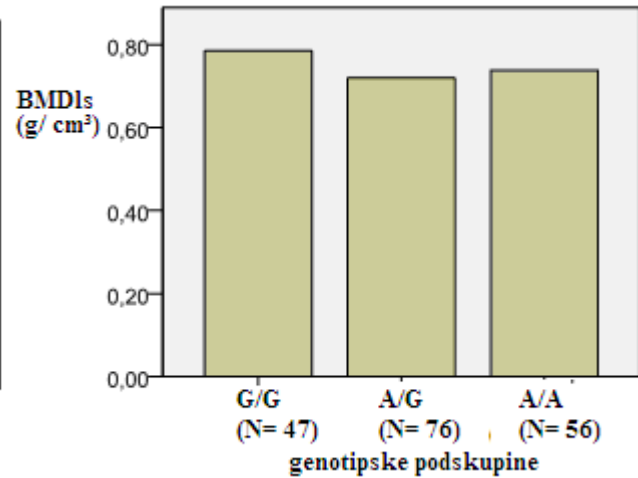
ANOVA test in je pokazal značilne razlike v povprečnih vrednostih BMD_{fn} ($p= 0,032$) in BMD_{ls} ($p= 0,040$) med posameznimi genotipskimi podskupinami. LSD Post Hoc pa je pokazal značilne razlike v povprečnih vrednostih BMD_{tot} ($p= 0,049$) med genotipoma A/G in G/G. Zaključimo torej lahko, da je polimorfizem Ala16Val povezan z vrednostmi BMD oziroma vpliva nanje. Zanimalo nas je, ali so povprečne vrednosti teh spremenljivk značilno nižje pri osebah z genotipom A/A v primerjavi z osebami z genotipom G/G (graf 15, 16, 17). Ugotovili smo, da so. Torej lahko rečemo, da v tej preiskovalni skupini polimorfizem Ala16Val ima vpliv na znižanje BMD. In s tem na razvoj osteoporoze. Pri spremenljivki BMD_{fn} ($p= 0,037$) smo z ANCOVO izključili vpliv starosti in indeksa telesne teže, pri BMD_{ls} pa samo vpliv indeksa telesne teže ($p= 0,043$) ter tako še povečali vpliv samega genotipa na njune vrednosti.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti BMD v predelu vratu stegenice med posameznimi genotipskimi podskupinami



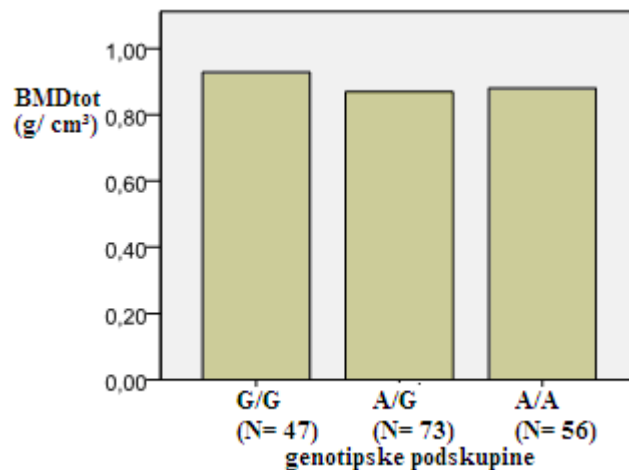
Graf 15: Povprečne vrednosti BMDfn v različnih genotipskih podskupinah ($p = 0,032$; ANOVA)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti BMD v predelu vratnih vretenc med posameznimi genotipskimi podskupinami



Graf 16: Povprečne vrednosti BMDls v različnih genotipskih podskupinah ($p = 0,040$; ANOVA)

C) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti BMD v predelu celotnega kolka med posameznimi genotipskimi skupinami

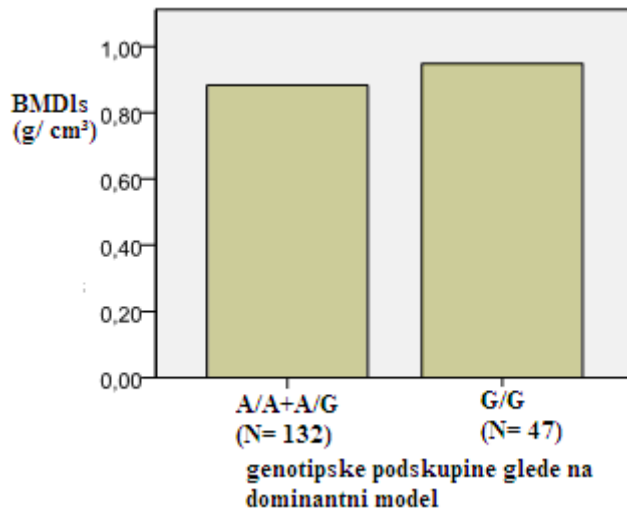


Graf 17: Povprečne vrednosti BMDtot v odvisnosti različnih genotipskih podskupinah ($p = 0,049$; LSD – G/G in A/G)

Da bi lažje predvidevali, kakšen bo fenotip spremenljivk pri heterozigotnih osebah smo želeli preveriti povezanosti med spremenljivkami in posameznim alelom. Najprej smo želeli preveriti dominantni vpliv alela A preko dominantnega modela dedovanja. Preiskovance smo razdelili na 2

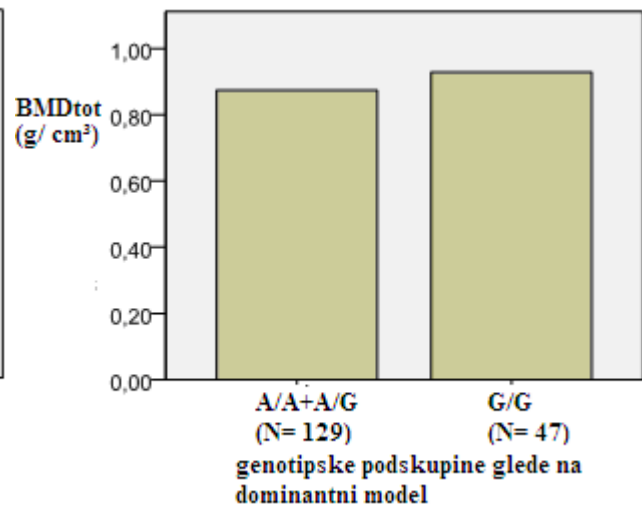
skupini: osebe z alelom A (osebe z genotipom A/A + A/G) ter osebe brez alela A (z genotipom G/G). S statističnim testom ANOVA smo ugotovili značilne razlike v povprečnih vrednostih BMD med obema skupinama, in sicer za BMDls ($p= 0,032$), BMDfn ($p= 0,012$) ter BMDtot ($p= 0,047$). To pomeni, da se vrednosti teh spremenljivk dedujejo dominantno preko alela A oziroma, da je za dedovanje potrebna prisotnost vsaj enega alela A. Osebe z alelom A so imele v povprečju značilno nižje vrednosti BMDls (graf 18), BMDfn (graf 19) ter BMDtot (graf 20) kot osebe z alelom G. Torej bi lahko zaključili, da imajo osebe z mutiranim alelom A večje tveganje za razvoj osteoporoze. Z ANCOVO smo izključili vpliv indeksa telesne teže na vrednosti BMDls ($p= 0,028$) in vpliv starosti in indeksa telesne teže na BMDtot ($p= 0,025$) in BMDfn ($p= 0,012$) ter tako statistično še povečali povezanost vrednosti spremenljivk z alelom A.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti BMD v predelu vratnih vretenc med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



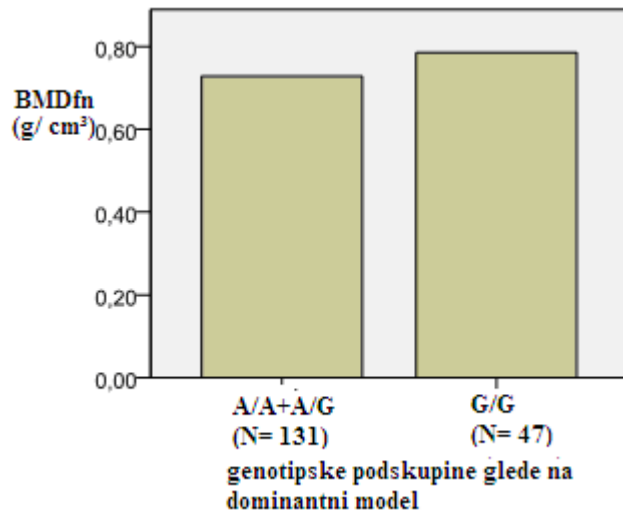
Graf 18: Povprečni vrednosti BMDls v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model dedovanja ($p= 0,032$; ANOVA)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti BMD v predelu celotnega kolka med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



Graf 19: Povprečni vrednosti BMDtot v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model dedovanja ($p= 0,047$; ANOVA)

c) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti BMD v predelu vratu stegeninice v plazmi med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



Graf 20: Povprečni vrednosti BMDfn v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model ($p=0,012$; ANOVA)

Zaključimo lahko, da je v tej preiskovalni skupini polimorfizem Ala16Val povezan z vrednostmi BMD oziroma vpliva nanje.

Veliko žensk med 50. in 59. letom starosti pride v obdobje menopavze in prva leta so najbolj kritična za BMD. Poleg tega pri tej starostni skupini že lahko pride do s starostjo povezanega povečanega nastajanja prostih radikalov. Zato lahko predvidevamo, da so spremembe v organizmu naenkrat prevelike, da bi jih lahko kompenzirali le s povečanim izražanjem genov za ostale antioksidativne encime. Očitno so spremembe tako velike, da tudi protektivni faktorji iz okolja ne uspejo več zakriti genskega vpliva na zmanjšanje BMD.

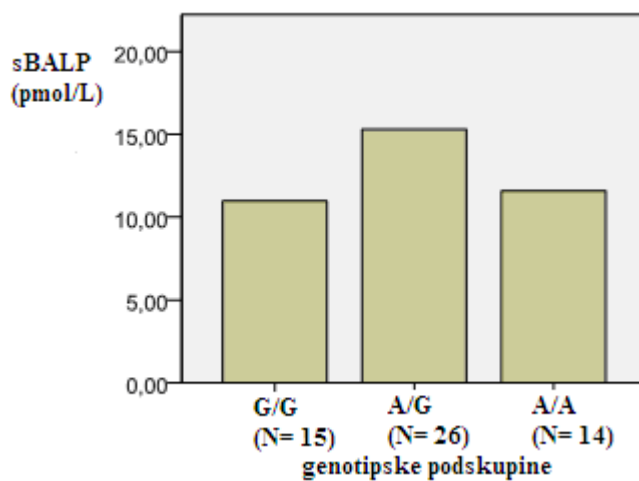
4.2.2.8 ŽENSKE, STARE MED 60 IN 69 LET (N= 182)

Ženske v tej starostni skupini so večinoma že nekaj let v obdobju menopavze. Do šestih let po pričetku menopavze so spremembe v BMD in koncentraciji biokemijskih kazalcev največje. Pri nekaterih se spremembe v kostni mikroarhitekturi že umirijo. Želeli smo preučiti povezanost genotipa z vrednostmi MKG in koncentracijo kostnih kazalcev.

Z alelna diskriminacijo smo vzorčnim DNA določili genotip ter s statističnimi testi analizirali povezanost le- tega s našimi spremenljivkami.

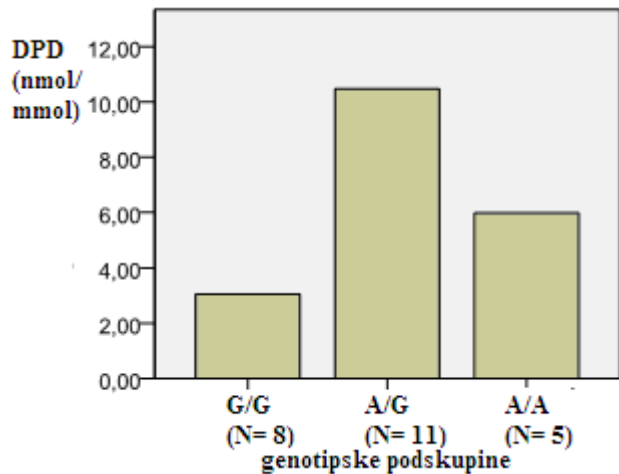
Statističen test ANOVA je pokazal značilne razlike v povprečnih vrednostih kostnih kazalcev med posameznimi genotipskimi podskupinami, in sicer za spremenljivki: sBALP ($p=0,015$) in DPD ($p=0,004$). LDS Post Hoc test pa je pokazal značilne razlike v povprečnih vrednostih koncentracij alkaline fosfataze (ALP; $p=0,029$) med genotipoma A/G in G/G. Zaključimo torej lahko, da je polimorfizem Ala16Val povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracij teh spremenljivk oziroma vpliva nanje. Alkalna fosfataza (ALP) je tako kot kostno- specifična alkalna fosfataza (sBALP) kazalec kostne tvorbe, medtem ko je DPD kazalec kostne resorpcije. Če so v organizmu vrednosti koncentracij teh spremenljivk povišane, sklepamo na povišano stopnjo kostne remodelacije. Pri tem lahko pride do tanjšanja trabekularnih kosti, saj je za osteoporozo značilna povečana kostna remodelacija, in sicer na račun povečane stopnje kostne resorpcije. Preverili smo, kakšne so vrednosti koncentracij teh kostnih kazalcev pri osebah z mutiranim genotipom A/A. Ugotovili smo, da so značilno povišane v primerjavi z osebami z normalnim genotipom G/G (graf 21, 22, 23). Vendar pa je bil vzorec preiskovank z določenimi koncentracijami premajhen ($N_{DPD \text{ in } ALP} \approx 25$ ter $N_{sBALP} = 50$), da bi lahko delali zaključke.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracij kostno- specifične alkalne fosfataze med posameznimi genotipskimi podskupinami



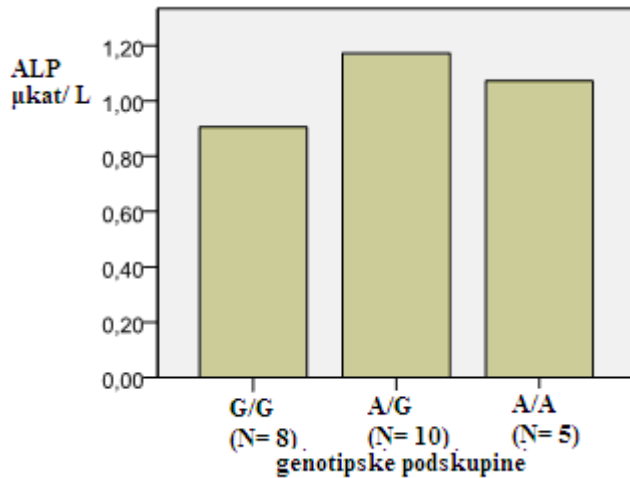
Graf 21: Povprečne vrednosti koncentracij sBALP v različnih genotipskih podskupinah ($p=0,015$; ANOVA)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti deokspiridinolina v plazmi med posameznimi genotipskimi podskupinami.



Graf 22: Povprečne vrednosti koncentracije DPD v različnih genotipskih podskupinah ($p=0,004$; ANOVA)

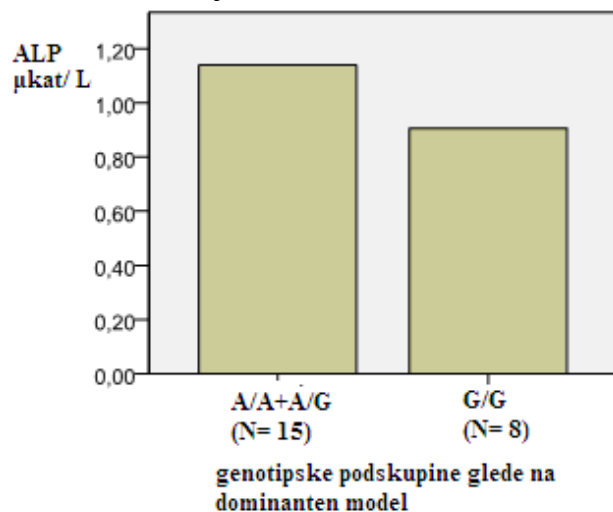
C) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracij alkalne fosfataze med posameznimi genotipskimi podskupinami



Graf 23: Povprečne vrednosti koncentracij ALP v različnih genotipskih podskupinah ($p = 0,029$; LSD- A/G in G/G)

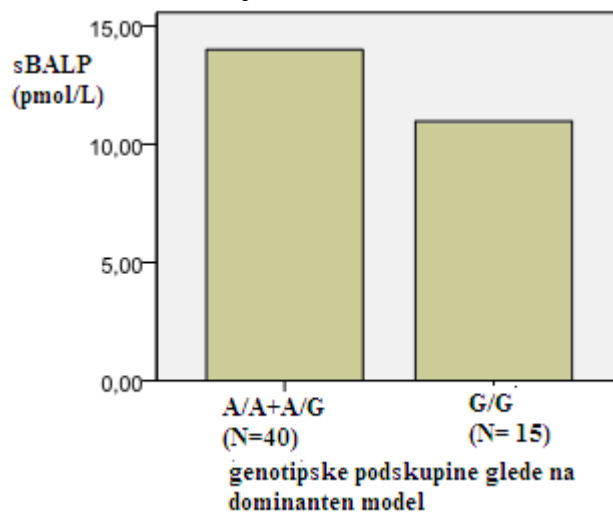
Tudi v tej preiskovalni skupini smo želeli preveriti način dedovanja spremenljivk. Najprej smo preko dominantnega modela dedovanja želeli preveriti vpliv alela A. Preiskovance smo zopet razdelili na osebe z alelom A (genotipa A/A + A/G) ter osebe brez alela A (genotip G/G). S statističnim testom ANOVA smo ugotovili značilne razlike v povprečnih vrednostih ALP ($p = 0,035$) in DPD ($p = 0,005$) med obema skupinama. Ugotovili smo tudi mejno značilno razliko v povprečnih vrednostih koncentracij sBALP ($p = 0,059$) med obema skupinama. Tudi pri tej preiskovalni skupini so bile vrednosti koncentracij povišane pri osebah z mutiranim alelom A v primerjavi z osebami z alelom G. Torej Ala16Val vpliva na povišano stopnjo kostne remodelacije. Vendar pa je bil vzorec preiskovank z določenimi koncentracijami zopet premajhen ($N_{DPD \text{ in } ALP} \approx 25$ ter $N_{sBALP} = 50$), da bi lahko delali zaključke.

A) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracije alkalne fosfataze med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



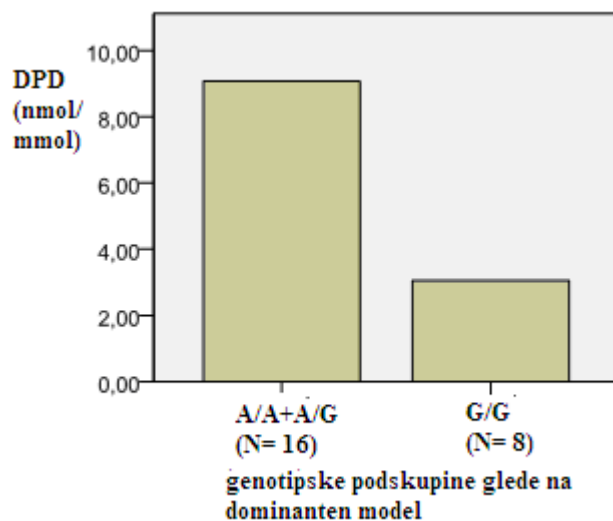
Graf 24: Povprečni vrednosti koncentracij ALP v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model dedovanja ($p=0,035$; ANOVA)

B) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracije kostno- specifične alkalne fosfataze med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



Graf 25: Povprečni vrednosti koncentracij sBALP v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model dedovanja ($p=0,059$; ANOVA)

C) Prikaz porazdelitve povprečnih vrednosti koncentracij deoksipiridinolina med skupinama preiskovancev s prisotnim in odsotnim alelom A preko dominantnega modela dedovanja



Graf 26: Povprečni vrednosti koncentracij DPD v različnih genotipskih podskupinah glede na dominantni model dedovanja ($p=0,005$; ANOVA)

Zaključimo lahko, da polimorfizem Ala16Val v tej preiskovalni skupini ni povezan z vrednostmi BMD. Povezan pa je z vrednostmi koncentracij biokemijskih kazalcev kostne remodelacije: sBALP, ALP ter DPD. Vendar je vzorec, pri katerem so določene koncentracije teh kazalcev premajhen ($N_{\text{DPD in ALP}} \approx 25$ ter $N_{\text{sBALP}} = 50$), da bi lahko našo ugotovitev potrdili. Smiselno bi bilo koncentracije izmeriti večjemu številu preiskovank in raziskavo ponoviti.

4.2.2.9 OCENA KLINIČNEGA VPLIVA Ala16Val V SKUPINI ŽENSK, STAREJŠIH OD 69 LET (N= 112)

Pri starejših ženskah je stopnja remodelacije že upočasnjena. Na BMD lahko vplivajo fiziološki faktorji, povezani s starostjo. Zmanjšanje BMD zaradi izgube estrogena ni več toliko pomembno za kostno mikroarhitekturo, saj je večina žensk v tem obdobju že prešla obdobje prvih šestih let menopavze. S študijo smo želeli ugotoviti, ali je genotip povezan z vrednostmi BMD in koncentracij biokemijskih kazalcev kostne remodelacije.

S pomočjo statističnih testov smo želeli analizirati populacijo preiskovank, najprej opredeljenih glede na genotip.

Ugotovili smo, da nobena od spremenljivk, razen povprečna vrednost koncentracije DPD ni povezana z genotipom. Vzorec preiskovank z določeno koncentracijo DPD pa je bil občutno premajhen (N= 19), da bi lahko rezultate prenašali na celotno populacijo žensk v tej starostni skupini. Tudi pri preverjanju povezave alela s spremenljivkami, statistični testi niso pokazali značilnih razlik v vrednostih spremenljivk med obema aleloma.

Zaključimo lahko, da genotip ni povezan z vrednostmi BMD in koncentracijami biokemijskih kostnih kazalcev pri ženskah, starejših od 69 let. Smiselno bi bilo koncentracije kostnih kazalcev določiti večji skupini žensk v tej starostni skupini ter ponoviti raziskavo.

5. SKLEP

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali sprememba Ala v Val na kodonu 16 v genu za superoksidno dismutazo 2 vpliva na mineralno kostno gostoto in koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne remodelacije. Najprej smo z metodo alelne diskriminacije v realnem času genotipizirali DNA 619 preiskovancev, in sicer 523 žensk in 96 moških. Ugotovili smo, da ima 47,47% slovenske populacije genotip A/G, 24,05% ima A/A genotip (mutirani homozigot) in 28,48% genotip G/G.

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da je polimorfizem Ala16Val v genu SOD2:

- v celotni populaciji bil povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracij kostnih kazalcev: DPD ($p = 0,007$), sBALP ($p = 0,045$), pOC ($p = 0,037$), in sicer so imele osebe genotipom A/A značilno višje vrednosti od oseb z genotipom G/G. Vpliva na mineralno kostno gostoto nismo dokazali.
- v skupini moških ni bil povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracij kostnih kazalcev ali mineralno kostno gostoto
- v skupini žensk bil povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracij kazalcev kostne remodelacije: DPD ($p = 0,007$), sBALP ($p = 0,021$), pOC ($p = 0,048$), in sicer so imele osebe genotipom A/A značilno višje vrednosti od oseb z genotipom G/G. Vpliva na mineralno kostno gostoto nismo dokazali.
- v skupini žensk pred menopavzo ni bil povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracij kostnih kazalcev ali mineralno kostno gostoto
- v skupini pomenopavznih žensk bil povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracij kazalcev kostne remodelacije: DPD ($p = 0,006$), sBALP ($p = 0,053$), pOC ($p = 0,028$), in sicer so imele osebe z genotipom A/A značilno višje vrednosti od oseb z genotipom G/G. Vpliva na mineralno kostno gostoto nismo dokazali.
- v skupini žensk, starih med 50 in 59 let, bil povezan s povprečnimi vrednostmi mineralne kostne gostote ($p_{\text{BMD}_{\text{fin}}} = 0,032$, $p_{\text{BMD}_{\text{ls}}} = 0,040$, $p_{\text{BMD}_{\text{tot}}} = 0,049$), in sicer so imele osebe z genotipom A/A značilno nižje vrednosti od oseb z genotipom G/G. Vpliva na koncentracijo kostnih kazalcev v tej skupini nismo dokazali.

- v skupini žensk, starih od 60 do 69 let, bil povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracij biokemijskih kazalcev kostne remodelacije: sBALP ($p=0,015$), ALP ($p=0,029$) ter DPD ($p=0,004$), in sicer so imele osebe genotipom A/A značilno višje vrednosti od oseb z genotipom G/G. Vpliva na mineralno kostno gostoto nismo dokazali.

Rezultati nakazujejo dominanten vpliv alela A na pospešeno kostno remodelacijo ter na nižje vrednosti BMD, kar pomeni, da bi oseba s prisotnim alelom A lahko izkazovala večjo nagnjenost k osteoporozi.

Vzorec preiskovancev z določeno koncentracijo DPD in ALP je bil v naši preiskovalni skupini premajhen ($N \leq 50$), da bi lahko posplošili vpliv polimorfizma na njegovo koncentracijo v naših preiskovalnih skupinah. Zato bi bilo smiselno vsem preiskovancem določiti koncentraciji omenjenih kazalcev kostne remodelacije.

Naša raziskava služi kot orientacija za napovedovanje kliničnega pomena polimorfizma Ala16Val. Za boljše napovedovnje bi bilo smiselno raziskavo ponoviti na veliko večjem številu preiskovancev. Šele takrat bi lahko rezultate prenesli na evropsko prebivalstvo. Ker je osteoporoza večfaktorska dedna bolezen, bi bilo smiselno raziskati še druge gene, ki sodelujejo pri oksidativnem stresu in njihove vplive na zmanjšanje mineralne kostne gostote oziroma povečano stopnjo kostne remodelacije. Prav tako bi bilo smiselno pri raziskavi upoštevati negenske dejavnike, kot sta način življenja in vpliv življenjskega okolja.

6. LITERATURA

1. Ozgocmen S, Huseyin K, Fadillioglu E, Aydogan Rabia, Yilmaz Z: Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *J Molecular and Cellular Biochemistry*, 2007; 295: 45-52
2. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y: Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *J Endocr Rev.*, 2008; 29(4):403-40
3. Boyce BF, Xing L: Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *J Arthritis research & therapy*, 2007; 9 Suppl 1:S1
4. Metcalfe D: The pathophysiology of osteoporotic hip fracture. *J McGill journal of medicine : MJM : an international forum for the advancement of medical sciences by students*, 2008; 11(1):51-7
5. Shen Y, Zhang ZM, Jiang SD, Jiang LS, Dai LY: Postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis show different ultrastructural characteristics of trabecular bone of the femoral head. *J BMC Musculoskelet Disord.*, 2009;10:35
6. Kamel HK, O'Connell MB: Therapeutic options in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy*, 2006; Vol. 12, No. 6, S-a
7. Raisz LG: Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J The Journal of clinical investigation*, 2005; 115(12):3318-25
8. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S: Total oxidative/ anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *J Rheumatol Int*, 2008; 28: 317-321
9. <http://www.umich.edu/news/Releases/2005/Feb05/img/bone.jpg>
10. <http://www.jacn.org/cgi/content-nw/full/19/6/715/F1>
11. Zofková I.: Hormonal aspects of the muscle-bone unit. *J Physiological Research.*, 2008;57 Suppl 1:S159-69
12. Bergmann P, Body JJ, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer JP, Goemaere S, Kaufman JM, Reginster JY, Gangji V: Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *J Int J Clin Pract.*, 2009; 63(1):19-26.
13. http://z.hubpages.com/u/298167_f260.jpg

14. Banfi G, Iorio EL, Corsi MM: Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *J Clin Chem Lab Med*, 2008; 46(11): 1550-1555
15. Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan G, Prabhu V, Subramaniam V, Jagadeesan A, Narasimhan S: Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats, *J Clinica Chimica Acta*, 2005; 360: 81-86
16. [PREZGODNJA MENOPA VZA: VZROKI, DIAGNOSTIKA IN ZDRAVLJENJE](#)
17. http://www.osteofoundation.org/images/osteoporosis-classification-nih-factsheets_r2i9.jpg
18. Seibel MJ: Biochemical Markers of Bone Turnover Part II: Clinical Applications in the Management of Osteoporosis. *J The Clinical biochemist. Reviews*, 2006; 27(3):123-38
19. Suzuki A, Sekiguchi S, Asano S, Itoh M.: Pharmacological topics of bone metabolism: recent advances in pharmacological management of osteoporosis. *J Pharmacol Sci.*, 2008;106(4):530-5
20. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ: Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *J Dynamic medicine : DM*, 2009; 13;8:1
21. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK: Role of oxidative stress in female reproduction. *J Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 2005; 3:28
22. Karihtala P, Soini Y: Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *J APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2007; 115(2):81-103
23. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *J The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007; 39(1):44-84
24. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *J Chemico-biological interactions*, 2006; 160(1):1-40
25. Hooeboom D, Burgering BMT: Should I stay or should I go: beta- catenin decides under stress. *J Biochimica et Biophysica Acta*, 2009; BBACAN-87699
26. Manolagas SC, Almeida M: Gone with the Wnts: beta- catenin, T- cell factor, Forkhead box O, and oxidative stress in age- dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *J Molecular Endocrinology*, 2007; 21(11): 2605,2614
27. Almeida M, Han L, Martin- Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC: Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta- catenin from T cell factor- to Forkhead Box O- mediated transcription. *J The journal of biological chemistry vol. 282*, 2007; NO.37: 27298- 27305

28. Sanchez- Rodriguez MA, Ruis- Ramos M, Correa- Munoz E, Mendoza- Nunez VM: Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *J BMC Musculoskelet Disorders*, 2007; 8: 124
29. Cengiz M, Ozaydin A, Ozkiloglu AC, Dedekarginoglu G: The investigation of GSTT1, GSTM1 and SOD polymorphism in bladder cancer patients. *J Int Urol Nephrol*, 2007; 39: 1043-1048
30. Nakao K, Isashiki Y, Sonoda S, Uchino E, Shimonagano Y, Sakamoto T: Nitric oxide synthase and superoxide dismutase gene polymorphisms in behcet disease. *J Ophthalmic molecular genetics*, 2007; 125: 246-251
31. Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Peters U, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang WY, Hayes RB: Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *J Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007; 16(8)
32. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Sod2>
33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=147460>
34. Tang ZH, Xiao P, Lei SF, Deng FY, Zhao LJ, Deng HY, Tan LJ, Shen H, Xiong DH, Recker RR, Deng HW: A Bivariate Whole-Genome Linkage Scan Suggests Several Shared Genomic Regions for Obesity and Osteoporosis. *J The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2007; 92(7):2751-7
35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=ad hoc_search&type=rs&rs=rs4880
36. Mak JCW, Ho SP, Yu WC, Choo KL, Chu CM, Yew WW, Lam WK; Chan- Yeung M: Polymorphisms and functional activity in superoxide dismutase and catalase genes in smokers with KOPD. *J Eur Respir*, 2007; 30: 684-690
37. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=334765>
38. http://biomed.lsu.edu/images/PCR_TPM.gif
39. http://www.ambion.com/tools/alignMap/alignMap.rb?mapViewerVersion=simpleViewer&viewerAxisEntity=C_8709053_10&viewerAxisEntityType=SNP+assay&species=Homo%20sapiens&chromosome=6&position1=160033862&position2=160033862&viewerZoomIn=true&MapViewerType=MapViewer&contentJsp=simpleAlignmentViewer&viewerBands=Ruler%2CSNP+assay%2CLocus+link%2CRefSeq%2CMRNA%2CDME+assay%2CGeneX+assay%2CRSS
40. www2.arnes.si/~mmlaka10/Clanki/MatBio.pdf
41. http://en.wikipedia.org/wiki/Hardy-Weinberg_law
42. <http://www.northern.wvnet.edu/~tdanford/bioc18/slide5.html>

43. <http://herkules.oulu.fi/isbn951425399X/html/graphic33.gif>

7. PRILOGA

7.1 PRILOGA 1: REZULTATI GENOTIPIZACIJE

zap_št	oznaka	genotip	oznaka g.	zap_št	oznaka	genotip	oznaka g.
1	opg	A/A	2	954	155Y	G/G	0
2	opg	G/G	0	955	156Y	A/A	2
3	opg	A/A	2	956	157Y	A/G	1
4	opg	A/G	1	957	158Y	A/A	2
5	opg	A/G	1	958	159Y	A/G	1
6	opg	A/A	2	959	160Y	A/A	2
7	opg	A/A	2	960	161Y	A/G	1
8	opg	G/G	0	961	162Y		
9	opg	G/G	0	962	163Y	G/G	0
10	opg	A/G	1	963	164Y	A/A	2
11	opg	A/G	1	964	165Y	A/A	2
12	opg	G/G	0	965	166Y	A/A	2
13	opg	A/A	2	966	167Y	A/G	1
14	opg	A/A	2	967	171Y	A/G	1
15	opg	G/G	0	968	172Y	A/G	1
16	opg	G/G	0	969	173Y	A/G	1
17	opg	A/A	2	970	174Y	A/G	1
18	opg	A/G	1	971	175Y	A/A	2
19	opg	A/A	2	972	176Y		
20	opg	A/A	2	973	177Y	A/G	1
21	opg	A/A	2	974	178Y	G/G	0
22	opg	G/G	0	975	179Y	A/G	1
23	opg	G/G	0	976	180Y	A/G	1
24	opg	A/G	1	977	181Y	A/A	2
25	opg	G/G	0	978	182Y	A/G	1
26	opg	A/A	2	979	183Y	A/G	1
27	opg	A/G	1	980	184Y	A/G	1
28	opg	A/G	1	981	185Y	A/G	1
29	opg	G/G	0	982	186Y	G/G	0
30	opg	G/G	0	983	187Y	A/G	1
31	opg	A/G	1	984	188Y	A/G	1
32	opg	A/G	1	985	229Y	G/G	0
33	opg	A/G	1	986	230Y	G/G	0
34	opg	A/G	1	987	231Y	G/G	0
35	opg	A/G	1	988	232Y	G/G	0
36	opg	A/G	1	989	233Y	A/A	2
37	opg	A/A	2	990	234Y	G/G	0
38	opg	A/G	1	991	235Y	A/G	1

39	opg	A/A	2	992	236Y	A/G	1
40	opg	G/G	0	993	237Y	A/G	1
41	opg	G/G	0	994	238Y	A/G	1
42	opg	A/G	1	995	239Y	G/G	0
43	opg	A/G	1	996	240Y	A/G	1
44	opg	G/G	0	997	241Y	A/A	2
45	opg	A/A	2	998	242Y	A/A	2
46	opg	A/G	1	999	243Y	A/A	2
47	opg	A/A	2	1000	244Y	G/G	0
48	opg	A/G	1	1001	245Y	A/G	1
49	opg	A/G	1	1002	246Y	G/G	0
50	opg	A/A	2	1003	247Y	G/G	0
51	opg	A/G	1	1004	248Y	A/G	1
52	opg			1005	249Y	A/G	1
53	opg	G/G	0	1006	250Y	A/A	2
54	opg	A/G	1	1007	251Y	G/G	0
55	opg	G/G	0	1008	252Y	A/G	1
56	opg	G/G	0	1009	253Y	G/G	0
57	opg			1010	254Y	A/A	2
58	opg	A/A	2	1011	255Y	A/G	1
59	opg	G/G	0	1012	256Y	G/G	0
60	opg	G/G	0	1013	257Y	A/A	2
61	opg	A/G	1	1014	258Y	A/G	1
62	opg	A/G	1	1015	259Y	A/A	2
63	opg	A/A	2	1016	260Y	G/G	0
64	opg	A/G	1	1017	261Y	A/G	1
65	opg	G/G	0	1018	262Y		
66	opg	A/A	2	1019	263Y	A/G	1
67	opg	A/A	2	1020	264Y	A/A	2
68	opg	A/A	2	1021	265Y	G/G	0
69	opg	A/A	2	1022	266Y	A/G	1
70	opg	A/A	2	1023	267Y	A/G	1
71	opg			1024	268y		
72	opg			1025	269y	G/G	0
73	opg	A/A	2	1026	270Y		
74	opg			1027	271Y	A/G	1
75	opg	G/G	0	1028	272Y	G/G	0
76	opg	G/G	0	1029	273Y	A/G	1
77	opg	A/G	1	1030	274Y	A/G	1
78	opg			1031	275Y		
79	opg	G/G	0	1032	276Y	G/G	0
80	opg	G/G	0	1033	277Y		
81	opg	G/G	0	1034	278Y		
82	opg	A/A	2	1035	279Y	A/A	2

83	opg	G/G	0	1036	280Y	G/G	0
84	opg	G/G	0	1037	281Y	G/G	0
85	opg	A/A	2	1038	282Y	G/G	0
86	opg	A/G	1	1039	283Y	G/G	0
87	opg	G/G	0	1040	284Y	G/G	0
88	opg	A/G	1	1041	285Y	A/G	1
89	opg	A/A	2	1042	286Y	G/G	0
90	opg	A/G	1	1043	287Y	A/A	2
91	opg	G/G	0	1044	288Y	G/G	0
92	opg	A/G	1	1045	289Y		
93	opg	A/G	1	1046	290Y	A/A	2
94	opg	A/A	2	1047	291Y		
95	opg	A/A	2	1048	292Y		
96	opg	A/G	1	1049	293Y	A/A	2
97	opg	A/G	1	1050	294Y	A/A	2
98	opg	A/G	1	1051	295Y		
99	opg	A/G	1	1052	296Y		
100	opg	A/G	1	1053	297Y		
101	opg	G/G	0	1054	298Y	A/G	1
102	opg	A/A	2	1055	299Y	A/G	1
103	opg	A/G	1	1056	300Y	G/G	0
104	opg	A/A	2	1057	301Y	G/G	0
105	opg	A/A	2	1058	302Y	A/G	1
106	opg	A/G	1	1059	303Y	A/G	1
107	opg	A/A	2	1060	304Y	A/A	2
108	opg	G/G	0	1061	305Y	A/A	2
109	opg			1062	306Y	A/A	2
110	opg	G/G	0	1063	307Y		
111	opg	A/A	2	1064	308Y		
112	opg	G/G	0	1065	309Y	A/G	1
113	opg	A/A	2	1066	310Y		
114	opg			1067	311Y	A/A	2
115	opg			1068	312Y		
116	opg			1069	313Y	A/A	2
117	opg			1070	314Y	A/A	2
587	ralo	A/G	1	1071	315Y	A/G	1
588	ralo	A/G	1	1072	316Y	G/G	0
589	ralo	G/G	0	1073	317Y	A/A	2
590	ralo	A/G	1	1074	318Y		
591	ralo	A/A	2	1075	320Y	A/G	1
592	ralo	A/G	1	1076	321Y	G/G	0
593	ralo	G/G	0	1077	322Y	A/G	1
594	ralo	A/A	2	1078	323Y	A/A	2
595	ralo	A/G	1	1079	324Y	G/G	0

596	ralo	A/G	1	1080	325Y	A/G	1	
597	ralo	G/G	0	1081	326Y			
598	ralo	A/G	1	1082	327Y			
599	ralo	A/G	1	1083	328Y	G/G	0	
600	ralo	A/A	2	1084	329Y	A/G	1	
601	ralo	A/G	1	1085	330Y	A/G	1	
602	ralo	A/A	2	1086	331Y	A/G	1	
603	ralo	A/G	1	1087	332Y	G/G	0	
604	ralo	A/G	1	1088	333Y	A/A	2	
605	ralo	A/G	1	1089	334Y			
606	ralo			1090	335Y			
607	ralo	A/A	2	1091	336Y	A/A	2	
608	ralo	A/G	1	1092	337Y	G/G	0	
609	ralo	A/G	1	1093	338Y	A/G	1	
610	ralo	A/A	2	1094	339Y	G/G	0	
611	ralo	A/A	2	1095	340Y	A/G	1	
612	ralo	A/G	1	1096	341Y	G/G	0	
613	ralo	A/G		1	1097	342Y	A/G	1
614	ralo	A/A	2	1098	343Y	G/G	0	
615	ralo	A/G	1	1099	344Y	A/G	1	
616	ralo	G/G	0	1100	345Y	A/A	2	
617	ralo	G/G	0	1101	346Y	G/G	0	
618	ralo			1102	347Y	G/G	0	
619	ralo	G/G	0	1103	348Y	A/A	2	
620	ralo	A/G	1	1104	349Y	G/G	0	
621	ralo	A/G	1	1105	350Y	A/G	1	
622	ralo	A/G	1	1106	351Y	A/G	1	
623	ralo	G/G	0	1107	352Y	A/G	1	
624	ralo	G/G	0	1108	353Y	A/G	1	
625	ralo	A/G	1	1109	354Y	A/G	1	
626	ralo	A/G	1	1110	355Y	G/G	0	
627	ralo			1111	356Y	A/G	1	
628	ralo	A/A	2	1112	357Y	A/G	1	
629	ralo	A/A	2	1113	358Y	G/G	0	
630	ralo	A/G	1	1114	359Y	A/G	1	
631	ralo	G/G	0	1115	360Y	A/A	2	
632	ralo	A/A	2	1116	361Y	A/G	1	
633	ralo	A/G	1	1117	362Y	G/G	0	
634	ralo	A/A	2	1118	363Y	A/G	1	
635	ralo	G/G	0	1119	364Y	A/G	1	
636	ralo	A/A	2	1120	365Y	A/A	2	
637	ralo	A/A	2	1121	366Y	A/G	1	
638	ralo	A/G	1	1122	367Y	G/G	0	
639	ralo	A/G	1	1123	368Y	A/A	2	

640	ralo	A/G	1	1124	369Y	A/G	1
659	ralo	A/G	1	1125	370Y	G/G	0
660	ralo	G/G	0	1126	371Y	G/G	0
661	ralo	A/G	1	1127	372Y	A/G	1
662	ralo	A/A	2	1128	373Y	A/G	1
663	ralo	G/G	0	1129	374Y	G/G	0
664	ralo	G/G	0	1130	375Y	A/G	1
665	ralo	A/G	1	1131	376Y	A/A	2
666	ralo	A/A	2	1132	377Y	A/A	2
667	ralo	A/G	1	1133	378Y	G/G	0
666	1Y	A/G	1	1134	379Y	A/G	1
667	2Y	A/G	1	1135	380Y	A/A	2
668	3Y	A/G	1	1136	381Y	A/A	2
669	4Y	A/G	1	1137	382Y	G/G	0
670	5Y	A/A	2	1138	383Y	G/G	0
671	6Y	A/G	1	1139	384Y	A/A	2
672	7Y	A/A	2	1140	385Y	A/A	2
673	8Y	A/G	1	1141	386Y	A/A	2
674	9Y	A/G	1	1142	387Y	A/A	2
675	10Y	A/A	2	1143	388Y	A/A	2
676	11Y	G/G	0	1144	389Y	A/G	1
677	12Y	G/G	0	1145	390Y	A/G	1
678	13Y	G/G	0	1146	391Y	G/G	0
679	14Y	G/G	0	1147	118	A/A	2
680	15Y	A/G	1	1148	319Y	A/A	2
681	16Y	G/G	0	1149	392Y	G/G	0
682	17Y	G/G	0	1150	393Y	A/G	1
683	18Y	G/G	0	100f	Fosamax	A/A	2
684	19Y	A/G	1	101f	Fosamax	A/A	2
685	20Y	A/G	1	102f	Fosamax		
686	21Y	A/G	1	103f	Fosamax	A/A	2
687	22Y	A/G	1	106f	Fosamax	A/G	1
688	23Y	A/G	1	108f	Fosamax	A/G	1
689	24Y	A/G	1	109f	Fosamax		
690	25Y	A/G	1	110f	Fosamax	A/G	1
691	26Y	A/A	2	111f	Fosamax	G/G	0
692	27Y	A/G	1	112f	Fosamax	A/G	1
693	28Y	A/G	1	113f	Fosamax		
694	29Y	A/G	1	114		G/G	0
695	30Y	A/G	1	115f	Fosamax	A/G	1
696	31Y	G/G	0	117f	Fosamax	A/G	1
697	32Y	A/G	1	118f	Fosamax	A/G	1
698	33Y	A/G	1	119f	Fosamax	A/G	1
699	34Y	A/G	1	120f	Fosamax	G/G	0

700	35Y	A/A	2	121f	Fosamax	G/G	0
701	36Y	A/A	2	122f	Fosamax	G/G	0
702	37Y	A/G	1	123f	Fosamax	A/G	1
703	38Y	A/G	1	124f	Fosamax	A/G	1
704	39Y	A/G	1	125f	Fosamax	A/G	1
705	40Y	A/G	1	126f	Fosamax	A/G	1
706	41Y	G/G	0	127f		A/A	2
707	42Y	A/G	1	130f	Fosamax	G/G	0
708	43Y	A/G	1	131f	Fosamax	G/G	0
709	44Y	A/A	2	134f	Fosamax	G/G	0
710	45Y	A/G	1	135f	Fosamax	G/G	0
711	46Y	G/G	0	136f	Fosamax	A/A	2
712	47Y	A/G	1	137f		A/A	2
713	48Y	A/A	2	138f	Fosamax	A/G	1
714	49Y	A/G	1	139f	Fosamax	A/A	2
715	50Y	A/G	1	140f	Fosamax	A/G	1
716	51Y	A/G	1	141f	Fosamax	A/G	1
717	52Y	A/G	1	142f	Fosamax	A/G	1
718	53Y			146f		G/G	0
719	54Y	A/G	1	148f	Fosamax	A/A	2
720	55Y	G/G	0	149f	Fosamax	A/A	2
721	56Y	A/A	2	155f	Fosamax	G/G	0
722	57Y	A/A	2	156f	Fosamax	A/G	1
723	58Y	A/G	1	158f	Fosamax	G/G	0
724	59Y	A/A	2	159f	Fosamax	G/G	0
725	60Y	G/G	0	160f	Fosamax	A/G	1
726	61Y	G/G	0	161f	Fosamax	A/G	1
727	62Y	A/A	2	163f	Fosamax	G/G	0
728	63Y	A/A	2	167f	Fosamax	A/G	1
729	64Y	A/G	1	168f	Fosamax	A/G	1
730	65Y	G/G	0	169f		A/A	2
731	66Y	G/G	0	170f	Fosamax	A/G	1
732	67Y	A/G	1	171f			
733	68Y	A/A	2	174f	Fosamax	A/A	2
734	69Y	A/G	1	175f	Fosamax	A/G	1
735	70Y	A/G	1	176f	Fosamax	A/G	1
736	71Y	A/G	1	93f	Fosamax	A/G	1
737	72Y	G/G	0	94f	Fosamax	A/G	1
738	73Y	G/G	0	95f	Fosamax	A/A	2
739	74Y	A/G	1	96f	Fosamax	G/G	0
740	75Y	A/G	1	97f	Fosamax	G/G	0
741	76Y	A/G	1	98f	Fosamax	A/G	1
742	77Y	G/G	0	99f		A/G	1
743	78Y	A/G	1	1002Z	ZIT	G/G	0

744	79Y	A/G	1	1003Z	ZIT	G/G	0
745	80Y	A/A	2	1004Z	ZIT	A/G	1
746	81Y	G/G	0	1005Z	ZIT	A/G	1
747	82Y	A/G	1	1006Z	ZIT	A/A	2
748	83Y	A/G	1	1007Z	ZIT	A/A	2
749	84Y	A/G	1	1008Z	ZIT	A/G	1
750	85Y	A/A	2	1009Z	ZIT	G/G	0
751	86Y	A/G	1	1010Z	ZIT	A/G	1
752	87Y	G/G	0	1011Z	ZIT	A/G	1
753	89Y	A/G	1	1012Z	ZIT	A/G	1
754	90Y	G/G	0	1021Z	ZIT	A/A	2
755	91Y	A/G	1	1028Z	ZIT	A/G	1
756	92Y	A/G	1	1030Z	ZIT	A/G	1
757	93Y			1031Z	ZIT	G/G	0
758	94Y	A/G	1	1032Z	ZIT	G/G	0
759	95Y			1033Z	ZIT	A/G	1
760	96Y	A/G	1	1034Z	ZIT	G/G	0
761	97Y	G/G	0	1035Z	ZIT	A/G	1
762	98Y	A/G	1	1036Z	ZIT	G/G	0
763	99Y			1037Z	ZIT	A/G	1
764	100Y			1038Z	ZIT	A/G	1
765	101Y	G/G	0	1039Z	ZIT	G/G	0
766	102Y	A/G	1	1040Z	ZIT		
767	103Y	A/G	1	1041Z	ZIT		
768	104Y			1042Z	ZIT	A/G	1
769	105Y			1043Z	ZIT	A/G	1
770	106Y			1045Z	ZIT	A/G	1
771	107Y			1049Z	ZIT	A/A	2
772	108Y			1051Z	ZIT	A/G	1
773	109Y			1052Z	ZIT	G/G	0
774	110Y			1053Z	ZIT	G/G	0
775	111Y	A/G	1	1054Z	ZIT	A/G	1
776	112Y			1055Z	ZIT	A/G	1
777	113Y			1056Z	ZIT	A/G	1
778	114Y			1057Z	ZIT	G/G	0
779	189Y			1058Z	ZIT	A/G	1
780	190Y			1059Z	ZIT	A/G	1
781	191Y			1060Z	ZIT	A/A	2
782	192Y			1061Z	ZIT	G/G	0
783	193Y	G/G	0	1062Z	ZIT	A/G	1
784	194Y	A/G	1	1064Z	ZIT		
785	195Y	A/G	1	1065Z	ZIT	A/G	1
786	196Y			1066Z	ZIT	A/A	2
787	197Y			1067Z	ZIT	A/G	1

788	198Y			1068Z	ZIT	A/A	2
789	199Y			1069Z	ZIT	G/G	0
790	200Y			1070Z	ZIT	A/A	2
791	201Y			1071Z	ZIT	A/G	1
792	202Y	A/A	2	1072Z	ZIT	A/A	2
793	203Y			1074Z	ZIT	G/G	0
794	204Y	A/G	1	1075Z	ZIT	A/G	1
795	205Y	A/G	1	1076Z	ZIT	A/G	1
796	206Y			1077Z	ZIT	A/A	2
797	207Y			1078Z	ZIT	A/G	1
798	208Y	A/A	2	1079Z	ZIT	G/G	0
799	209Y	G/G	0	1081Z	ZIT	A/G	1
800	210Y			1082Z	ZIT	A/A	2
801	211Y	A/G	1	1083Z	ZIT	G/G	0
802	212Y	A/G	1	1085Z	ZIT	A/G	1
803	213Y			1087Z	ZIT	A/G	1
804	214Y	G/G	0	1088Z	ZIT	A/G	1
805	215Y			1089Z	ZIT	A/A	2
806	216Y	G/G	0	1090Z	ZIT	G/G	0
807	217Y	A/G	1	1091Z	ZIT	A/G	1
808	219Y	A/G	1	1092Z	ZIT	G/G	0
809	220Y	G/G	0	1093Z	ZIT	G/G	0
810	218Y	A/G	1	1094Z	ZIT	A/G	1
811	221Y	A/G	1	1095Z	ZIT	G/G	0
812	222Y	A/G	1	1097Z	ZIT	A/G	1
813	223Y	A/A	2	1098Z	ZIT	G/G	0
814	224Y	A/G	1	1100Z	ZIT	G/G	0
815	225Y	A/A	2	1101Z	ZIT	A/G	1
816	226Y	G/G	0	1102Z	ZIT	A/G	1
817	227Y	G/G	0	1103Z	ZIT	A/G	1
818	228Y	A/G	1	1104Z	ZIT	G/G	0
819	229Y	A/G	1	1105Z	ZIT	G/G	0
820	230Y	G/G	0	1106Z	ZIT	A/G	1
821	231Y			1107Z	ZIT	A/G	1
822	232Y	A/G	1	1108Z	ZIT	A/A	2
823	233Y			1110Z	ZIT	A/G	1
824	234Y	A/A	2				
825	168Y	A/G	1				
826	169Y	G/G	0				
827	170Y	A/A	2				
913	115Y	A/G	1				
914	116Y						
915	117Y	A/G	1				
916	118Y	A/G	1				

917	119Y		
918	120Y	A/G	1
919	121Y	A/G	1
920	122Y	G/G	0
921	123Y	A/G	1
922	124Y		
923	125Y		
924	126Y	G/G	0
925	127Y	A/A	2
926	128Y		
927	129Y		
928	130Y	A/G	1
929	131Y	A/G	1
930	132Y		
931	88Y		
932	133Y	A/G	1
933	134Y	G/G	0
934	135Y	A/G	1
935	136Y	A/G	1
936	137Y	A/G	1
937	138Y	A/A	2
938	139Y		
939	140Y		
940	141Y	A/G	1
941	142Y	G/G	0
942	143Y	A/A	2
943	144Y	A/A	2
944	145Y	G/G	0
945	146Y	A/A	2
946	147Y	A/G	1
947	148Y	A/A	2
948	149Y	G/G	0
949	150Y	A/A	2
950	151Y	G/G	0
951	152Y	A/G	1
952	153Y	G/G	0
953	154Y	G/G	0

Razpredelnica 12: Zbrani genotipi za posamezne vzorce. Genotip G/G je označen z 0, genotip A/G je označen z 1 in genotip A/A je označen z 2.

7.2 PRILOGA 2: NORMALNOST PORAZDELITVE SPREMENLJIVK

	VSI	MOŠKI	ŽENSKE	ŽENSKE PRED MENO	POMENOPAVZNE ŽENSKE
ITM	ln	√	Nenormalna p.	√	Nenormalna p.
BMDfn	ln	√	√	√	ln
t _{fn}	√	√	√	√	√
BMDtot	ln	√	√	√	ln
T _{tot}	√	√	√	√	T _{tot}
BMDls	ln	√	ln	√	ln
t _{ls}	√	√	√	√	√
RANKL	Nenormalna p.	√	Nenormalna p.	Nenormalna p.	Nenormalna p.
ALP	√	√	√		√
pOC	ln	√	ln	√	ln
CTX	√	√	√	√	√
PTH			√	√	√
sOPG		√		√	√
sBALP	√		√		√
Crosstabs	√		√		√
DPD	√		√		√
BALP ₁	√		√	√	√
OC ₁	√		√		√
Cross ₁	√		√		√
CTX ₁	√		√	√	√
BMDls ₁	√		√	√	√
BMDfn ₁	√		√	√	√
BMDtot ₁	√		√	√	√
dBMDls	√		√	√	√
dBMDfn	√		√	√	√
dBMDtot				√	
dDPD	√		√	√	√
dCTX	√		√	√	√
dCross	√		√	√	√
dBALP				√	

Razpredelnica 13: Prikaz porazdelitve spremenljivk po skupinah (√ : označuje normalno porazdelitev; prazno polje pomeni, da ni bilo dovolj podatkov za izračun).

	ŽENSKE < 50	ŽENSKE 50- 59	ŽENSKE 60- 69	ŽENSKE >69
ITM	√	ln	√	√
BMDfn	√	√	√	√
t _{fn}	√	√	√	√
BMDtot	√	√	√	√
T _{tot}	√	√	√	√
BMDls	√	√	ln	√
t _{ls}	√	√	√	√
RANKL	Nenormalna p.	Nenormalna p.	ln	√
ALP		√	√	√
pOC	√	ln	ln	√
CTX	√	√	√	√
PTH		√	√	√
sOPG	√	√	√	√
sBALP	√	√	√	√
Crosstabs		√	√	
DPD		√	√	√
BALP_1	√	√	√	√
OC_1	√	√		
Cross_1		√	√	
CTX_1	√	√	√	√
BMDls_1	√	√	√	√
BMDfn_1	√	√		√
BMDtot_1	√	√		√
dBMDls		√		√
dBMDfn	√	√		√
dBMDtot		√		√
dDPD		√		√
dCTX	√	√		√
dCross		√		√
dBALP	√			√

Razpredelnica 14: Prikaz porazdelitve spremenljivk za ženske (√ : označuje normalno porazdelitev; prazno polje pomeni, da ni bilo dovolj podatkov za izračun).

