

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA KURENT

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA KURENT

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV -1227C>T IN -1734C>T V
PROMOTORJU GENA ZA PLEIOTROPIN Z MINERALNO KOSTNO
GOSTOTO IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS -1227C>T AND -1734C>T IN
PLEIOTROPHIN GENE PROMOTER WITH BONE MINERAL
DENSITY AND BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE TURNOVER**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljal na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm. Meritve mineralne kostne gostote so opravili na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in Mariboru ter na Kliniki za travmatologijo v Splošni bolnišnici Celje. Meritve koncentracije biokemijskih kazalcev kostne premene so opravili na Kliniki za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorici asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, mag. farm. za mnoge koristne nasvete, strokovno pomoč pri delu v laboratoriju, pisanju diplomske naloge, nove izkušnje in izkazano zaupanje. Za koristne namige in praktičen nasvete bi se rad zahvalil tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za Farmacijo.

Velika zahvala gre tudi moji družini in najbližjim, ki so me podpirali in spodbujali tekom celotnega študija.

Izjava

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

Ljubljana, junij 2010

Luka Kurent

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	i
POVZETEK	iii
SEZNAM OKRAJŠAV	iv
KAZALO SLIK.....	v
KAZALO PREGLEDNIC.....	vi
1 UVOD.....	1
1.1 ZGRADBA KOSTNINE	1
1.2 KOSTNA PREMENA	1
1.3 OSTEOPOROZA.....	2
1.3.1 PREVALENCA OSTEOPOROZE IN NJENIH ZAPLETOV	3
1.3.2 RAZVOJ IN NASTANEK OSTEOPOROZE	3
1.3.3 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OSTEOPOROZO.....	4
1.3.4 DIAGNOSTIKA OSTEOPOROZE.....	4
1.3.5 ZDRAVLJENJE OSTEOPOROZE	8
1.3.6 GENETIKA IN OSTEOPOROZA.....	10
1.4 PLEIOTROPIN.....	12
1.4.1 STRUKTURA PLEIOTROPINA IN NJEGOVA VLOGA V TELESU.....	12
1.4.2 GEN ZA PTN.....	13
1.4.3 PTN SIGNALNA POT	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 PREISKOVANCI	17
3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN VZORČNIH DNA.....	18
3.2.1 SPEKTROFOTOMETER NanoDrop® ND-1000	19
3.2.2 MATERIALI IN OPREMA	19
3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	20
3.3.1 PCR V REALNEM ČASU	21
3.4.1 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMOV -1734C>T IN -1227C>T V PROMOTORJU GENA ZA PLEIOTROPIN.....	23
3.5 STATISTIČNE METODE	25

4 REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1 IZVEDBA GENOTIPIZACIJE	26
4.2 UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMOV	28
4.3 IZRAČUN IN ANALIZA DIPLOTIPOV	29
4.4 POVEZANOST POLIMORFIZMOV -1734C>T IN -1227C>T TER NJUNIH DIPLOTIPOV Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE	30
4.4.1 PREMENOPAVZNE PREISKOVANKE	32
4.4.2 POMENOPAVZNE PREISKOVANKE	35
4.4.3 MOŠKI	46
4.4.4 ZDRAVLJENJE Z ALENDRONATOM	49
4.4.5 ZDRAVLJENJE Z RALOKSIFENOM	52
4.4.6 SKUPINA ZLOMI	55
4.5 MOŽNA FUNKCIJSKA VLOGA POLIMORFIZMOV V REGULACIJI IZRAŽANJA GENA ZA PLEIOTROPIN	57
5 SKLEP	59
6 LITERATURA	61
7 PRILOGE	64

POVZETEK

Osteoporoza je zelo pogosta presnovna bolezen kosti, do katere pride zaradi porušenega ravnovesja med kostno razgradnjo in kostno tvorbo. Znano je, da pri izražanju osteoporoznega fenotipa sodelujejo številni geni z majhnim individualnim vplivom. Gen za pleiotropin je nedavno odkrit kandidatni gen, pri katerem so ugotovili, da pospešuje proliferacijo in diferenciacijo osteoblastov ter ima pri miših vlogo v kostni tvorbi. V vsegenomski študiji so pokazali tudi, da je izražanje tega gena zmanjšano pri osteoporoznih bolnikih.

Namen našega dela je bil pri 897 preiskovancih proučiti pogostost in povezanost polimorfizmov -1734C>T in -1227C>T ter njunih diplotipov v promotorju gena za pleiotropin z mineralno kostno gostoto in biokemijskimi označevalci kostne premene. Prav tako smo poskušali proučiti vpliv teh dveh polimorfizmov in njunih diplotipov na odzivnost zdravljenja z alendronatom in raloksifenom ter vpliv na tveganje za zlom kolka. Genotipizacijo smo pri vseh preiskovancih izvedli z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času s pomočjo sond TaqMan[®] ter izmerili mineralno kostno gostoto (MKG) in biokemijske kazalce kostne premene. Polimorfizem -1734C>T je povezan z MKG vratu stegenice pri premenopavznih preiskovankah ($p=0,048$) ter s koncentracijo osteokalcina pri pomenopavznih preiskovankah ($p=0,041$). Za polimorfizem -1227C>T smo dokazali njegovo poveznost z MKG pri zdravih pomenopavznih preiskovankah ($p=0,016$) in njegov vpliv na povečanje odzivnosti zdravljenja z alendronatom ($p=0,020$). Nadalje smo ugotovili povezanost diplotipa TC z MKG vratu stegenice pri premenopavznih preiskovankah ($p=0,048$) ter s koncentracijo osteokalcina pri zdravih pomenopavznih preiskovankah ($p=0,041$). Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah smo pokazali tudi povezanost diplotipa CT z MKG ledvenih vretenc ($p=0,012$). Ugotovili smo tudi vpliv diplotipa CT na povečanje odzivnosti zdravljenja z alendronatom ($p=0,020$). V skupini pomenopavznih preiskovank in zdravih pomenopavznih preiskovank smo dokazali povezavo diplotipa CC na tveganje za zlom kolka.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da sta preučevana polimorfizma ter njuna diplotipa uporabna kot genetska kazalca tveganja za razvoj osteoporoze, saj bi tako lahko prepoznali bolj ogrožene posameznike, še preden bi prišlo do prevelike izgube kostne mase in zloma ter osteoporozne bolnike, ki bi se bolje odzivali na zdravljenje z določenim zdravilom.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALP	alkalna fosfataza
BALP	kostna alkalna fosfataza
Bp	bazni par
CTX	C - terminalni telopeptid prokolagena tipa I
DXA	dvoenergijska rentgenska absorpciometrija
EIA	encimski imunski test
ELISA	encimsko-immunski test na trdnem nosilcu
IL	interlevkin
IRMA	imunoradiometrični test
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči faktor
MKG	mineralna kostna gostota
NTX	N - terminalni telopeptid prokolagena tipa I
OC	osteokalcin
OPG	osteoprotegerin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PTN	pleiotropin
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B
RIA	radioimunski test
RPTP	transmembranski protein tirozin fosfatadni receptor
TNF	dejavnik tumorske nekroze
Wnt	wingless in Int signalna pot

KAZALO SLIK

Slika 1: Kazalci kostne razgradnje, ki nastanejo po razgradnji kostnega kolagena tipa I...	7
Slika 2: Zgradba prekursorja pleiotropina.....	12
Slika 3: Različne vloge PTN v telesu.	13
Slika 4: PTN signalna pot in njena povezava z Wnt signalno potjo.	15
Slika 5: Meritev koncentracije DNA v vzorčni raztopini s spektrofotometrom NanoDrop® ND-1000.....	18
Slika 6: Shema poteka PCR.....	20
Slika 7: Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s hidrolizirajočimi sondami.	22
Slika 8: Rezultati in razpršeni prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan®	27

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Dejavniki tveganja za osteoporozni zlom.	4
Preglednica II: Najbolj proučevani kandidani geni pri osteoporozi (18)	11
Preglednica III: Razdelitev preiskovancev v skupine in podskupine.	17
Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje.	23
Preglednica V: Pogoji za izvedbo reakcije PCR v realnem času.	24
Preglednica VI: Povezava med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA.	26
Preglednica VII: Frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem -1734C>T v proučevanih skupinah.	28
Preglednica VIII: Frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem -1227C>T v proučevanih skupinah.	28
Preglednica IX: Frekvence izračunanih diplotipov (TT, TC, CT, CC).	29
Preglednica X: Vrednosti parametrov vezavnega neravnovesja.	30
Preglednica XI: Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov v skupini premenopavznih in pomenopavznih preiskovank ter moških preiskovancev.	31
Preglednica XII: Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov v skupini osteoporoznih bolnic, ki so se zdravile z alendronatom in raloksifenom ter skupini presikosvancev z osteoartrozo in osteoporozo z zlomom kolka.	31
Preglednica XIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1734C>T	32
Preglednica XIV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1227C>T	33
Preglednica XV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za diplotip TC	33
Preglednica XVI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za diplotip CT	34

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za diplotip CC	35
Preglednica XVIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1734C>T	36
Preglednica XIX: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1227C>T	36
Preglednica XX: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za diplotip TC	37
Preglednica XXI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za diplotip CT	37
Preglednica XXII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za diplotip CC	38
Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1734C>T	39
Preglednica XXIV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1227C>T	40
Preglednica XXV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za diplotip TC	41
Preglednica XXVI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za diplotip CT	42
Preglednica XXVII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za diplotip CC	43

Preglednica XXVIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1734C>T.....	44
Preglednica XXIX: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za POLIMORFIZEM -1227C>T	44
Preglednica XXX: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za diplotip TC	45
Preglednica XXXI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za diplotip CT	45
Preglednica XXXII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za diplotip CC	46
Preglednica XXXIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za polimorfizem -1734C>T	47
Preglednica XXXIV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za polimorfizem -1227C>T	47
Preglednica XXXV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za diplotip TC	48
Preglednica XXXVI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za diplotip CT	48
Preglednica XXXVII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za diplotip CC.....	49
Preglednica XXXVIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za polimorfizem -1734C>T	50
Preglednica XXXIX: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za polimorfizem -1227C>T	50

Preglednica XL: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za diplotip TC	51
Preglednica XLI: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za diplotip CT	51
Preglednica XLII: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za diplotip CC.....	52
Preglednica XLIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za polimorfizem -1734C>T	53
Preglednica XLIV: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za polimorfizem -1227C>T	54
Preglednica XLV: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za diplotip TC.....	54
Preglednica XLVI: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za diplotip CT	55
Preglednica XLVII: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za diplotip CC	55
Preglednica XLVIII: Rezultati χ^2 testa za polimorfizem -1734C>T in -1227C>T ter njune diplotipe (TC, CT in CC)	56
Preglednica XLIX: Razlike v vezavi in homologijo vezave TF glede na prisotnost nukleotida C oz. T na mestu -1734 v promotorju gena za PTN.....	57
Preglednica L: Razlike v vezavi in homologijo vezave TF glede na prisotnost nukleotida C oz. T na mestu -1227 v promotorju gena za PTN.	57

1 UVOD

Kosti imajo v telesu pomembno vlogo, saj so odgovorne za trdnost in rigidnost skeleta ter predstavljajo vir kalcija in ostalih mineralov v telesu.

1.1 ZGRADBA KOSTNINE

Ločimo trabekularno (gobasto) kostno tkivo, ki predstavlja 20 % kostne mase in kortikalno (kompaktno) kostno tkivo, ki predstavlja ostalih 80 % kostne mase. Gobasto kostno tkivo je bolj porozno in se večinoma nahaja v notranjosti kosti. Ima veliko površino in je metabolno bolj aktivno, zato je bolj dovzetno za izgubo kostne mase in zlome. Največ ga najdemo na koncih dolgih kosti in je prevladujoč tip kostnine v ploščatih kosteh. Kompaktno kostno tkivo ima večjo gostoto in obdaja gobasto tkivo. Nahaja se predvsem v osrednjem delu dolgih kosti (1).

Kostnino gradijo organski in mineralni del ter kostne celice. Organski del kostnine sestavljajo organski matriks, ki ga povečini tvorijo kolagenska vlakna ter osnovna substanca (iz proteoglikanov in hondroitin sulfata), anorganski del pa predstavlja kalcijev hidroksiapatit. Na celičnem nivoju je kostnina zgrajena iz treh tipov kostnih celic: osteoblastov, osteoklastov in osteocitov. Osteoblasti nastanejo iz osteoprogenitornih celic kostnega mozga in periosteuma. Izdelujejo kolagen in ostale kostne proteine. Pomembno vlogo imajo tudi pri poznejši mineralizaciji kostnine. Osteociti so osteoblasti, ki ostanejo ujeti v matriksu med procesom tvorbe kostnine. Med seboj komunicirajo po kostnih kanalčkih preko citoplazemskih procesov ter s tem pomagajo pri koordinaciji odziva na stresno obremenitev kosti. Osteoklasti so večjedrne celice, ki razgrajujejo kostnino. Nastajajo iz hematopoetskih celic s fuzijo prekurzorjev osteoklastov (1).

1.2 KOSTNA PREMENA

Kostna premena obsega razgradnjo kosti, ki ji sledi tvorba kosti. Pomembna je za obnavljanje poškodovane kostnine in pri adaptaciji na stresno obremenitev kosti. Kostna premena poteka v večih fazah (2,3):

1. Aktivacija: pod vplivom hormonov in citokinov mirujoči osteoblasti na površini kostnine spremenijo obliko (postanejo bolj okrogli) ter tako izpostavijo del kolagenskega matriksa. Izločajo tudi kolagenaze, ki omogočijo izpostavitv mineralov. Aktivacija se prične z osteoblastnim izločanjem proteinov M-CSF in RANKL, ki z vezavo na svoje receptorje na prekurzorjih osteoklastov, povzročita njihovo proliferacijo in privabljanje na mesta kostne razgradnje ter njihovo fuzijo do zrelih, večjedrnih osteoklastov.
2. Razgradnja: osteoklasti razgradijo kostnino tako, da na mesta razgradnje izločajo vodikove ione (protone). Pod njihovim vplivom se raztoplja hidroksiapatit, poleg tega s tem ustvarijo kisel medij za proteaze, ki razgradijo kostni matriks, tako da nastanejo Howshipove lakune.
3. Preobrat: v tej fazi osteoklaste nadomestijo enojedrne celice, ki zgladijo nastalo lakuno. Poteka nalaganje cementne substance (sestavljajo jo proteoglikani, glikoproteini, kislja fosfataza, zelo malo kolagena) v Howshipove lakune.
4. Tvorba kostnine: signal za začetek te faze naj bi regulirale celice faze preobrata. Osteoblasti se pritrdijo na razgrajeno površino in nato sintetizirajo osteoidni matriks ter tako zapolnijo Howshipove lakune. Nekaj dni zatem se začne mineralizacija, v kateri poteka nalaganje hidroksiapatita na organski matriks (predvsem na kolagenska vlakna tipa I). Po končani mineralizaciji osteoblasti postanejo mirujoči osteoblasti, vstopijo v apoptozo ali se diferencirajo do osteocitov.

1.3 OSTEOPOROZA

Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, ki jo označujeta zmanjšana količina kostne mase in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva. Oboje vodi do povečane lomljivosti kosti. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne kostne gostote (MKG). Po tej definiciji je osteoporoza opredeljena kot zmanjšanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso. Kadar je SD med 1 in 2,5 govorimo o osteopeniji (4).

1.3.1 PREVALENCA OSTEOPOROZE IN NJENIH ZAPLETOV

Osteoporoza je najpogostejša metabolna bolezen kosti. Ocenjujejo, da ima do 80. leta starosti osteoporozo vsaka tretja ženska oziroma vsak peti moški. Raziskava o osteoporozi v Sloveniji je pokazala, da je prevalenca osteoporoze pri ženskah nad 50. letom starosti 27,5 %, pri moških nad 60. letom starosti pa 14,6 % (5). Osteoporoza postaja zaradi njenih zapletov, predvsem osteoporoznih zlomov, eden od glavnih zdravstvenih problemov razvitih družb. Značilni osteoporozni zlomi so zlomi zapestja, vretenc in kolka, katerih pogostnost strmo narašča po 75. letu. Najpogostejši osteoporozni zlomi so zlomi vretenc, medtem ko so zlomi zapestja in kolka približno enako zastopani (6,7). Število osteoporotičnih zlomov je v vseh starostnih obdobjih vsaj enkrat večje pri ženskah kot pri moških, kar je do določene mere posledica njihove večje telesne mase, večjih kosti, odsotnosti naglega zmanjšanja endogenih spolnih hormonov, ki bi bilo analogno menopavzi ter krajše življenjske dobe (8). Smrtnost pri zlomu kolka je 10 do 20 odstotna, pri drugih pa so zlomi kolka povezani z dolgotrajno imobilizacijo in rehabilitacijo ter zmanjšano kakovostjo življenja (6,7).

1.3.2 RAZVOJ IN NASTANEK OSTEOPOROZE

Kostna masa je pri človeku največja v zgodnji odralsi dobi. Količina kortikalnega dela kosti se povečuje približno do 30. leta starosti, trabekularne kosti pa do 25. leta starosti. Maksimalna kostna masa je odvisna od genetskih in okoljskih dejavnikov (npr. prehrane, hormonskega stanja ter fizične aktivnosti). Ko dosežemo največjo kostno maso, se le-ta normalno zmanjšuje za 0,3 do 0,7 % letno, ne glede na spol (9,10).

Od 30. do 40. leta starosti sta procesa tvorbe in razgradnje kostnine uravnotežena, nato pa se začne fiziološko zmanjševanje kostne mase, ki traja do konca življenja. V zgodnji pomenopavzi (5 – 10 let) se pri ženskah zaradi naglega padca estrogenov izguba kostne mase izrazito poveča in znaša do 2 % letno v kortikalnih delih kosti in do 9 % pri trabekularni kostnini. Učinek estrogenov na kost je posreden, mediatorji so citokini. Zmanjšan nivo estrogenov vpliva na monocite in nekatere celice kostnega mozga tako, da se poveča sekrecija IL-1, IL-6 in TNF- α . Ti citokini stimulirajo osteoklaste.

Kompenzatorno se pojavi povečana osteoblastna aktivnost, vendar kompenzacija ni popolna, kar vodi v zmanjšanje kostne mase (9,10).

1.3.3 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OSTEOPOROZO

Osteoporoza je večfaktorska bolezen, na katero vplivajo genetski dejavniki in dejavniki okolja. Dejavniki tveganja, ki vplivajo na osteoporozni zlom, so navedeni v preglednici I (11).

Preglednica I: Dejavniki tveganja za osteoporozni zlom.

ženski spol	nizka mineralna kostna gostota	slab vid
zgodnja menopavza	razne bolezni (hipogonadizem, hipertiroza, hiperparatiroidizem, vnetje črevesne sluznice)	nevromuskularne motnje
starost	predhodni zlom	dolgotrajna imobilizacija
amenoreja	dolgotrajno jemaje zdravil (glukokortikoidi, antacidi, heparin, imunosupresivi)	škodljive navade in nepravilna prehrana (premajhen vnos kalcija, kajenje, prekomerno uživanje alkohola)
bela rasa	nizka telesna masa	pomanjkanje vitamina D
nezadostna in neprimerna telesna aktivnost	genetski dejavniki	

1.3.4 DIAGNOSTIKA OSTEOPOROZE

1.3.4.1 Merjenje mineralne kostne gostote

Danes so dostopne številne metode za določanje MKG perifernih delov skeleta, centralnega skeleta (ledvena vretenca) ali celotnega skeleta. Poznamo enoenergetsko absorpciometrijo (SXA), dvoenergetsko rentgensko absorpciometrijo (DXA), kvantitativno računalniško tomografijo ter ultrazvok - kvantitativno ultrasonografijo (12).

Dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (DXA) je metoda prvega izbora za diagnostiko in spremljanje zdravljenja osteoporoze. Pri tej metodi uporabimo snop žarkov dveh energij, ki ga usmerimo skozi preiskovani del telesa. Naprava posname preiskovano področje in izmeri atenuacijo vsake energije posebej ter nato izračuna količino kostnine. Merimo lahko maso in gostoto celotnega skeleta, ponavadi pa merimo maso in gostoto vratu stegenice in ledvenih vretenc. Sevanje, ki ga ob tem prejme pacient je zanemarljivo, zato lahko meritve ponavljamo. Metoda je natančna in zanesljiva (12).

Ultrazvok - kvantitativna ultrasonografija (QUS) je vedno bolj uporabljana metoda kot presejalni test za osteoporozo na primarnem nivoju. QUS omogoča pregled trabekularne kosti: petnice, pogačice in proksimalne falange prsta ter pregled kortikalnega dela kosti na sprednji tretjini tibije. Merimo oslabitev ultrazvočnega valovanja (BUA) in spremembo hitrosti ultrazvoka (SOS) pri prehodu skozi kost. Tako BUA kot SOS sta odvisna od MKG in sprememb v kostni mikroarhitekturi. Na osnovi sprememb BUA in SOS lahko napovemo tveganje za osteoporozne zlome. Kvantitativna ultrasonografija je enostavna, poceni in lahko dostopna presejalna metoda za osteoporozo. UZ preiskava žal ne omogoča spremljanja sprememb na kosti med zdravljenjem osteoporoze (12).

Napredovalo osteoporozo lahko diagnosticiramo tudi z *rentgenskim slikanjem* hrbtenice vendar šele tedaj, ko je kostna masa zmanjšana za več kot 30 % (12).

1.3.4.2 Merjenje koncentracije biokemijskih kazalcev kostne premene

Biokemijski kazalci kostne premene so encimski in ne-encimske peptidi, ki se izplavljajo v telesne tekočine ob procesih kostne tvorbe in razgradnje. Biokemijske označevalce kostne premene merimo predvsem z namenom vrednotenja učinkov zdravljenja, saj nam dajo informacijo o njegovi učinkovitosti po 3 - 6 mesecih, medtem ko spremembe v MKG zaznamo šele po enem letu ali več. V splošnem jih razdelimo na označevalce tvorbe in označevalce razgradnje kosti.

Biokemijski kazalci kostne tvorbe

Alkalna fosfataza (ALP) je membranski encim, ki je pomemben pri tvorbi osteoida in mineralizaciji kostnine. Aktivnost ALP v serumu je vsota aktivnosti različnih izoencimov ALP (jetrni, intestinalni, kostni, placentarni, vranični, ledvični). Pri odraslih z normalno jetrno funkcijo, predstavljata jetrni in kostni izoencim (BALP) vsak po 50 % celotne aktivnosti ALP. Znanih je več metod za ločevanje in določanje teh dveh izoencimov (toplotna denaturacija, elektroforeza, precipitacija, selektivna inhibicija), najbolj selektivne pa so imunokemijske metode (IRMA, EIA) (13).

Osteokalcin je protein, ki veže kalcij in olajša interakcijo s hidroksiapatitom. Od vitamina D odvisna sinteza poteka v osteoblastih, odontoblastih in hipertrofičnih hondrocitih. Njegova glavna naloga je mineralizacija kostnega tkiva. Deloma se izloča v sistemski

krvni obtok, kjer ga lahko določamo z imunokemijskimi metodami (IRMA, ELISA, RIA). Izmerjena koncentracija v serumu je sorazmerna s stopnjo kostne tvorbe (13).

Propeptida prokolagena tipa I (PINP, PICP) sta produkta posttranslacijske modifikacije prokolagena in nastaneta pri cepitvi propeptidov do kolagena. Določamo ju z imunokemijskima metodama (RIA, ELISA) v serumu (13).

Biokemijski kazalci kostne razgradnje

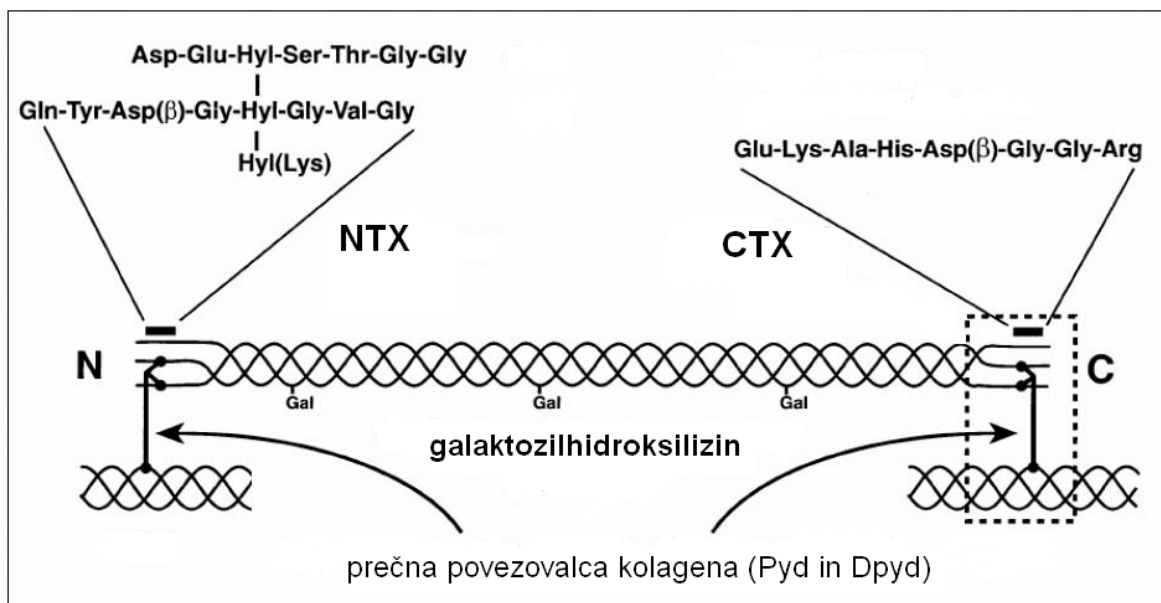
Hidroksiprolin nastaja posttranslacijsko pri hidroksilaciji prolina in predstavlja 12 – 14 % vseh kolagenskih aminokislin. Večina se ga razgradi v jetrih, nato pa se izloča v urin, kjer ga lahko določamo kolorimetrično ali s HPLC metodo. Veliko hidroksiprolina najdemo tudi v drugih tkivih (koža), zato je nespecifičen kazalec razgradnje kolagena (13).

Hidroksilizin glikozidi nastajajo med posttranslacijsko fazo sinteze kolagena. Poznamo glikozilgalaktozil hidroksilizin in galaktozil hidroksilizin. Med razgradnjo kolagena se izločajo v sistemski krvni obtok in kasneje v urin, kjer ju določamo s HPLC metodo (13).

Piridinolin (PYD) in deoksipiridinolin (DPYD) sta prečna povezovalca in povezujeta snope kolagenskih vlaken ter tako stabilizirata molekule kolagena. Med kostno razgradnjo se sproščata v sistemski krvni obtok in nato v urin. Na določanje v serumu ali v urini ne vpliva razgradnja na novo sintetiziranega kolagena. Poleg tega sta v večini zastopana v kostnem tkivu, zato sta specifična. Za določanje se uporabljajo imunokemijske metode (ELISA) (13).

N-terminalni in C-terminalni telopeptid (NTX, CTX) sta telopeptida z vezanimi prečnimi povezovalci. CTX se nahaja v α - in β -obliki, kjer α oblika predstavlja razgradnjo na novo sintetiziranega in β oblika razgradnjo starega kolagena. Njuno razmerje se lahko uporablja kot kazalec kostne razgradnje. NTX in CTX določamo v serumu ali urinu imunokemijsko (RIA, ELISA) (13).

Slika 1 prikazuje kazalce kostne razgradnje, ki so razgradni produkti kostnega kolagena tipa I.



Slika 1: Kazalci kostne razgradnje, ki nastanejo po razgradnji kostnega kolagena tipa I; kolagen tipa I sestavljata dve α_1 in ena α_2 veriga (na verigo so preko hidroksilizina vezane galaktoze – galaktozilhidroksilizini), posamezna kolagenska vlakna pa so povezana med seboj s prečnimi povezovalci (Pyd, Dpyd), ki so pripeti na N- in C-terminalne telopeptide (NTX, CTX)).

Tartrat rezistentna kislja fosfataza (TRAP) je encim, ki deluje v kislem okolju in razgrajuje minerale (kalcijev hidroksiapatit) v kostnem tkivu. Poznamo dva izoencima, TRAP-5a in TRAP-5b, ki ju izločajo osteoklasti. TRAP-5a določamo imunokemijsko (RIA, ELISA) (13).

Katepsin K je lizosomalni encim iz skupine proteaz. Pri razgradnji kostnine sodeluje tako, da cepi verige kolagena tipa I. Njegovo koncentracijo v serumu določamo imunokemijsko (ELISA) in je sorazmerna aktivnosti osteoklastov ter naraste ob povečani kostni razgradnji (13).

Dejavniki, ki uravnavajo delovanje osteoblastov in osteoklastov

RANKL in **OPG** sta proteina, ki nastajata v osteoblastih in sta lokalna dejavnika, ki uravnavata kostno premeno. OPG se veže na RANKL in s tem preprečuje njegovo vezavo na RANK ter tako zavira osteoklastogenezo. V serumu ju določamo imunokemijsko (ELISA). Osteoklastogeneza je pospešena ob višji serumski koncentraciji RANKL in nižji serumski koncentraciji OPG (14).

1.3.5 ZDRAVLJENJE OSTEOPOROZE

Za preprečevanje in zdravljenje osteoporoze imamo na voljo zdravila, ki zavirajo kostno razgradnjo, zdravila, ki pospešujejo kostno tvorbo in zdravilo, ki sočasno vpliva na obe fazi kostne premene. Najbolj uporabljana so zdravila, ki zavirajo razgradnjo in tako preprečujejo izgubo kostne mase.

1.3.5.1 Nadomestno hormonsko zdravljenje (HNZ)

Estrogen je vključen v praktično vse vidike presnove kalcija in kosti. Estrogenski receptorji so prisotni tako v osteoblastih kot v osteoklastih. Preko teh receptorjev estrogen zmanjšuje kostno premeno in hkrati ohranja ravnovesje med tvorbo in razgradnjo kosti. Poleg tega estrogen ohranja zadostno koncentracijo kalcija v krvi, tako da zviša absorpcijo kalcija iz gastrointestinalnega trakta (poveča občutljivost tankega črevesja na delovanje vitamina D). HNZ zmanjša incidenco zlomov tudi pri ženskah z normalno MKG (nizko tveganje za zlome) in ne samo pri bolnicah z osteoporozo. Vendar pa danes glede na koristi in tveganja velja, da HNZ ni terapija prvega izbora pri zdravljenju osteoporoze (15).

1.3.5.2 Kalcij in vitamin D

Pomen vitamina D in kalcija za normalno kostno presnovo je že dolgo znan. Splošne smernice vključujejo dodatek vitamina D in kalcija kot obvezni dopolnili pri zdravljenju osteoporoze. Bolnicam z osteoporozo se priporoča 1000 do 1200 mg kalcija dnevno, zaužitega s hrano ali obliki nadomestkov ter 800 - 1000 IU vitamina D (15).

1.3.5.3 Bisfosfonati

So zdravila prvega izbora za zdravljenje pomenopavzne osteoporoze. Imajo visoko afiniteto do hidroksiapatita, na katerega se adsorbirajo in preprečujejo njegovo raztapljanje. Prav tako z endocitozo vstopajo v osteoklaste in preko inhibicije mevalonatne poti zmanjšajo aktivnost osteoklastov in povečajo njihovo apoptozo ter tako zavirajo kostno razgradnjo. Največ se uporabljajo alendronat, ibandronat, risedronat in zoledronska kislina (15,16).

1.3.5.4 Selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM)

Raloksifen se veže na estrogenski receptor in v kostnini deluje kot njegov agonist. Stimulira sproščanje OPG iz osteoblastov ali zmanjša izražanje RANKL/RANK/OPG.

V različnih fazah raziskav so tudi novi SERM, kot so lazoksifen, bazedoksifen in arzoksifen, ki naj bi zmanjšali pojavnost vseh vrst zlomov, imeli preventivno delovanje na raka dojke, zagotovili nevtralen ali ugoden kardiovaskularni profil in bili brez vpliva na klimakterične težave pri pomenopavzni ženski (15,16).

1.3.5.5 Kalcitonin

Kalcitonin je hormon, ki ga izločajo posebne celice ščitnice in je v telesu pomemben pri uravnavanju serumskega kalcija. Ker je beljakovina, peroralno zaužit ni učinkovit, zato ga dajemo v obliki nosnega pršila. Deluje kot zelo šibek zaviralec kostne razgradnje (15).

1.3.5.6 Stroncijev ranelat

Stroncijev ranelat je zdravilo, ki zmanjša diferenciacijo osteoklastov ter s tem zavira kostno razgradnjo. Povzroča tudi replikacijo prekurzorjev osteoblastov in poveča tvorbo kolagena ter s tem stimulira tvorbo kosti (15,16).

1.3.5.7 Teriparatid

Gre za humani rekombinantni parathormon, ki pri intermitentni aplikaciji poveča število in aktivnost osteoblastov, kostno maso in izboljša arhitekturo skeleta (15,16).

1.3.5.8 Denosumab

To zdravilo je monoklonsko protitelo, ki se veže na RANKL, prepreči njegovo vezavo na RANK ter na ta način zavira osteoklastogenezo, hkrati tudi zmanjšuje kostno premeno in zvišuje MKG (17).

1.3.6 GENETIKA IN OSTEOPOROZA

Genetski dejavniki so pomemben dejavnik pri razvoju in nastanku osteoporoze. Rezultati raziskav na dvojčkih in družinah kažejo, da je 50 - 85 % variabilnost največje kostne mase posledica dednosti. Različne študije dedovanja so pokazale vpliv genetskih dejavnikov tudi na ostale dejavnike tveganja za osteoporozni zlom (geometrija kolka, mišična moč, kazalci kostne razgradnje, indeks telesne mase) (18).

1.3.6.1. Identifikacija osteoporoznih genov

Poznamo več pristopov za identifikacijo genov, ki regulirajo dovzetnost za nastanek osteoporoze: asociacijske študije, študije vezanega dedovanja študije na živalih in ljudeh ter vsegenomske študije (18).

Asociacijske študije proučujejo povezanost genotipa (prisotnost ali odsotnost polimorfizma) v kandidatnem genu s fenotipom (MKG, osteoporotični zlom, spremenjena koncentracija biokemijskih kazalcev kostne premene). V zadnjem času se izvajajo tudi z analizo celega genoma (t. i. vsegenomske študije povezanosti) na DNA mikromrežah, kjer pri preiskovancih analizirajo veliko število polimorfizmov v celotnem genomu in njihovo povezavo z osteoporoznim fenotipom. Slabost asociacijskih študij je, da lahko pride do zavajajočih rezultatov zaradi vpliva drugih dejavnikov (prehrana, telesna aktivnost preiskovancev), majhnega vzorca in populacijske variabilnosti (18,19).

Študije vezanega dedovanja na ljudeh se izvajajo predvsem pri odkrivanju genov, odgovornih za nastanek monogenских bolezni in so manj primerne za raziskave kompleksnih bolezni (npr. osteoporoze). Temeljijo na raziskovanju povezave podedovanega fenotipa z genotipom med ožjimi družinskimi člani (npr. mati - hči). Prednost teh študije je, da lahko z njimi identificiramo nove molekularne poti, ki regulirajo kostni metabolizem. Slabost teh študij je manjša sposobnosti identifikacije genov z majhnim individualnim vplivom, zato se manj primerne pri poligenских boleznih (18,19).

Študije vezanega dedovanja na živalih so primerne za proučevanje genov tudi pri kompleksih boleznih. Temeljijo na križanju živali, ki imajo nasprotujoč fenotip (npr. visoka in nizka MKG). Po ponovnem križanju med potomci F1 generacije, dobimo F2 generacijo potomcev, kjer imajo živali različno MKG zaradi rekombinacije med kromosomi materinske generacije in zato lahko proučujemo povezanost alelov z MKG.

Prednost teh študij je, da lahko analizo izvajamo na velikem številu živali ter da lahko kontroliramo njihovo vzrejo. Slabost teh študij je, da je identificiran lokus lahko specifičen le za določene vrste in da preiskovani fenotip preiskujemo na živalih (težavno merjenje MKG) (18,19).

Vsegenomska analiza genskega izražanja se izvaja s pomočjo DNA mikromrež. Temeljijo na analizi ekspresijskih profilov, ki so prikaz biološkega fenotipa. Pri teh študijah primerjamo izražanje genov preko celotnega genoma pri preiskovancih brez bolezenskega stanja in preiskovancih z določeno boleznijo (npr. osteoporoza). Tako dobimo seznam vseh genov, ki se različno izražajo pri določeni bolezni, ne moremo pa iz tega sklepati, kako ti geni neposredno vplivajo na posamezno bolezen (20).

Do sedaj so pri osteoporozi proučevali številne kandidatne gene, od katerih so najpogosteje preučevani navedeni v preglednici II.

Preglednica II: Najbolj proučevani kandidani geni pri osteoporozi (18)

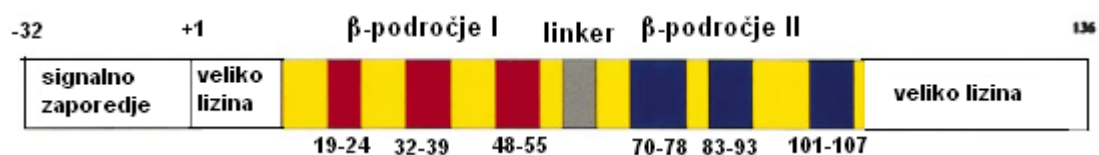
Hormoni in receptorji Androgeni receptor (AR) Aromataza (CYP19A1) Receptor za kalcitonin (CALCR) Estrogenski receptor α in β (ESR1 in ESR2) Paratiroidni receptor tipa I (PTH1R) Paratiroidni hormon (PTH) Receptor vitamina D (VDR)	Regulatorni dejavniki osteoblastov Alox 12 in 15 (ALOX 12 in ALOX 15) Kostni morfogeni protein 2 in 4 (BMP2 in 4) Jedrni vezavni dejavnik A1 (RUNX2) Inzulinu podoben rastni dejavnik (IGF1) Sklerostin (SOST) Transformirajoči rastni dejavnik (TGFB) LDL receptroju soroden protein (LRP5 in LRP6)
Citokini in receptorji Interlevkin-1 α in β (IL1A in IL1B) Antagonist interlevkin-1 receptorja (IL-1RA) Interlevkin-6 (IL6) Dejavniki tumorske nekroze (TNF) Receptor za TNF (TNFR2)	Geni povezani z osteoklasti Katepsin K (CTSK) Kloridni kanal (CLCN7) Osteoprotegerin (OPG) Receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANKL)
Sestavine kostnega matriksa in encimi za razgradnjo α 2-HS-glikoprotein (AHSG) kolagen tipa I α I (COL1A1)	Ostali Apolipoprotein E (APOE) Metilen tertahidrofolna reduktaza (MTHFR) HLA razred II (HLA-D)

1.4 PLEIOTROPIN

Rastni faktorji in citokini so pomembni za normalno rast in razvoj. Konstitutivna aktivacija genov za citokine in rastne faktorje je značilna pri različnih patoloških stanjih (npr. pri kroničnih vnetnih boleznih, malignih tumorjih). Tudi pri osteoporozi je pomembna aktivacija genov določenih citokinov, med katerimi ima pomembno vlogo tudi pleiotropin. Raziskave so pokazale, da je pri osteoporoznih bolnikih izražanje gena za pleiotropin zmanjšano (21).

1.4.1 STRUKTURA PLEIOTROPINA IN NJEGOVA VLOGA V TELESU

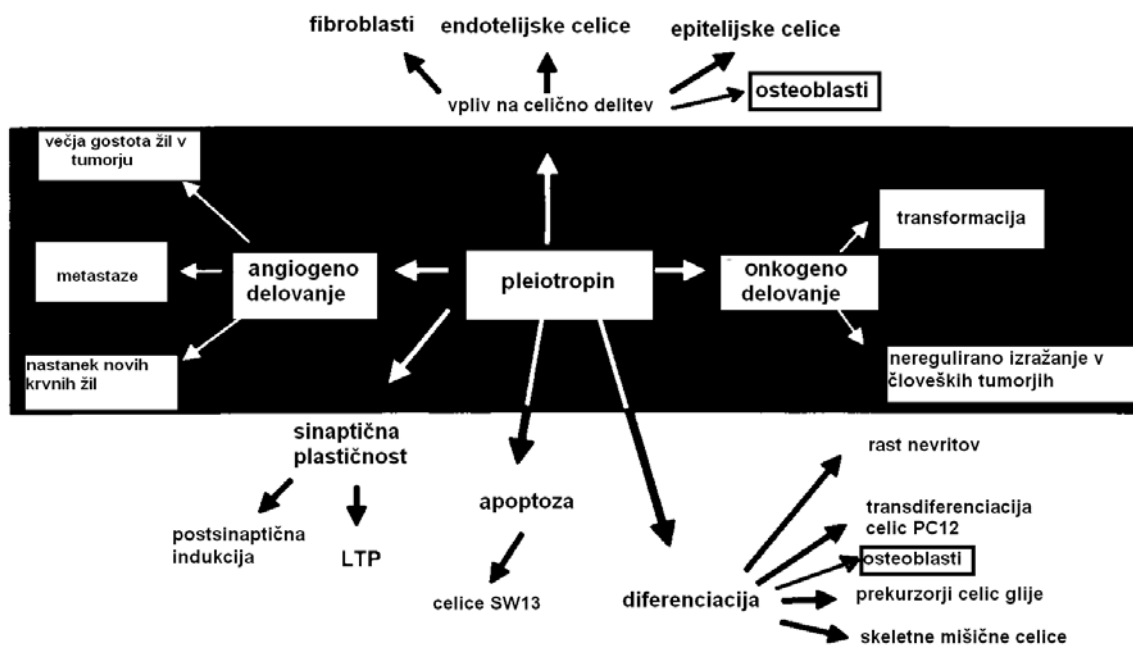
Pleiotropin (PTN) je 18 kDa dolg zunajcelični vezavni protein za heparin. Izolirali so ga iz maternice volov, neonatalnih možganov podgan ter iz kostnega tkiva miši in človeka. Funkcionalen protein je zgrajen iz 136 aminokislin, njegov prekurzor pa je daljši za 32 aminokislin dolgo signalno zaporedje za sekrecijo, ki se pri proteolitični cepitvi odstrani. Med aminokislinami je najbolj zastopan lizin (21 %), zato je pleiotropin bazičen, njegova izoelektrična točka je okoli 10,1. Pleiotropin poleg območij, bogatih z lizinom, gradita dve domeni z β področji, ki ju sestavljajo tri antipararelne β verige, ki so med seboj povezane z gibljivim povezovalcem. Trenutno je PTN poleg midkina edini znani predstavnik družine citokinov NEGF (ang. neurite growth-promoting factor). Slika 2 prikazuje zgradbo prekurzorja pleiotropina (21).



Slika 2: Zgradba prekurzorja pleiotropina (signalno zaporedje iz 32 aminokislin za sekrecijo, dve področji, bogati z lizinom, področji β I in II) (21).

Študije so pokazale, da ima PTN več pomembnih vlog v telesu. Odgovoren je za začetek angiogeneze pri tumorskih celicah, vključno z nastajanjem novih krvnih žil, povečanjem gostote krvnih žil v tumorju in okoliških tkivih ter povečanjem števila metastaz. *In vitro* v

fibroblastih glodavcev (izraža se aktiviran eksogeni gen za PTN) in *in vivo* v različnih človeških celicah (zmanjšana regulacija izražanja gena za PTN) daje signal za onkogenezo, ki vključuje transformacijo celic in neregulirano izražanje gena za PTN v človeških tumorjih. Pospešuje proliferacijo fibroblastov, endotelijskih celic in epitelijских celic ter osteoblastov. PTN je aktiven tudi pri sinaptični plastičnosti. Vpliva na postsinaptično indukcijo in dolgoročno potenciacijo (angl. long term potentiation - LTP) nevronov. Raziskave na SW13 celicah (izolirane celice iz karcinoma adrenalnih žlez) so pokazale, da povzroča apoptozo teh celic oz. preprečuje njihov razrast. Prav tako pospešuje diferenciacijo različnih celic (skeletne mišične celice, prekursorji celic glije, izraščanje nevrinov, osteoblasti) (21,22). Vse te naloge so shematsko prikazane na sliki 3.



Slika 3: Različne vloge PTN v telesu.

1.4.2 GEN ZA PTN

Gen za PTN se nahaja na kromosomu 7q33 in je velik 116.524 bp. Poznana sta dva transkripta tega gena (PTN-1 in PTN-2). PTN-1 je dolg 1614 bp in vsebuje pet eksonov, PTN-2 pa je dolg 1599 bp in vsebuje šest eksonov (23).

Največje izražanje gena za PTN *in vivo* v možganih je takoj po rojstvu, ko poteka diferenciacija živčnih celic in celic glije, pri odraslih pa je največje izražanje prisotno v

testikularnih Leydigovih celicah, maternici in določenih živčnih celicah in celicah glije. Izraža se tudi v kostnem tkivu (23).

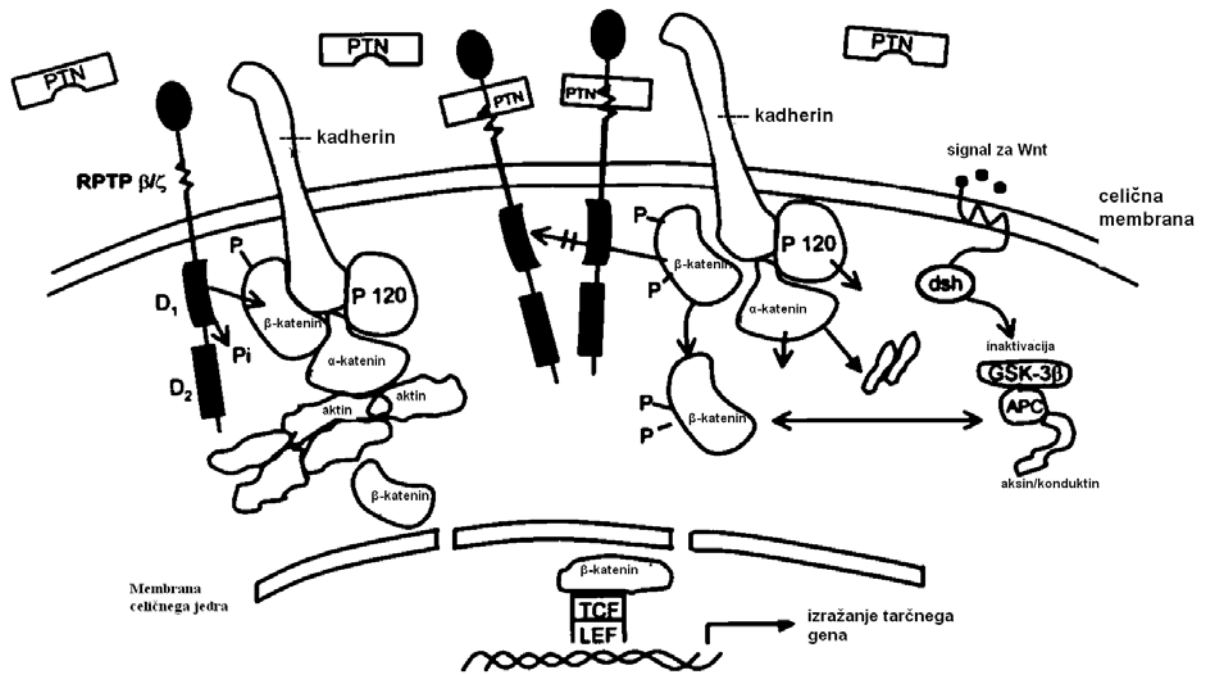
1.4.3 PTN SIGNALNA POT

Raziskave so pokazale, da se PTN veže na transmembranski protein tirozin fosfatazni receptor (RPTP) β/ζ , ki vodi do defosforilacije β -katenina. β -katenin ima pomembno vlogo pri adheziji med celicami, strukturi citoskeleta in vpliva na rast transformiranih in normalnih celic. β -katenin sodeluje tudi pri signalni poti Wnt. Obe signalni poti sta povezani preko β -katenina, ki ima pomembno vlogo pri regulaciji kostne mase (21,24).

V signalni poti PTN RPTP β/ζ kot intrinzično delujoča tirozin fosfataza defosforilira β -katenin in tako regulira njegovo ravnotežno stanje. Vezava PTN na RPTP β/ζ povzroči dimerizacijo receptorja in posledično njegovo inaktivacijo, kar poveča koncentracijo fosforiliranega β -katenina v citosolu. Študije kažejo tudi, da PTN prekine povezavo med β -kateninom in kadherinom, ki je potrebna za vezavo citoplazemske domene kadherina z aktinskim citoskeletom, kar posledično pomeni zmanjšanje adhezije med celicami (21).

Signalna pot Wnt ima pomembno vlogo pri diferenciaciji, proliferaciji in sposobnosti mineralizacije osteoblastov ter zaviranju njihove apoptoze. β -katenin tudi poveča razmerje med OPG in RANKL ter s tem zavira osteoklastogenezo (24). Aktivacijo signalne poti Wnt povzroči vezava proteinov Wnt na receptorje družine Frizzled in LRP5/6 (LDL receptorju soroden protein 5/6). Aktivirajo se proteini družine Dishevelled (Dsh), Aksin in Frat-1, kar povzroči inaktivacijo GSK3 (protein, ki fosforilira β -katenin ter tako omogoči razgradnjo le-tega). Posledično se v citoplazmi začne kopičiti nefosforiliran β -katenin in ko doseže določeno koncentracijo, vstopi v celično jedro, kjer interagira s transkripcijskima faktorjema TCF in LEF (angl. T cell factor/lymphoid enancer binding factor) ter tako uravnava transkripcijo različnih genov.

Na sliki 4 je prikazana signalna pot PTN in njena povezava s signalno potjo Wnt ter vloga β -katenina.



Slika 4: PTN signalna pot in njena povezava z Wnt signalno potjo.

Preko obeh signalnih poti (PTN in Wnt) lahko vplivamo na koncentracijo β -katenina, ki je odgovoren za večjo aktivnost osteoblastov, njihovo daljšo življenjsko dobo ter posredno zaviranje osteoklastogeneze.

2 NAMEN DELA

Osteoporoza je poligenska bolezen, za katero sta značilna nizka mineralna kostna gostota in povečano tveganje za zlome. Do sedaj so odkrili in proučevali številne kandidatne gene, med katerimi so nekateri pokazali vpliv na razvoj osteoporoze. Med njimi bi lahko bil tudi gen za pleiotropin. V vsegenomski študiji izražanja genov v osteoblastih, ki jo je izvedla naša skupina na katedri za klinično biokemijo, so namreč pokazali, da je izražanje gena za pleiotropin zmanjšano pri bolnikih z osteoporozo. Dosedanje raziskave so pokazale tudi, da pleiotropin pospešuje proliferacijo in diferenciacijo osteoblastov ter ima pri miših vlogo v kostni tvorbi, ki je posledica mehanske obremenitve.

Namen naloge bo ugotoviti pogostost polimorfizmov v promotorju gena za pleiotropin -1734C>T in -1227C>T ter njunih diplotipov in njihovo povezanost z mineralno kostno gostoto ter biokemijskimi kazalci kostne premene. Prav tako bomo poskušali ugotoviti vpliv teh dveh polimorfizmov in njunih diplotipov na odzivnost zdravljenja z alendronatom in raloksifenom ter na tveganje za zlom kolka. Proučevana polimorfizma z njunimi diplotipi bi lahko bila pomembna genetska dejavnika tveganja za razvoj osteoporoze in se kasneje uporabljala tudi kot diagnostična kazalca in za napovedovanje odzivnosti na zdravljenje z zdravili za osteoporozo.

V ta namen bomo:

- v našo raziskavo vključili 897 preiskovancev, ki jim bomo odvzeli kri in izmerili mineralno kostno gostoto ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene;
- pripravili raztopine vzorčnih DNA ustreznih koncentracij ter z reakcijo PCR v realnem času in uporabo sond TaqMan[®] preverili prisotnost polimorfizmov -1734C>T in -1227C>T v promotorju gena za pleiotropin ter tako določili genotipe preiskovancev;
- s pomočjo programa PHASE predvideli pare diplotipov za ta dva polimorfizma;
- s statistično analizo ugotovili, ali polimorfizma -1734C>T in -1227C>T ter njuni diplotipi v promotorju gena za pleiotropin vplivajo na mineralno kostno gostoto, biokemijske kazalce kostne premene, odzivnost na zdravljenje z alendronatom in raloksifenom ter na tveganje za zlom kolka.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 897 preiskovancev iz različnih slovenskih centrov (UKC LJ – Klinika za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, UKC MB - Oddelek za endokrinologijo in diabetologijo, SB Celje – Travmatološki oddelek). Glede na spol, menopavzni status in terapijo smo jih razdelili v pet skupin s posameznimi podskupinami, kot je prikazano v preglednici III.

Preglednica III: Razdelitev preiskovancev v skupine in podskupine.

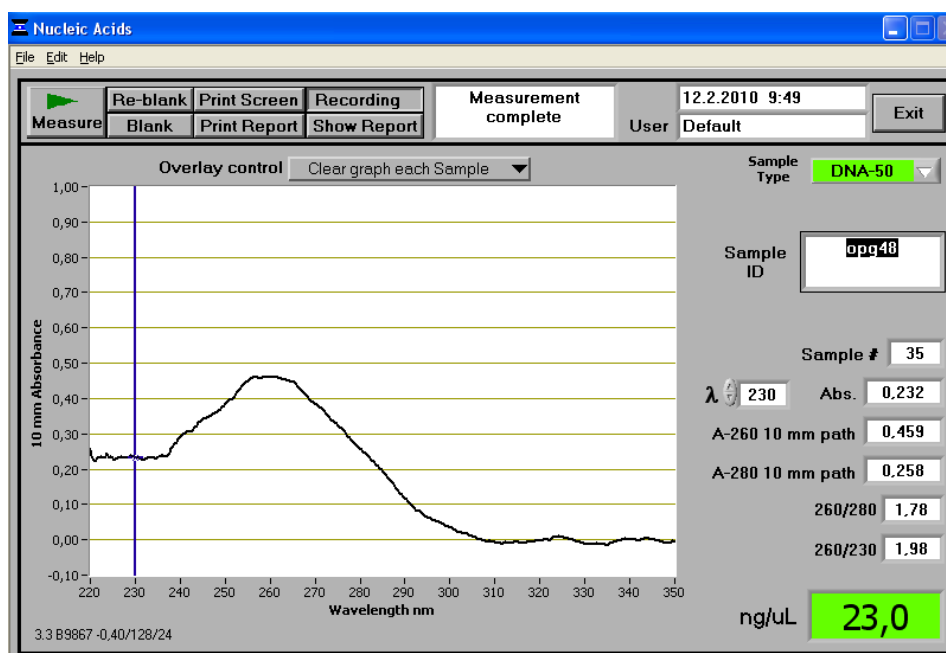
SKUPINA 1	490 pomenopavznih preiskovank, ki smo jih razdelili v dve podskupini: - o 235 zdravih preiskovank - o 255 osteoporoznih preiskovank
SKUPINA 2	57 premenopavznih preiskovank
SKUPINA 3	117 moških preiskovancev
SKUPINA 4	pomenopavzne osteoporozne preiskovanke, ki so se zdravile z: - o raloksifenom (56) - o alendronatom (52)
SKUPINA 5	137 preiskovancev (ženske in moški), ki so imeli operacijo kolka (osteoartroza ali nizkoenergijski zlom kolka)

Preiskovancem so odvzeli kri (za določitev koncentracij biokemijskih kazalcev kostne premene in analizo DNA) in pridobili antoropometrične podatke. Z metodo DXA so jim izmerili MKG na področju kolka in ledvenih vretenc. Prav tako so jim izmerili biokemijske kazalce kostne premene, in sicer RANKL, OPG, osteokalcin, CTX, BALP, DPYR in katepsin K. Osteokalcin (OC) so izmerili v plazmi z dodatkom heparina s kemiluminiscenčnimi encimskoimunskim testom (Immulite Osteocalcin, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). Serumske vrednosti kostne alkalne fosfataze (BALP) so določili z radioimunskim testom (Tandem-R Ostase, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Serumske vrednosti CTX (C-terminalni telopeptid kolagena tipa I), RANKL (sRANKL), OPG in katepsina K pa so določili z encimskoimunskim testom (Serum CrossLaps ELISA, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark; sRANKL ELISA, Biomedica, Vienna, Austria; Osteoprotegerin ELISA, Biomedica,

Vienna, Austria; Cathepsin K ELISA, Biomedica, Vienna, Austria). Po začetnem merjenju MKG so 52 pomenopavznih žensk zdravili z alendornatom (v odmerku 10 mg dnevno) in 56 pomenopavznih žensk z raloksifenom (60 mg dnevno), poleg tega so preiskovanke jemale tudi kalcij in vitamin D₃ (500 mg kalcija in 500 UI vitamina D₃ dnevno v primeru zdravljenja z alendroantom ter 1000 mg kalcija in 400 UI vitamina D₃ dnevno v primeru zdravljenja z raloksifenom). Po enem letu so preiskovankam ponovno izmerili MKG in vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene.

3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN VZORČNIH DNA

Razredčenim raztopinam DNA smo morali pred začetkom dela izmeriti koncentracijo, saj je za izvedbo genotipizacije pomembno, da so raztopine DNA enakih koncentracij. Uporabili smo spektrofotometer NanoDrop® ND-1000. Slika 5 prikazuje primer meritve raztopine vzorčne DNA.



Slika 5: Meritev koncentracije DNA v vzorčni raztopini s spektrofotometrom NanoDrop® ND-1000.

Tako pripravljene raztopine smo na osnovi predhodno izmerjenih koncentracij ponovno redčili do končne koncentracije 3 ng/μl. Raztopine vzorčnih DNA smo pripravili v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami. V prvo vdolbinico vsake ploščice smo odpepitirali le vodo, ki nam je služila kot negativna kontrola.

3.2.1 SPEKTROFOTOMETER NanoDrop® ND-1000

NanoDrop® ND-1000 je širokospektralni (220 - 750 nm) spektrofotometer, s katerim lahko z veliko natančnostjo in ponovljivostjo izmerimo koncentracijo nukleinskih kislin in proteinov v vzorcih z volumnom vsaj 1 µl. Deluje na osnovi retencijske tehnologije, ki izkorišča površinsko napetost za pravilen položaj vzorca. Tako ne potrebujemo kivet in ostalih naprav, ki bi lahko kontaminirale vzorec (25).

3.2.1.1 Delovanje

Na konec spodnje optične enote odpipetiramo 1 µl vzorca. Nato položimo zgornjo optično enoto na spodnjo, tako da pride v stik z vzorcem in nastane most med obema optičnima enotama. Izvor svetlobe predstavlja pulzna ksenonska žarnica, za analizo svetlobe, ki je prešla skozi vzorec, pa se uporablja t. i. »Charge-coupled device« detektor (na svetlobo občutljiv polprevodniški element iz silikonskih diod, ki svetlobo pretvori v električni signal). Inštrument je povezan z računalnikom, ki ima nameščeno ustrezno programsko opremo, s katero obdelamo te signale in dobimo naše meritve (25).

3.2.2 MATERIALI IN OPREMA

Za pripravo vzorčnih raztopin DNA smo uporabljali naslednje materiale, aparature in pribor: visokoprečiščena voda za redčenje, osnovne raztopine vzorčnih DNA, spektrofotometer NanoDrop® ND-1000, polavtomatske pipete (Eppendorf) za različne volumne, avtoklavirane 1,5 in 0,5 ml epice (Sarstedt), mikrotitrne ploščice (96 vdolbinic), mešalnik Vortex-2 Genie (Scientific Industries), avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt).

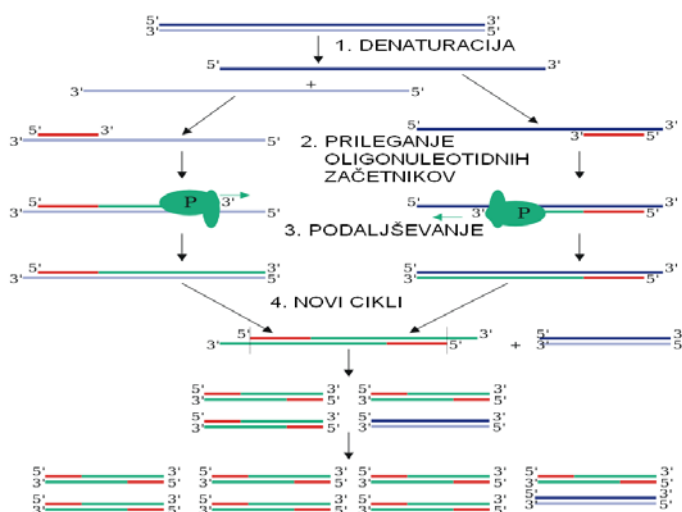
3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

PCR je metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko iz majhne količine DNA sintetiziramo veliko število kopij v zelo kratkem času (26).

Za izvedbo PCR potrebujemo reakcijsko zmes, ki mora vsebovati (26):

- vzorec DNA (matrica),
- oligonukleotidna začetnika (z njima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti),
- deoksinukleozid-trifosfati (dNTP) (gradniki za nove verige DNA),
- Mg^{2+} ioni,
- reakcijski pufer,
- termostabilna DNA-polimeraza.

Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa sestavlja več stopenj (slika 6). V stopnji denaturacije s pomočjo segrevanja na 94 - 95 °C razklenemo verigi DNA ter tako iz dvoverižne dobimo dve enoverižni DNA. Sledi faza prileganja oligonukleotidnih začetnikov na enoverižne DNA, ki poteka pri 40 - 60 °C. Zatem temperaturo dvignemo na 72 °C, kjer termostabilna DNA polimeraza najbolje deluje. Le-ta se veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri 5' → 3' izgradi komplementarno DNA verigo. DNA, ki nastane v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih verig v naslednjem ciklu. Teoretično se število DNA verig eksponentno povečuje. Ponavadi izvedemo 20 - 40 ciklov (26).



Slika 6: Shema poteka PCR.

3.3.1 PCR V REALNEM ČASU

3.3.1.1 Princip

PCR v realnem času je nadgradnja tradicionalnega PCR, ki omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Pomnoževanje in detekcija produktov potekata istočasno. Temelji na detekciji fluorescentnega signala, ki nastane v sorazmerju s pomnoževanjem tarčne DNA. Spremljanje reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta, ko je reakcija še v eksponentni fazi. To naredimo tako, da s pomočjo podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Ko preseže ta prag (Ct, ang. threshold cycle), za vsak vzorec določimo cikel. Vrednosti Ct so v obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrice. Če je razlika Ct med vzorcema ena, pomeni da je razlika v količini matrice dvakratna. Če med seboj primerjamo Ct vrednosti standardov in vzorcev, lahko določimo skupno število kopij matrice v vzorcu. Priprava tovrstnih standardov je zelo zahtevna, zato zlasti pri merjenju izražanja genov, kjer nam pogosto zadostuje le podatek o razliki med vzorci, podamo rezultate le relativno (26).

3.3.1.2 Načini detekcije

Poznamo več načinov detekcije produktov s PCR v realnem času. Razdelimo jih lahko v dve skupini glede na to, ali z njimi določimo le specifični produkt ali pa morebitno prisotne nespecifične produkte.

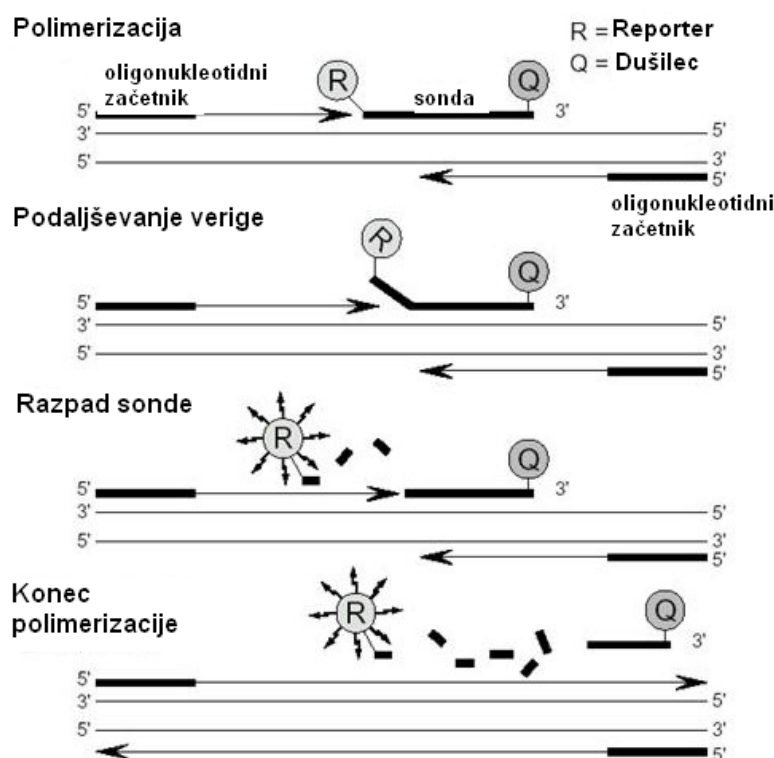
Med nespecifične načine detekcije uvrščamo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNA. Primer je etidijev bromid, ki pa ga je nadomestil SYBR[®] Green I. Slednji ima v prosti obliki nezaznavno fluorescenco, če pa se vgradi v dvoverižno DNA, po eksitaciji močno fluorescira. V stopnji prileganja (enoverižna DNA) barvilo ne fluorescira, v stopnji podaljševanja pa se vgradi v dvoverižno DNA in fluorescira. Intenziteta fluorescence je sorazmerna s količino nastale dvoverižne DNA (26).

Specifične načine detekcije predstavljajo s fluorofori označeni oligonukleotidi (sonde), ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. V ta namen uporabljamo dva

fluorofora, katerih emisijski in eksitacijski spekter se prekrivata. Ko sta fluorofora dovolj blizu, povzroči vzbujenje donorskega barvila sevanje svetlobe, ki vzburi akceptorsko barvilo, to pa posledično seva svetlobo druge valovne dolžine. Kot sprejemnike uporabljamo tudi molekule, ki absorbirajo svetlobo donorske molekule, same pa ne fluorescirajo. Najpogosteje se uporabljajo hidrolizirajoče sonde, hibridizacijske sonde in molekularna svetila (26).

Hidrolizirajoče sonde (sonde TaqMan®)

Te sonde imajo na enem koncu vezano reportersko barvilo, ki fluorescira, in na drugem dušilec, ki to svetlobo prestreza. Specifično prepoznajo tarčno zaporednje na DNA in se nato vežejo nanj. Pri njih izkoriščamo 5' - eksonukleazno aktivnost DNA-polimeraze, ki med potekom reakcije v fazi prileganja PCR sondo (vezano na specifično tarčno zaporedje) razgradi. Razgrajena sonda fluorescira, ker pride do povečanja razdalje med reporterskim barvilom in dušilcem. Jakost fluorescence reporterskega barvila je sorazmerna količini nastalega produkta PCR. Slika 7 prikazuje opisani način detekcije (26).



Slika 7: Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s hidrolizirajočimi sondami.

Uporaba sond TaqMan® za genotipizacijo

Za genotipizacijo se uporablja en par sond za vsak polimorfizem. Pri vsakem paru ima prva sonda na 5' koncu vezano fluorescentno reportersko barvilo FAM in druga VIC, na 3' koncu pa imate obe vezani dušilec MGB (angl. minor groove binder). Sonde se razlikujeta v enem baznem paru, tako da ustreza ena izmed sond mutiranemu zaporedju (alel 1), druga pa nemutiranemu zaporedju (alel 2). Ko sta sonde intaktni, neposredna bližina dušilca prepreči fluorescenco reporterja in zato fluorescence ne detektiramo. Ob vezavi sonde na ustrezno zaporedje in porastu fluorescence reporterskega barvila lahko ugotovimo, ali je polimorfizem prisoten ali ne (27).

3.4.1 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMOV -1734C>T IN -1227C>T V PROMOTORJU GENA ZA PLEIOTROPIN

Preden smo začeli z delom, smo s 3 % hipokloritom očistili delovno komoro ter ves pribor, ki smo ga kasneje uporabljali. Zatem smo prižgali UV žarnico za 20 – 30 minut. Za serijo 192 vzorcev smo v delovni komori pripravili skupno reakcijsko zmes, ki ni vsebovala vzorčne DNA. Posebno smo morali biti previdni s sondami, ki so občutljive na svetlobo in toploto, zato smo jih pred samo uporabo hranili na temnem v predalu in jih odmrznili neposredno pred uporabo. Reakcijski zmesi pri obeh polimorfizmih sta se razlikovali le v uporabljenih sondah. Sestava reakcijske zmesi za en vzorec je podana v preglednici IV.

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje.

Reagent	Volumen (µl) za en vzorec
5 x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (no ROX)	1,2
visoko prečiščena voda	1,8
ustrezne sonde TaqMan	0,15
vzorčna DNA	2,85
skupni volumen	6,0

Reakcijsko zmes za več vzorcev brez vzorčne DNA smo pripravljali tako, da smo posamezne reagente pomnožili s številom vzorcev ter nato prišteli še 10 % pribitek zaradi izgub pri pipetiranju reakcijske zmesi na mikrotitrsko ploščico. Tako pripravljeno reakcijsko zmes smo nato napipetirali na mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinicami.

Predhodno pripravljene vzorčne raztopine DNA (koncentracija okoli 3 ng/µl) na mikrotitrskih ploščicah (96 vdolbinic) smo z 12 kanalno polavtomatsko pipeto odpipetirali

na mikrotitrsko ploščico (384 vdolbinic) na mesta, kamor smo predhodno odpipetirali reakcijsko zmes za pomnoževanje.

Ploščico s 384 vdolbinicami, ki je vsebovala reakcijsko zmes in vzorčno DNA, smo prekrili s samolepilno folijo ter jo centrifugirali 4 minute pri 2100 obratih/min. Nato smo jo vstavili v ciklični pomnoževalnik LightCycler® 480 Real-Time PCR system, ki po predhodno nastavljenim računalniškim protokolom v določenih časovnih intervalih spreminja temperaturo (prikazano v preglednici V).

Preglednica V: Pogoji za izvedbo reakcije PCR v realnem času.

stopnja PCR	temperatura (°C)	čas	
začetna denaturacija	95	10 min	
denaturacija	95	15 s	45 ciklov
prileganje primerjev in podaljševanje	60	60 s	

3.4.1.4 Materiali in oprema

- Reagenti:
 - 5 x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (no ROX) proizvajalca SolisBioDyne, ki vsebuje HOT FIREPol® DNA-polimerazo, 5 x Probe qPCR pufer, 15 mM MgCl₂, dNTP, brez pasivne reference (ROX)
 - TaqMan® SNP genotyping Assay Mix (Applied BioSystems), ki vsebuje oligonukleotidna začetnika in dve TaqMan® sondi (za vsak polimorfizem svoj reagenčni komplet):

	reportersko bravilo (5' konec)	dušilec (3' konec)
sonda 1	VIC®	NFQ (nefluorescentni dušilec)
sonda 2	FAM®	NFQ

- Aparature in pribor:

Avtomatski pipetor Freedom EVO® 75 (Tecan), nastavki za pipete (Tecan), polavtomatska 12-kanalna pipeta (Eppendorf), polavtomatske pipete (Eppendorf) za različne volumne, avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt), ciklični pomnoževalnik LightCycler® 480 Real-Time PCR system (Roche Applied Science), avtoklavirane 1,5 in 0,5 ml epice (Sarstedt), mikrotitrne ploščice (96 in 384 vdolbinic), samolepilna folija (Roche Applied Science), mešalnik Vortex-2 Genie (Scientific Industries), delovna komora z UV lučko (Krom, Ljubljana, Slovenija),

mikrocentrifuga Mikro-242 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija), avtoklav A-21 (Kambič, Laboratorijska oprema).

3.5 STATISTIČNE METODE

Izračunali smo deskriptivno statistiko, frekvence genotipov za vsak polimorfizem ter preverili skladnost s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem s pomočjo χ^2 testa. Za izračun in analizo diplotipov smo uporabili program PHASE (28) ter program EMLD (29). S pomočjo programa PHASE smo predvideli možne pare diplotipov ter s programom EMLD izračunali parametre vezavnega neravnovesja. Normalnost porazdelitve spremenljivk smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim testom, homogenost varianc pa z Levenovim testom. Nadalje smo za normalno porazdeljene spremenljivke uporabili analizo variance ANOVA (za več neodvisnih spremenljivk) ali T-test (za dve neodvisni spremenljivki), za nenormalno porazdeljene pa neparametrične teste (Kruskal-Wallis test – za več neodvisnih spremenljivk; Mann-Whitney test – za dve neodvisni spremenljivki). S Scheffe post hoc testom smo ugotavljali statistično značilne razlike med posameznimi podskupinami spremenljivk. V primeru da smo z ANOVO ugotovili razlike v telesni masi, višini, indeksu telesne mase (ITM) ali starosti v genotipskih podskupinah, smo uporabil analizo kovariance (ANCOVA). Vse statistične operacije smo izvedli s pomočjo programa SPSS, verzija 16.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

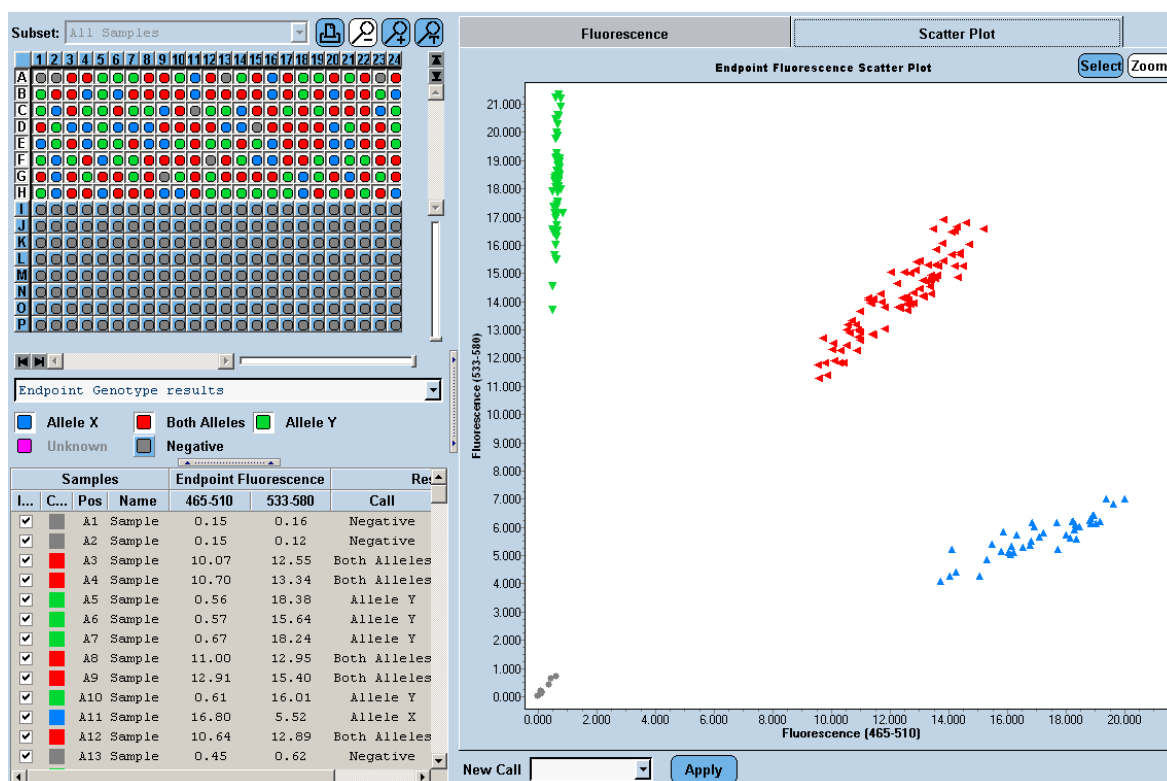
4.1 IZVEDBA GENOTIPIZACIJE

Vse vzorce smo najprej redčili na koncentracijo 3 ng/ μ l, ki predstavljala zadostno količino DNA za izvedbo genotipizacije. Genotipizacijo smo izvedli na ploščicah s 384 vdolbinicami za vsak polimorfizem posebej. Pogoji reakcije PCR so bili predhodno določeni s strani proizvajalca in jih ni bilo potrebno dodatno optimizirati. Po končani reakciji PCR smo določili genotipe vzorcem. Te smo določili s pomočjo TaqMan[®] sond (za vsak polimorfizem drug par sond). Po razpadu sonde, ki se je vezala na komplementarno zaporedje, je sledil porast fluorescenčnega signala. Iz tega smo lahko sklepali, kateri izmed alelov je prisoten v vzorčni DNA. Povezava med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA je prikazana v preglednici VI (sondi za oba polimorfizma vsebujeta enaki reporterski barvili).

Preglednica VI: Povezava med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA.

Porast signala	GENOTIP za polimorfizema -1734C>T in -1227C>T	
le FAM	homozigot za alel 1	CC
le VIC	homozigot za alel 2	TT
FAM in VIC	heterozigot (oba alela)	CT

S pomočjo alelne diskriminacije smo določili genotipe za vsak vzorec na ploščici. Slika 8 prikazuje rezultate genotipizacije za eno ploščico vzorcev.



Slika 8: Rezultati in razpršeni prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan®; modra barva: genotip CC (Allele X), rdeča barva: genotip CT (Both Alleles), zelena barva: genotip TT (Allele Y). S sivo in roza barvo so označeni neuspeli vzorci.

Po prvi izvedbi postopka genotipizacije nekateri vzorci niso uspeli, zato smo morali postopek genotipizacije ponavljati. Neuspele vzorce smo zopet redčili, vendar tokrat do koncentracije 6 ng/μl. Predvidevali smo, da bi bil lahko vzorec za neuspelo genotipizacijo v premajni količini vzorčne DNA. Ponovno smo izvedli reakcijo PCR in odčitali genotipe. Nekaterih vzorcev vseeno nismo genotipizirali, zato smo jih izločili iz nadaljnje statistične obdelave. Za neuspele vzorce smo sklepali, da je razlog v kontaminaciji le-teh s proteini ali razpad vzorčne DNA.

4.2 UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMOV

Frekvenco polimorfizmov -1734C>T in -1227C>T smo izračunali na osnovi genotipov, ki smo jih dobili po genotipizaciji s sondami TaqMan®. Rezultati so podani v preglednici VII in preglednici VIII.

Preglednica VII: Frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem -1734C>T v proučevanih skupinah.

SKUPINA	CC [%]	CT [%]	TT [%]
premenopavzne preiskovanke	40,7	33,3	25,9
pomenopavzne preiskovanke	34,7	46,1	19,2
zdrave pomenopavzne preiskovanke	38,7	42,8	18,5
osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	30,7	49,3	20,0
moški	35,5	44,5	20,0
pomenopavzne ženske, zdravljenje z alendronatom	46	40	14
pomenopavzne ženske, zdravljenje z raloksifonom	27,8	46,3	25,9
preiskovanci z osteoporozo, ki so doživeli nizkoenergijski zlom kolka	30,7	48,0	21,3
preiskovanci z osteoartrito	40,4	40,4	19,2

Preglednica VIII: Frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem -1227C>T v proučevanih skupinah.

SKUPINA	CC [%]	CT [%]	TT [%]
premenopavzne preiskovanke	40,7	40,7	18,5
pomenopavzne preiskovanke	35	45,7	19,2
zdrave pomenopavzne preiskovanke	34,7	46,1	19,2
osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	35,3	45,2	19,5
moški	28,0	50,5	21,5
pomenopavzne ženske, zdravljenje z alendronatom	38	34	28
pomenopavzne ženske, zdravljenje z raloksifonom	40,7	44,4	14,8
preiskovanci z osteoporozo, ki so doživeli nizkoenergijski zlom kolka	29,3	49,3	21,3
preiskovanci z osteoartrito	30,8	46,2	23,1

Nato smo za frekvence genotipov za vsako skupino preiskovancev ter za vsak polimorfizem s χ^2 testom za dva neodvisna vzorca preverili, če so v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Hardy-Weinbergovo načelo velja za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer se osebki naključno razmnožujejo, ni selekcije vzorcev, dodatnih mutacij in migracij ter pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja (30). Vse frekvence genotipov po skupinah so bile v tem ravnotežju, razen skupine premenopavznih preiskovank za polimorfizem -1734C>T in skupine preiskovank, ki so se zdravile z alendronatom za polimorfizem -1227C>T. Predvidevali smo, da bi bil najverjetnejši vzrok

za to napaka v postopku genotipizacije za ti dve skupini, zato smo ga ponovili. Novi rezultati so se ujemali s predhodnimi rezultati. Možni vzroki za neravnovesje so lahko naključni, posledica napake pri genotipizaciji ali pa se pojavijo v populaciji, kot posledica nenaključnega parjenja, izbirnega parjenja, parjenja v krvnem sorodstvu, de novi nastalih mutacij, selekcije, majhne populacije ter premika ali pretoka genov s preseljevanjem (30).

4.3 IZRAČUN IN ANALIZA DIPLOTIPOV

Diplo tipe smo napovedovali s pomočjo programa PHASE (28). V program smo vnesli le vzorce, kjer smo imeli rezultate za oba polimorfizma, tiste, kjer smo imeli genotip samo za enega ali nobenega od polimorfizmov, smo izključili. Program nam je za vsak vzorec izračunal možne pare diplotipov (ti so bili TT, TC, CT, in CC), frekvenco posameznega diplotipa ter verjetnost, da je posamezen diplotip prisoten na alelu. Ta verjetnost je bila povsod večja od 95 %, zato smo pri nadaljnji analizi upoštevali vse pare diplotipov. Preglednica IX prikazuje frekvence posameznih diplotipov.

Preglednica IX: Frekvence napovedanih diplotipov (TT, TC, CT, CC).

Diplo tip	Frekvenca (%)
TT	0,15
TC	42,90
CT	42,77
CC	14,18

Frekvenca diplotipa TT je bila zelo nizka, zato smo ta diplotip izločili iz nadaljnje analize. Nato smo za vsak vzorec in njegov par predpostavljenih diplotipov uredili podatke tako, da je bilo razvidno, koliko kopij vsakega diplotipa ima preiskovanec (nobene, eno ali dve). Te podatke smo uporabili pri kasnejši statistični analizi iskanja povezanosti diplotipov z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

Prisotnost vezavnega neravnovesja med aleli obeh polimorfizmov smo proučevali s programom EMLD (29). Vezavno neravnovesje pomeni večjo povezanost dveh alelov in s tem večjo verjetnost, da se dedujeta skupaj (31). V program smo vnesli le vzorce, kjer smo imeli rezultate za oba polimorfizma, tiste, kjer smo imeli genotip samo za enega ali

nobenega od polimorfizmov, smo izključili. Program nam je izračunal parametre vezavenga neravnovesja D, D' in r^2 . Vrednosti parametrov so podane v preglednici X.

Preglednica X: Vrednosti parametrov vezavnega neravnovesja.

D	D'	r^2
-0.1833	0.9922	0.5594

Parameter D je različen od 0, zato lahko rečemo, da sta alela v vezavnem neravnovesju. Parameter D' je zelo blizu ena, kar nam pove, da sta lokusa, kjer se alela nahajata, med seboj zelo povezana in se zato z veliko verjetnostjo dedujeta skupaj. Korelacijski koeficient r pa nam pove, koliko so posamezni pari diplotipov med seboj povezani (v našem primeru 55,94%) (31).

4.4 POVEZANOST POLIMORFIZMOV -1734C>T IN -1227C>T TER NJUNIH DIPLOTOPOV Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE

Posamezne skupine preiskovancev smo za oba polimorfizma razdelili v tri genotipske podskupine (genotipi CC, CT in TT). Preglednici XI in XII prikazujeta povprečne vrednosti posameznih parametrov (starost, masa, višina, indeks telesne mase (ITM), pričetek menopavze in trajanje menopavze) za posamezne skupine in podskupine preiskovancev. Diplotipe obeh polimorfizmov (diplotip TC, CT, CC) smo razdelili v tri podskupine glede na število kopij posameznega diplotipa (0 – nima nobene kopije, 1 – ima eno kopijo, 2- ima dve kopiji) ter za vsako genotipsko in diplotipsko podskupino izračunali aritmetično sredino MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene.

Preglednica XI: Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov v skupini premenopavznih in pomenopavznih preiskovank ter moških preiskovancev (ITM – indeks telesne mase)

	Premenopavzne preiskovanke	Pomenopavzne preiskovanke	Zdrave pomenopavzne preiskovanke	Osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	Moški
<i>Število preiskovancev</i>	57	490	235	255	117
<i>Starost (leta)</i>	45,4 ± 4,7	63,0 ± 8,4	61,5 ± 8,3	64,4 ± 8,2	67,6 ± 6,1
<i>Masa (kg)</i>	65,4 ± 11,8	69,7 ± 12,2	73,6 ± 13,0	66,0 ± 10,0	81,7 ± 12,8
<i>Višina (m)</i>	1,64 ± 0,06	1,60 ± 0,06	1,61 ± 0,06	1,59 ± 0,06	1,71 ± 0,06
<i>ITM (kg/m²)</i>	24,3 ± 4,1	27,3 ± 4,6	28,3 ± 5,1	26,2 ± 3,8	27,85 ± 3,77
<i>Pričetek menopavze (leto starosti)</i>	/	49,5 ± 4,2	49,8 ± 4,1	48,8 ± 4,5	/
<i>Trajanje menopavze (leta)</i>	/	12,2 ± 9,2	10,4 ± 8,7	15,3 ± 9,4	/

Preglednica XII: Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov v skupini osteoporoznih preiskovank, ki so se zdravile z alendronatom in raloksifonom ter skupini preiskovancev z osteoartrozo in osteoporozo z zlomom kolka (ITM – indeks telesne mase)

	Zdravljenje z alendronatom	Zdravljenje z raloksifonom	Preiskovanci z osteoartrozo	Preiskovanci z osteoporozo in zlomom kolka
<i>Število preiskovancev</i>	52	56	54	83
<i>Starost (leta)</i>	65,4 ± 6,3	60,6 ± 5,6	63,7 ± 11,6	77,4 ± 8,1
<i>Masa (kg)</i>	65,8 ± 9,7	65,5 ± 8,1	76,1 ± 14,1	68,7 ± 12,0
<i>Višina (m)</i>	1,57 ± 0,05	1,60 ± 0,06	1,65 ± 0,07	1,62 ± 0,09
<i>ITM (kg/m²)</i>	26,6 ± 3,7	25,7 ± 3,3	27,9 ± 4,6	26,2 ± 3,7

4.4.1 PREMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V statistično obdelavo smo vključili 57 premenopavznih preiskovank. V preglednicah XIII do XVII so za polimorfizma -1734C>T in -1227C>T ter njune diplotipe predstavljeni rezultati statistične analize.

Preglednica XIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1734C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC* [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katapsin K* [pmol/l]
CC	0,752 ± 0,063 [N=22]	0,886 ± 0,087 [N=21]	0,987 ± 0,087 [N=22]	0,48 ± 0,37 [N=22]	11,0 ± 5,8 [N=22]	2737 ± 1651 [N=22]	9,03 ± 3,11 [N=22]	1,4 ± 0,1 [N=22]	6,94 ± 11,36 [N=22]
CT	0,812 ± 0,081 [N=18]	0,946 ± 0,092 [N=18]	1,008 ± 0,134 [N=18]	0,61 ± 0,62 [N=18]	11,4 ± 3,8 [N=18]	2812 ± 1347 [N=17]	8,17 ± 3,24 [N=18]	1,3 ± 0,3 [N=18]	8,59 ± 20,13 [N=18]
TT	0,778 ± 0,082 [N=14]	0,918 ± 0,073 [N=14]	1,001 ± 0,112 [N=14]	0,40 ± 0,26 [N=14]	9,1 ± 3,7 [N=14]	2497 ± 1053 [N=14]	7,10 ± 2,75 [N=14]	1,3 ± 0,3 [N=14]	13,16 ± 31,31 [N=14]
p	0,048	0,099	0,841	0,345	0,176	0,817	0,192	0,673	0,672

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Za frekvence tega polimorfizma v tej skupini smo ugotovili, da niso v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, zato rezultati lahko niso zanesljivi.

V primeru MKG vratu stegenice smo ugotovili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi MKG kolka ($p=0,048$) v posameznih genotipskih podskupinah. S Scheffejevim post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi MKG vratu stegenice v genotipskih podskupinah CC in CT ($p=0,048$). Le-te so pri preiskovankah z genotipom CC nižje, kot pri tistih z genotipom CT, zato lahko sklepamo, da prisotnost alela T pri polimorfizmu -1734C>T pomeni večjo MKG vratu stegenice in zato manjše tveganje za nastanek osteoporoze.

Povprečne vrednosti MKG kolka v genotipski podskupini CT so večje kot v genotipskih podskupinah CC in TT, vendar niso statistično značilne ($p=0,099$).

Preglednica XIV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1227C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
CC	0,786 ± 0,082 [N=22]	0,931 ± 0,092 [N=22]	1,014 ± 0,116 [N=22]	0,43 ± 0,29 [N=22]	9,9 ± 4,0 [N=22]	2462 ± 1199 [N=22]	7,18 ± 3,03 [N=22]	1,3 ± 0,3 [N=22]	10,37 ± 25,23 [N=22]
CT	0,784 ± 0,081 [N=22]	0,916 ± 0,087 [N=22]	0,985 ± 0,111 [N=22]	0,64 ± 0,62 [N=22]	12,2 ± 5,5 [N=22]	3188 ± 1648 [N=21]	9,11 ± 3,37 [N=22]	1,4 ± 0,2 [N=22]	7,77 ± 18,36 [N=22]
TT	0,751 ± 0,059 [N=10]	0,873 ± 0,069 [N=9]	0,988 ± 0,093 [N=10]	0,35 ± 0,14 [N=10]	8,8 ± 3,3 [N=10]	2188 ± 951 [N=10]	8,69 ± 1,99 [N=10]	1,4 ± 0,1 [N=10]	9,27 ± 15,53 [N=10]
p	0,460	0,250	0,654	0,179	0,104	0,102	0,104	0,181	0,606

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Pri premenopavznih presiskovankah nismo ugotovili statistično značilne povezave polimorfizma -1227C>T z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

Preglednica XV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za diplotip TC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

TC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
0	0,752 ± 0,063 [N=22]	0,886 ± 0,087 [N=21]	0,987 ± 0,087 [N=22]	0,48 ± 0,37 [N=22]	11,0 ± 5,8 [N=22]	2737 ± 1651 [N=22]	9,03 ± 3,11 [N=22]	1,4 ± 0,1 [N=22]	6,95 ± 11,36 [N=22]
1	0,812 ± 0,081 [N=18]	0,946 ± 0,092 [N=18]	1,008 ± 0,134 [N=18]	0,61 ± 0,62 [N=18]	11,4 ± 3,8 [N=18]	2812 ± 1347 [N=17]	8,17 ± 3,24 [N=18]	1,3 ± 0,3 [N=18]	8,59 ± 20,13 [N=18]
2	0,778 ± 0,082 [N=14]	0,918 ± 0,073 [N=14]	1,001 ± 0,112 [N=14]	0,40 ± 0,26 [N=14]	9,1 ± 3,7 [N=14]	2497 ± 1053 [N=14]	7,10 ± 2,76 [N=14]	1,3 ± 0,3 [N=14]	13,16 ± 31,32 [N=14]
p	0,048	0,099	0,841	0,345	0,337	0,817	0,192	0,673	0,672

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

V primeru povprečnih vrednosti MKG vratu stegenice smo ugotovili statistično značilno razliko (p=0,048) med diplotipskimi podskupinami. S Scheffe post-hoc testom smo potrdili

statistično značilno razliko med diplotipsko podskupino 0 in 1 ($p=0,048$). Sklepamo lahko, da prisotnost ene kopije diplotipa TC statistično značilno vpliva na višje povprečne vrednosti MKG vratu stegenice, saj so le-te pri prisotnosti ene kopije diplotipa TC višje kot ob njegovi odsotnosti. Višje vrednosti MKG vratu stegenice pomenijo manjšo tveganje za nastanek osteoporoze.

Povprečne vrednosti MKG kolka so pri preiskovankah z eno kopijo diplotipa TC precej višje kot pri tistih, z nobeno in dvema kopijama diplotipa TC, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,099$).

Preglednica XVI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za diplotip CT (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin)

CT	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
0	0,786 ± 0,082 [N=22]	0,931 ± 0,092 [N=22]	1,014 ± 0,116 [N=22]	0,43 ± 0,29 [N=22]	9,9 ± 4,0 [N=22]	2462 ± 1199 [N=22]	7,18 ± 3,03 [N=22]	1,3 ± 0,3 [N=22]	10,37 ± 25,23 [N=22]
1	0,784 ± 0,081 [N=22]	0,916 ± 0,087 [N=22]	0,985 ± 0,111 [N=22]	0,64 ± 0,62 [N=22]	12,2 ± 5,5 [N=22]	3188 ± 1648 [N=21]	9,11 ± 3,37 [N=22]	1,4 ± 0,2 [N=22]	7,77 ± 18,36 [N=22]
2	0,751 ± 0,058 [N=10]	0,873 ± 0,069 [N=9]	0,988 ± 0,093 [N=10]	0,35 ± 0,14 [N=10]	8,8 ± 3,3 [N=10]	2188 ± 951 [N=10]	8,69 ± 1,99 [N=10]	1,4 ± 0,1 [N=10]	9,27 ± 15,53 [N=10]
p	0,460	0,250	0,654	0,179	0,104	0,102	0,104	0,181	0,606

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Pri pomenopavznih preiskovankah nismo dokazali statistično značilne povezave diplotipa CT z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih preiskovankah za diplotip CC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin)

CC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG* [pmol/l]	katapsin K* [pmol/l]
0	0,784 ± 0,076 [N=36]	0,918 ± 0,076 [N=36]	0,990 ± 0,111 [N=36]	0,46 ± 0,46 [N=36]	9,8 ± 3,6 [N=36]	2582 ± 1104 [N=35]	8,04 ± 2,69 [N=36]	1,4 ± 0,3 [N=36]	11,29 ± 24,84 [N=36]
1	0,769 ± 0,081 [N=18]	0,908 ± 0,109 [N=18]	1,012 ± 0,108 [N=18]	0,58 ± 0,43 [N=18]	12,4 ± 6,1 [N=18]	2922 ± 1858 [N=18]	8,66 ± 3,86 [N=18]	1,3 ± 0,2 [N=18]	4,74 ± 5,89 [N=18]
p	0,507	0,708	0,489	0,375	0,104	0,483	0,542	0,116	0,949

* - Mann-Whitney, brez oznak - T-test

Diploptiski podskupini 1 in 2 smo združili, ker sta bili samo dve preiskovank z dvema kopijama diplotipa CC. Pri premenopavznih preiskovankah nismo dokazali statistično značilne povezave diplotipa CC z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

4.4.2 POMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V statistično obdelavo smo vključili 480 pomenopavznih preiskovank. V preglednicah XVIII do XXII so za polimorfizem -1734C>T in -1227C>T ter njune diplotipe predstavljeni rezultati statistične analize.

Preglednica XVIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1734C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
CC	0,699 ± 0,118 [N=155]	0,840 ± 0,141 [N=154]	0,857 ± 0,155 [N=154]	0,34 ± 0,38 [N=53]	21,3 ± 12,0 [N=46]	3997 ± 2197 [N=52]	11,43 ± 5,28 [N=54]	5,7 ± 1,8 [N=65]	2,46 ± 2,38 [N=17]
CT	0,687 ± 0,126 [N=206]	0,827 ± 0,142 [N=206]	0,852 ± 0,173 [N=206]	0,38 ± 0,53 [N=65]	21,2 ± 13,0 [N=65]	4151 ± 2014 [N=67]	13,25 ± 5,45 [N=68]	5,3 ± 1,6 [N=82]	4,05 ± 5,47 [N=25]
TT	0,695 ± 0,124 [N=86]	0,841 ± 0,148 [N=85]	0,873 ± 0,158 [N=85]	0,35 ± 0,39 [N=32]	23,3 ± 12,1 [N=34]	3806 ± 1788 [N=32]	12,28 ± 4,20 [N=31]	5,8 ± 1,9 [N=44]	2,54 ± 2,45 [N=10]
p	0,670	0,626	0,604	0,813	0,699	0,727	0,155	0,120	0,958

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Pri pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili statistično značilne povezave polimorfizma -1734C>T z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

Preglednica XIX: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1227C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

Ge	MKG f** [kg/m ²]	MKG t** [kg/m ²]	MKG l** [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP* [μg/l]	OPG* [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
CC	0,695 ± 0,125 [N=154]	0,836 ± 0,144 [N=153]	0,867 ± 0,160 [N=153]	0,34 ± 0,37 [N=154]	23,9 ± 12,6 [N=55]	3891 ± 1757 [N=56]	13,08 ± 4,94 [N=57]	5,5 ± 1,8 [N=73]	2,19 ± 2,02 [N=16]
CT	0,699 ± 0,128 [N=201]	0,844 ± 0,152 [N=200]	0,870 ± 0,175 [N=200]	0,39 ± 0,54 [N=63]	19,8 ± 11,7 [N=64]	4208 ± 2193 [N=64]	12,57 ± 5,64 [N=67]	5,3 ± 1,6 [N=79]	3,86 ± 5,19 [N=29]
TT	0,680 ± 0,107 [N=85]	0,816 ± 0,116 [N=85]	0,821 ± 0,139 [N=85]	0,32 ± 0,37 [N=32]	21,8 ± 13,4 [N=25]	3890 ± 2166 [N=30]	10,75 ± 4,31 [N=29]	6,1 ± 1,9 [N=39]	3,07 ± 2,88 [N=7]
p	0,260	0,155	0,157	0,505	0,195	0,639	0,189	0,121	0,885

* - Kruskal-Wallis, ** - ANCOVA, brez oznak – ANOVA

Pri statistični analizi smo ugotovili razliko v starosti preiskovank v različnih genotipskih podskupinah, zato smo za analizo uporabili test ANCOVA. Rezultati vseh testov so

pokazali, da pri pomenopavznih preiskovankah ni statistično značilne povezave polimorfizma -1227C>T z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

Preglednica XX: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za diplotip TC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

TC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
0	0,700 ± 0,119 [N=153]	0,842 ± 0,143 [N=152]	0,859 ± 0,155 [N=153]	0,34 ± 0,38 [N=53]	21,3 ± 12,0 [N=46]	3997 ± 2197 [N=52]	11,43 ± 5,28 [N=54]	5,7 ± 1,8 [N=65]	2,46 ± 2,38 [N=17]
1	0,687 ± 0,125 [N=204]	0,827 ± 0,142 [N=204]	0,853 ± 0,173 [N=203]	0,38 ± 0,53 [N=65]	21,2 ± 12,9 [N=66]	4151 ± 2014 [N=67]	13,19 ± 5,44 [N=69]	5,3 ± 1,6 [N=83]	4,05 ± 5,47 [N=25]
2	0,699 ± 0,123 [N=83]	0,846 ± 0,147 [N=82]	0,878 ± 0,157 [N=82]	0,35 ± 0,39 [N=32]	23,3 ± 12,3 [N=33]	3806 ± 1788 [N=32]	12,40 ± 4,22 [N=30]	5,8 ± 1,9 [N=43]	2,54 ± 2,45 [N=10]
p	0,565	0,480	0,519	0,813	0,711	0,727	0,178	0,155	0,956

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Pri pomenopavznih preiskovankah nismo dokazali statistično značilne povezave diplotipa TC z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

Preglednica XXI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za diplotip CT (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

CT	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG* [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
0	0,695 ± 0,124 [N=156]	0,836 ± 0,143 [N=155]	0,866 ± 0,159 [N=155]	0,34 ± 0,37 [N=55]	23,9 ± 12,5 [N=57]	3891 ± 1757 [N=57]	13,01 ± 4,93 [N=58]	5,6 ± 1,8 [N=74]	2,19 ± 2,02 [N=16]
1	0,670 ± 0,128 [N=159]	0,844 ± 0,153 [N=198]	0,871 ± 0,175 [N=198]	0,39 ± 0,54 [N=63]	19,8 ± 11,8 [N=63]	4208 ± 2193 [N=64]	12,63 ± 5,66 [N=66]	5,3 ± 1,6 [N=78]	3,86 ± 5,19 [N=29]
2	0,680 ± 0,108 [N=85]	0,817 ± 0,117 [N=85]	0,821 ± 0,140 [N=85]	0,32 ± 0,37 [N=32]	21,8 ± 13,4 [N=25]	3890 ± 2166 [N=30]	10,75 ± 4,31 [N=29]	6,1 ± 1,9 [N=39]	3,07 ± 2,88 [N=7]
p	0,500	0,363	0,048	0,505	0,186	0,639	0,145	0,107	0,885

* - Kruskal-Wallis, brez oznak – ANOVA

V primeru povprečnih vrednosti MKG ledvenih vretenc smo dokazali statistično značilno razliko med diplotipskimi podskupinami ($p=0,048$). S Scheffe post-hoc testom nismo dokazali statistično značilne razlike med diplotipskimi podskupinami, čeprav so povprečne vrednosti MKG ledvenih vretenc pri preiskovankah z eno kopijo diplotipa CT precej višje, kot pri teh z dvema kopijama.

Preglednica XXII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih preiskovankah za diplotip CC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin)

CC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
0	0,686 ± 0,119 [N=309]	0,828 ± 0,137 [N=308]	0,851 ± 0,163 [N=307]	0,36 ± 0,48 [N=108]	21,5 ± 12,6 [N=104]	4018 ± 2040 [N=106]	12,17 ± 4,89 [N=105]	5,7 ± 1,8 [N=138]	3,85 ± 4,81 [N=36]
1	0,716 ± 0,132 [N=123]	0,859 ± 0,159 [N=122]	0,881 ± 0,166 [N=123]	0,37 ± 0,38 [N=40]	22,0 ± 11,7 [N=38]	4013 ± 2040 [N=43]	12,79 ± 5,71 [N=44]	5,4 ± 1,5 [N=50]	1,87 ± 1,66 [N=16]
2	0,643 ± 0,075 [N=8]	0,776 ± 0,099 [N=8]	0,868 ± 0,151 [N=8]	0,20 ± 0,00 [N=2]	28,3 ± 15,5 [N=3]	4648 ± 1814 [N=2]	14,62 ± 7,69 [N=4]	3,5 ± 1,6 [N=3]	/
p	0,036	0,069	0,220	0,472	0,638	0,910	0,558	0,547	0,351

* - Mann-Whitney, brez oznak - ANOVA

Statistično značilno razliko med diplotipskimi podskupinami smo ugotovili v primeru povprečnih vrednosti MKG vratu stegenice ($p=0,036$). S Scheffe post-hoc testom za povprečne vrednosti MKG vratu stegenice nismo dokazali statistično značilne razlike med posameznimi diplotipskimi podskupinami, čeprav so povprečne vrednosti MKG vratus stegenice pri preiskovankah z dvema kopijama diplotipa CC veliko manjše, kot pri tistih z eno kopijo diplotipa CC.

Povprečne vrednosti MKG kolka so pri preiskovankah z dvema kopijama diplotipa CC prav tako precej višje, kot pri tistih z eno kopijo tega diplotipa, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,069$).

V diplotipski podskupini 2 je bilo zelo malo preiskovank, zato bi bilo potrebno rezultate preveriti na večjem številu preiskovank.

Nadalje smo skupino pomenopavznih preiskovank razdelili v dve podskupini: – zdrave preiskovanke in osteoporozne preiskovanke. Kriterij za razdelitev je bila T – vrednost (-2,5 SD).

4.4.2.1 Zdrave preiskovanke

V statistično obdelavo smo vključili 235 zdravih pomenopavznih preiskovank (s T-vrednostjo > -2,5 SD). V preglednicah XXIII do XXVII so za polimorfizem -1734C>T in polimorfizem -1227C>T ter njune diplotipe podane povprečne vrednosti in SD parametrov ter vrednosti p.

Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1734C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegnenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
CC	0,760 ± 0,108 [N=86]	0,910 ± 0,132 [N=85]	0,957 ± 0,121 [N=85]	0,34 ± 0,36 [N=37]	17,0 ± 5,4 [N=26]	3877 ± 2044 [N=35]	10,72 ± 2,30 [N=13]	5,2 ± 1,6 [N=37]	2,54 ± 2,57 [N=14]
CT	0,765 ± 0,124 [N=95]	0,915 ± 0,137 [N=95]	0,981 ± 0,158 [N=95]	0,46 ± 0,61 [N=39]	13,4 ± 5,4 [N=29]	3997 ± 1786 [N=38]	12,09 ± 4,54 [N=20]	4,9 ± 1,5 [N=39]	4,89 ± 6,00 [N=19]
TT	0,765 ± 0,121 [N=41]	0,928 ± 0,138 [N=41]	0,991 ± 0,119 [N=41]	0,36 ± 0,38 [N=23]	15,2 ± 4,0 [N=16]	3748 ± 1743 [N=22]	12,59 ± 4,63 [N=9]	5,3 ± 1,6 [N=23]	3,21 ± 2,51 [N=7]
p	0,958	0,786	0,350	0,627	0,041	0,882	0,505	0,497	0,642

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Statistično značilno razliko smo ugotovili v primeru povprečnih vrednosti osteokalcina (p=0,041) v posameznih genotipskih podskupinah. S Scheffe post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi osteokalcina v genotipskih podskupinah CC in CT (p=0,041). Iz tega lahko sklepamo, da prisotnost polimorfizma -1734C>T na enem alelu (genotip CT) statistično značilno vpliva na povprečne vrednosti osteokalcina, saj so le-te pri preiskovankah z genotipom CT nižje od preiskovank z genotipom CC. Manjše povprečne vrednosti osteokalcina so kazalec manjše tvorbe kostnine, kar pomeni večje tveganje za nastanek osteoporoze.

Preglednica XXIV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem -1227C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegnenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
CC	0,769 ± 0,114 [N=76]	0,922 ± 0,125 [N=76]	0,984 ± 0,127 [N=76]	0,35 ± 0,36 [N=40]	15,3 ± 5,0 [N=28]	3707 ± 1749 [N=39]	13,13 ± 4,09 [N=14]	5,2 ± 1,5 [N=40]	2,53 ± 2,20 [N=11]
CT	0,769 ± 0,128 [N=101]	0,925 ± 0,154 [N=100]	0,993 ± 0,154 [N=100]	0,49 ± 0,64 [N=39]	14,0 ± 5,5 [N=29]	4065 ± 1865 [N=37]	11,28 ± 4,09 [N=22]	4,8 ± 1,3 [N=39]	4,59 ± 5,58 [N=23]
TT	0,743 ± 0,093 [N=42]	0,887 ± 0,098 [N=42]	0,920 ± 0,103 [N=42]	0,31 ± 0,30 [N=20]	17,1 ± 5,4 [N=14]	3951 ± 2118 [N=19]	10,42 ± 2,74 [N=6]	5,3 ± 1,9 [N=20]	2,95 ± 3,14 [N=6]
p	0,456	0,278	0,014	0,453	0,202	0,699	0,270	0,332	0,809

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

V primeru povprečnih vrednosti MKG ledvenih vretenc smo ugotovili statistično značilno razliko ($p=0,014$) v posameznih genotipskih podskupinah. S Scheffe post-hoc testom smo pokazali statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi MKG kolka v genotipskih podskupinah CT in TT ($p=0,016$). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma -1227C>T na obeh alelih (genotip TT) statistično značilno vpliva na povprečne vrednosti MKG ledvenih vretenc. Le-te so pri preiskovankah z genotipom TT statistično značilno nižje kot pri preiskovankah z genotipom CT. Manjše povprečne vrednosti MKG ledvenih vretenc lahko pomenijo večje tveganje za nastanek osteoporoze.

Preglednica XXV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za diplotip TC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin)

TC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
0	0,762 ± 0,110 [N=85]	0,913 ± 0,133 [N=84]	0,959 ± 0,121 [N=85]	0,34 ± 0,36 [N=37]	17,0 ± 5,4 [N=26]	3877 ± 2044 [N=35]	10,72 ± 2,30 [N=13]	5,2 ± 1,6 [N=37]	2,54 ± 2,57 [N=14]
1	0,765 ± 0,124 [N=93]	0,914 ± 0,138 [N=93]	0,985 ± 0,159 [N=92]	0,46 ± 0,61 [N=39]	13,4 ± 5,4 [N=29]	3997 ± 1786 [N=38]	12,09 ± 4,54 [N=20]	4,9 ± 1,5 [N=39]	4,89 ± 6,00 [N=19]
2	0,766 ± 0,121 [N=41]	0,930 ± 0,137 [N=41]	0,990 ± 0,121 [N=41]	0,36 ± 0,38 [N=23]	15,2 ± 4,0 [N=16]	3748 ± 1743 [N=22]	12,59 ± 4,63 [N=9]	5,3 ± 1,6 [N=23]	3,21 ± 2,51 [N=7]
p	0,973	0,798	0,369	0,627	0,041	0,882	0,505	0,497	0,642

* - Kruskal-Wallis, brez oznak * - ANOVA

Statistično značilno razliko med diplotipskimi podskupinami smo ugotovili v primeru povprečnih vrednosti osteokalcina ($p=0,041$). S Scheffe post-hoc testom smo dokazali statistično značilno razliko med diplotipskima podskupinama 0 in 1 ($p=0,041$). Prisotnost ene kopije diplotipa TC tako vpliva na nižje vrednosti osteokalcina, saj so povprečne vrednosti osteokalcina pri preiskovankah z eno kopijo diplotipa TC nižje, kot pri teh z nobeno kopijo tega diplotipa. Nižje vrednosti osteokalcina kažejo na manjšo tvorbo kostnine in večje tveganje za nastanek osteoporoze.

Preglednica XXVI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za diplotip CT (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

CT	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
0	0,769 ± 0,114 [N=76]	0,923 ± 0,124 [N=76]	0,983 ± 0,127 [N=76]	0,35 ± 0,36 [N=40]	15,3 ± 5,0 [N=28]	3707 ± 1749 [N=39]	13,13 ± 4,09 [N=14]	5,3 ± 1,6 [N=40]	2,53 ± 2,20 [N=11]
1	0,768 ± 0,127 [N=101]	0,924 ± 0,154 [N=100]	0,994 ± 0,153 [N=100]	0,49 ± 0,64 [N=39]	14,0 ± 5,5 [N=29]	4065 ± 1865 [N=37]	11,28 ± 4,09 [N=22]	4,8 ± 1,5 [N=39]	4,59 ± 5,58 [N=23]
2	0,744 ± 0,095 [N=42]	0,888 ± 0,0993 [N=42]	0,920 ± 0,105 [N=42]	0,31 ± 0,30 [N=20]	17,1 ± 5,4 [N=14]	3951 ± 2118 [N=19]	10,42 ± 2,74 [N=6]	5,3 ± 1,6 [N=20]	2,95 ± 3,14 [N=6]
p	0,477	0,320	0,012	0,453	0,202	0,699	0,270	0,332	0,809

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

V primeru povprečnih vrednosti MKG ledvenih vretenc smo dokazali statistično značilno razliko ($p=0,012$) med diplotipskimi podkupinami. S Scheffe post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi MKG ledvenih vretenc v diplotipskih podkupinah 1 in 2 ($p=0,014$). Sklepamo lahko, da prisotnost dveh kopij diplotipa CT vpliva na nižje vrednosti MKG ledvenih vretenc, saj so povprečene vrednosti le-teh pri preiskovankah z dvema kopijama diplotipa CT nižje kot pri tistih z eno kopijo tega diplotipa. Nižja MKG ledvenih vretenc pomeni večje tveganje za nastanek osteoporoze.

Preglednica XXVII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za diplotip CC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

CC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K* [pmol/l]
0	0,755 ± 0,118 [N=145]	0,909 ± 0,134 [N=145]	0,970 ± 0,142 [N=144]	0,41 ± 0,52 [N=67]	14,8 ± 4,9 [N=49]	4010 ± 1841 [N=64]	11,57 ± 4,36 [N=30]	5,0 ± 1,6 [N=67]	4,57 ± 5,17 [N=28]
1	0,780 ± 0,115 [N=74]	0,932 ± 0,137 [N=73]	0,987 ± 0,131 [N=74]	0,37 ± 0,39 [N=32]	15,9 ± 6,2 [N=22]	3658 ± 1902 [N=31]	12,28 ± 2,89 [N=12]	5,2 ± 1,3 [N=32]	1,93 ± 1,86 [N=12]
p	0,133	0,234	0,380	0,930	0,402	0,390	0,609	0,607	0,161

* - Mann-Whitney, brez oznak - T-test

Diplotipski podskupini 1 in 2 smo združili, ker so bile samo štiri preiskovanke z dvema kopijama diplotipa CC.

Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah nismo dokazali statistično značilne povezave diplotipa CC z MKG ter biokemijskimi kazalci kostne premene.

4.4.2.2 Osteoporozne preiskovanke

V statistično obdelavo smo vključili 255 osteoporoznih pomenopavznih preiskovank (s T-vrednostjo < -2,5 SD). V preglednicah XXVIII do XXXII so za polimorfizem -1734C>T in polimorfizem -1227C>T ter njune diplotipe podane povprečne vrednosti in SD parametrov ter vrednosti p.

Preglednica XXVIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporozi pomenopavskih preiskovankah za polimorfizem -1734C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]
CC	0,622 ± 0,079 [N=69]	0,755 ± 0,100 [N=69]	0,733 ± 0,086 [N=69]	0,31 ± 0,42 [N=16]	27,0 ± 15,6 [N=20]	4246 ± 2531 [N=17]	11,66 ± 5,92 [N=41]	6,4 ± 2,0 [N=28]
CT	0,621 ± 0,082 [N=111]	0,753 ± 0,0964 [N=111]	0,741 ± 0,088 [N=111]	0,26 ± 0,34 [N=26]	27,5 ± 13,9 [N=36]	4353 ± 2297 [N=29]	13,74 ± 5,76 [N=48]	5,6 ± 1,6 [N=43]
TT	0,631 ± 0,088 [N=45]	0,760 ± 0,106 [N=44]	0,763 ± 0,010 [N=44]	0,31 ± 0,43 [N=9]	30,6 ± 12,3 [N=18]	3932 ± 1973 [N=10]	12,15 ± 4,13 [N=22]	6,5 ± 2,0 [N=21]
p	0,780	0,912	0,208	0,851	0,686	0,885	0,192	0,097

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Koncentracije OPG so pri preiskovankah z genotipom CT precej nižje, kot pri tistih z genotipom CC in TT, vendar razlika ni statistično značilna (p=0,097).

Preglednica XXIX: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporozi pomenopavskih preiskovankah za polimorfizem -1227C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]
CC	0,623 ± 0,086 [N=78]	0,751 ± 0,107 [N=77]	0,753 ± 0,091 [N=77]	0,33 ± 0,40 [N=15]	32,5 ± 12,1 [N=28]	4289 ± 1756 [N=18]	13,07 ± 5,23 [N=43]	5,9 ± 2,0 [N=33]
CT	0,628 ± 0,079 [N=100]	0,763 ± 0,098 [N=100]	0,748 ± 0,085 [N=100]	0,24 ± 0,30 [N=24]	24,6 ± 13,3 [N=35]	4403 ± 2601 [N=27]	13,19 ± 6,21 [N=45]	5,8 ± 1,7 [N=40]
TT	0,617 ± 0,081 [N=43]	0,748 ± 0,088 [N=43]	0,724 ± 0,095 [N=43]	0,33 ± 0,49 [N=12]	27,8 ± 17,9 [N=11]	3785 ± 2349 [N=11]	10,83 ± 4,68 [N=23]	6,8 ± 1,6 [N=19]
p	0,765	0,623	0,221	0,485	0,079	0,754	0,212	0,106

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Koncentracije osteokalcina so pri preiskovankah z genotipom CT precej nižje kot pri tistih, z genotipom CC in TT, vendar razlika ni statistično značilna (p=0,079).

Preglednica XXX: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za diplotip TC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

TC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l* [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]
0	0,623 ± 0,080 [N=68]	0,755 ± 0,101 [N=68]	0,733 ± 0,087 [N=68]	0,31 ± 0,42 [N=16]	27,0 ± 15,6 [N=20]	4246 ± 2531 [N=17]	11,66 ± 5,92 [N=41]	6,4 ± 2,0 [N=28]
1	0,621 ± 0,083 [N=111]	0,754 ± 0,097 [N=111]	0,744 ± 0,087 [N=11]	0,26 ± 0,34 [N=26]	27,4 ± 13,8 [N=37]	4353 ± 2297 [N=29]	13,64 ± 5,75 [N=49]	5,6 ± 1,5 [N=44]
2	0,633 ± 0,085 [N=42]	0,762 ± 0,102 [N=41]	0,766 ± 0,098 [N=41]	0,31 ± 0,43 [N=9]	31,0 ± 12,5 [N=17]	3932 ± 1973 [N=10]	12,31 ± 4,15 [N=21]	6,4 ± 2,1 [N=20]
p	0,747	0,894	0,142	0,851	0,625	0,885	0,235	0,121

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah nismo dokazali statistično značilne povezave diplotipa TC z MKG ter biokemijskimi kazalci kostne premene.

Preglednica XXXI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za diplotip CT (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

CT	MKG f [kg/m ²]	MKG t* [kg/m ²]	MKG l* [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]
0	0,625 ± 0,086 [N=76]	0,753 ± 0,106 [N=76]	0,754 ± 0,091 [N=76]	0,33 ± 0,40 [N=40]	32,2 ± 12,0 [N=28]	4289 ± 1756 [N=39]	12,97 ± 5,21 [N=14]	5,9 ± 2,0 [N=40]
1	0,627 ± 0,080 [N=101]	0,762 ± 0,098 [N=100]	0,747 ± 0,085 [N=100]	0,24 ± 0,30 [N=39]	24,7 ± 13,5 [N=29]	4403 ± 2601 [N=37]	13,30 ± 6,24 [N=22]	5,8 ± 1,7 [N=39]
2	0,617 ± 0,081 [N=42]	0,748 ± 0,088 [N=42]	0,724 ± 0,095 [N=42]	0,33 ± 0,49 [N=20]	27,8 ± 17,9 [N=14]	3785 ± 2349 [N=19]	10,83 ± 4,68 [N=6]	6,8 ± 1,6 [N=20]
p	0,820	0,633	0,108	0,485	0,097	0,754	0,205	0,103

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Koncentracije osteokalcina so pri preiskovankah z eno kopijo diplotipa CT precej nižje kot pri tistih, z nobeno in dvema kopijama tega diplotipa, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,097$).

Preglednica XXXII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za diplotip CC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

CC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]
0	0,625 ± 0,081 [N=164]	0,757 ± 0,091 [N=163]	0,746 ± 0,093 [N=163]	0,28 ± 0,40 [N=41]	27,4 ± 14,4 [N=55]	4031 ± 2333 [N=42]	12,41 ± 5,09 [N=75]	6,3 ± 1,8 [N=71]
1	0,622 ± 0,086 [N=57]	0,753 ± 0,119 [N=57]	0,742 ± 0,079 [N=57]	0,33 ± 0,31 [N=10]	30,1 ± 12,6 [N=19]	4889 ± 2069 [N=14]	13,16 ± 6,53 [N=36]	5,4 ± 1,9 [N=21]
p	0,806	0,841	0,765	0,240	0,480	0,226	0,511	0,071

* - Mann-Whitney, brez oznak - T-test

Diplotipski podskupini 1 in 2 smo združili, ker sto bile samo štiri preiskovanke z dvema kopijama diplotipa CC.

Koncentracije OPG so pri preiskovankah z dvema ali eno kopijo diplotipa CC precej nižje, kot pri tistih z nobeno kopijo diplotipa CC, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,071$).

4.4.3 MOŠKI

V statistično obdelavo smo vključili 57 moških. V preglednicah XXXIII do XXXVII so za polimorfizem -1734C>T in polimorfizem -1227C>T ter njune diplotipe podane povprečne povprečne vrednosti in SD parametrov ter vrednosti p.

Preglednica XXXIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za polimorfizem -1734C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	OPG [pmol/l]
CC	0,809 ± 0,156 [N=29]	1,040 ± 0,177 [N=29]	1,042 ± 0,184 [N=39]	0,18 ± 0,09 [N=8]	9,6 ± 3,2 [N=8]	1314 ± 442 [N=6]	6,1 ± 2,0 [N=8]
CT	0,814 ± 0,144 [N=40]	1,023 ± 0,132 [N=40]	1,052 ± 0,177 [N=49]	0,16 ± 0,14 [N=10]	10,4 ± 6,5 [N=10]	2648 ± 1173 [N=9]	5,2 ± 1,3 [N=10]
TT	0,821 ± 0,182 [N=15]	1,022 ± 0,191 [N=15]	1,115 ± 0,162 [N=21]	0,28 ± 0,10 [N=4]	9,7 ± 7,0 [N=4]	1775 ± 1017 [N=4]	4,7 ± 1,2 [N=4]
p	0,971	0,894	0,284	0,232	0,944	0,051	0,287

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Koncentracije CTX so pri preiskovancih z genotipom CT precej višje, kot pri tistih z genotipom CC in TT, vendar razlika ni statistično značilna (p=0,051).

Preglednica XXXIV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za polimorfizem -1227C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

Ge	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	OPG [pmol/l]
CC	0,838 ± 0,167 [N=23]	1,020 ± 0,185 [N=23]	1,101 ± 0,148 [N=29]	0,17 ± 0,15 [N=7]	9,9 ± 6,5 [N=7]	2522 ± 1300 [N=7]	4,8 ± 1,1 [N=7]
CT	0,811 ± 0,138 [N=40]	1,026 ± 0,116 [N=40]	1,037 ± 0,179 [N=54]	0,21 ± 0,11 [N=9]	10,8 ± 6,0 [N=9]	2028 ± 1096 [N=9]	5,1 ± 1,3 [N=9]
TT	0,800 ± 0,176 [N=19]	1,051 ± 0,208 [N=19]	1,045 ± 0,188 [N=23]	0,17 ± 0,10 [N=6]	9,0 ± 3,3 [N=6]	1393 ± 445 [N=5]	5,4 ± 1,6 [N=6]
p	0,706	0,808	0,260	0,710	0,834	0,225	0,088

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Koncentracije OPG so pri preiskovancih z genotipom TT višje, kot pri tistih z genotipom CC in CT, vendar razlika ni statistično značilna (p=0,088).

Preglednica XXXV: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za diplotip TC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

TC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	OPG [pmol/l]
0	0,8114 ± 0,158 [N=28]	1,044 ± 0,179 [N=28]	1,041 ± 0,186 [N=38]	0,18 ± 0,0886 [N=8]	9,6 ± 3,2 [N=8]	1314 ± 442 [N=6]	6,1 ± 2,0 [N=8]
1	0,814 ± 0,144 [N=40]	1,023 ± 0,132 [N=40]	1,052 ± 0,177 [N=49]	0,16 ± 0,14 [N=10]	10,4 ± 6,5 [N=10]	2648 ± 1173 [N=9]	5,2 ± 1,3 [N=10]
2	0,830 ± 0,185 [N=14]	1,022 ± 0,198 [N=14]	1,097 ± 0,140 [N=19]	0,28 ± 0,10 [N=4]	9,7 ± 7,0 [N=4]	1775 ± 1017 [N=4]	4,7 ± 1,6 [N=4]
p	0,933	0,853	0,515	0,138	0,944	0,051	0,287

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Koncentracije CTX so pri preiskovancih z eno kopijo diplotipa TC precej višje, kot pri tistih z nobeno ali dvema kopijama diplotipa CC, vendar razlika ni statistično značilna (p=0,051).

Preglednica XXXVI: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za diplotip CT (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG - osteoprotegerin)

CT	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	OPG [pmol/l]
0	0,838 ± 0,167 [N=23]	1,020 ± 0,185 [N=23]	1,101 ± 0,148 [N=29]	0,17 ± 0,15 [N=7]	9,9 ± 6,5 [N=7]	2522 ± 1300 [N=7]	4,8 ± 1,1 [N=7]
1	0,811 ± 0,138 [N=40]	1,026 ± 0,116 [N=40]	1,037 ± 0,179 [N=54]	0,21 ± 0,11 [N=9]	10,8 ± 6,0 [N=9]	2028 ± 1096 [N=7]	5,1 ± 1,3 [N=9]
2	0,800 ± 0,176 [N=19]	1,051 ± 0,208 [N=19]	1,045 ± 0,188 [N=23]	0,17 ± 0,10 [N=6]	9,0 ± 3,3 [N=6]	1393 ± 445 [N=5]	6,6 ± 1,9 [N=6]
p	0,706	0,808	0,260	0,728	0,834	0,225	0,088

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Koncentracije OPG so pri preiskovancih z dvema kopijama diplotipa CC precej višje, kot pri tistih z eno ali nobeno kopijo diplotipa CC, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,088$).

Preglednica XXXVII: Povprečne vrednosti in SD MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških za diplotip CC (N – število preiskovancev, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, MKG l – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C – terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin)

CC	MKG f [kg/m ²]	MKG t [kg/m ²]	MKG l [kg/m ²]	RANKL* [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	OPG [pmol/l]
0	0,808 ± 0,161 [N=64]	1,032 ± 0,166 [N=64]	1,054 ± 0,172 [N=81]	0,21 ± 0,11 [N=17]	9,8 ± 5,5 [N=17]	1823 ± 907 [N=15]	5,6 ± 1,7 [N=17]
1	0,843 ± 0,128 [N=18]	1,023 ± 0,139 [N=18]	1,064 ± 0,183 [N=25]	0,10 ± 0,10 [N=5]	10,6 ± 5,4 [N=5]	2868 ± 1517 [N=4]	4,9 ± 1,1 [N=5]
p	0,402	0,842	0,786	0,053	0,786	0,092	0,366

* - Mann-Whitney, brez oznak - T-test

Diplotipske podskupine 2 ni, ker ni bilo nobenega preiskovanca z dvema kopijama diplotipa CC.

Koncentracije CTX so pri preiskovancih z eno ali dvema kopijama diplotipa CC precej višje ter koncentracije RANKL precej nižje, kot pri tistih z nobeno kopijo diplotipa CC, vendar pri obeh razlika ni statistično značilna (za CTX $p=0,092$ in za RANKL $p=0,053$).

4.4.4 ZDRAVLJENJE Z ALENDRONATOM

V statistično obdelavo smo vključili 52 pomenopavznih osteoporoznih preiskovank, ki so se zdravile z alendronatom. V preglednicah XXXVIII do XLII so za polimorfizem -1734C>T in polimorfizem -1227C>T ter njune diplotipe podane povprečne vrednosti in SD parametrov ter vrednosti p.

Preglednica XXXVIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za polimorfizem -1734C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, DPYR - deoksipiridinolidin)

Ge	dMKG l [%]	dMKG t [%]	dOC [%]	dBALP [%]	dDPYR [%]
CC	8,148 ± 4,708 [N=20]	5,029 ± 3,610 [N=20]	51,00 ± 18,71 [N=20]	38,69 ± 13,20 [N=15]	66,68 ± 30,69 [N=22]
CT	4,843 ± 3,906 [N=19]	3,464 ± 2,699 [N=19]	61,82 ± 22,96 [N=19]	53,53 ± 40,13 [N=14]	75,96 ± 28,66 [N=17]
TT	6,794 ± 4,653 [N=5]	2,866 ± 1,908 [N=5]	60,41 ± 28,74 [N=5]	29,41 ± 8,38 [N=4]	71,06 ± 40,72 [N=7]
p	0,073	0,196	0,288	0,157	0,664

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

MKG ledvenih vretenc se je po enoletnem zdravljenju z alendronatom pri preiskovankah z genotipom CT precej manj povečala, kot pri tistih z genotipom CC in CT, vendar razlika ni statistično značilna (p=0,073).

Preglednica XXXIX: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za polimorfizem -1227C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, DPYR - deoksipiridinolidin)

Ge	dMKG l [%]	dMKG t [%]	dOC [%]	dBALP [%]	dPYR [%]
CC	6,158 ± 2,812 [N=16]	3,753 ± 2,991 [N=16]	56,27 ± 23,30 [N=16]	48,71 ± 44,20 [N=13]	74,88 ± 32,36 [N=19]
CT	4,932 ± 5,057 [N=17]	4,487 ± 3,879 [N=17]	61,30 ± 23,92 [N=17]	41,63 ± 11,55 [N=13]	64,18 ± 28,63 [N=14]
TT	9,688 ± 4,540 [N=11]	4,036 ± 2,153 [N=11]	50,38 ± 15,99 [N=11]	39,00 ± 9,51 [N=7]	71,88 ± 33,22 [N=13]
p	0,020	0,804	0,527	0,512	0,625

* - Kruskal-Wallis, brez oznake - ANOVA

Za frekvence tega polimorfizma v tej skupini smo ugotovili, da ni v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, zato rezultati lahko niso zanesljivi.

V primeru spremembe MKG ledvenih vretenc smo opazili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi spremembe MKG ledvenih vretenc v posameznih genotipskih podskupinah (p=0,020). S Scheffe post-hoc testom smo dokazali statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi spremembe MKG ledvenih vretenc v genotipskih

skupinah CT in TT ($p=0,022$). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma -1227C>T na obeh alelih (genotip TT) statistično značilno vpliva na odzivnost zdravljenja z alendronatom, saj se je po enoletnem zdravljenju z alendronatom statistično značilno bolj povečala MKG ledvenih vretenc pri preiskovankah z genotipom TT, kot pri tistih z genotipom CT. Tako lahko prisotnost polimorfizma -1227C>T na obeh alelih (genotip TT) pomeni večjo odzivnost na zdravljenje z alendronatom. Rezultate za to skupino preiskovank bi bilo potrebno preveriti na večjem številu preiskovancev.

Preglednica XL: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za diplotip TC (N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, DPYR - deoksipiridinolidin)

TC	dMKG l [%]	dMKG t [%]	dOC [%]	dBALP [%]*	dPYR [%]
0	8,148 ± 4,708 [N=20]	5,029 ± 3,610 [N=20]	51,00 ± 18,71 [N=20]	38,69 ± 13,20 [N=15]	66,68 ± 30,69 [N=22]
1	4,843 ± 3,906 [N=19]	3,464 ± 2,699 [N=19]	61,82 ± 22,96 [N=19]	53,53 ± 40,13 [N=14]	75,96 ± 28,66 [N=17]
2	6,794 ± 4,653 [N=5]	2,866 ± 1,908 [N=5]	60,41 ± 28,74 [N=5]	29,41 ± 8,38 [N=4]	71,06 ± 40,72 [N=7]
p	0,073	0,196	0,288	0,157	0,664

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

MKG ledvenih vretenc se je po enoletnem zdravljenju z alendronatom pri preiskovankah z eno kopijo diplotipa TC precej manj povečala, kot pri tistih nobeno ali dvema kopijama diplotipa TC, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,073$).

Preglednica XLI: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za diplotip CT (N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, DPYR - deoksipiridinolidin)

CT	dMKG l [%]	dMKG t [%]	dOC [%]*	dBALP [%]*	dPYR [%]
0	6,158 ± 2,812 [N=16]	3,753 ± 2,991 [N=16]	56,27 ± 23,30 [N=16]	48,71 ± 44,20 [N=13]	74,88 ± 32,36 [N=19]
1	4,932 ± 5,057 [N=17]	4,487 ± 3,879 [N=17]	61,30 ± 23,92 [N=17]	41,63 ± 11,55 [N=13]	64,18 ± 28,63 [N=14]
2	9,688 ± 4,540 [N=11]	4,036 ± 2,153 [N=11]	50,38 ± 15,99 [N=11]	39,00 ± 9,51 [N=7]	71,88 ± 33,22 [N=13]
p	0,020	0,804	0,527	0,512	0,736

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Statistično značilno razliko med posameznimi diplotipskimi podskupinami smo ugotovili v primeru povprečnih vrednosti sprememb MKG ledvenih vretenc ($p=0,020$). S Scheffé post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko med diplotipskima podskupinama 1 in 2 ($p=0,022$). MKG ledvenih vretenc se je v povprečju pri preiskovankah z dvema kopijama diplotipa CT bolj povečala, kot pri tistih z eno kopijo diplotipa CT. Sklepamo lahko, da prisotnost dveh kopij diplotipa CT poveča odzivnost na zdravljenje z alendronatom. Rezultate v tej skupini preiskovank bi bilo potrebno preveriti na večjem številu preiskovank.

Preglednica XLII: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z alendronatom za diplotip CC (N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, DPYR - deoksipiridinolidin)

CC	dMKG l [%]	dMKG t [%]	dOC [%]*	dBALP [%]	dDPYR [%]
0	6,829 ± 5,196 [N=27]	3,367 ± 1,897 [N=27]	57,08 ± 22,48 [N=27]	39,16 ± 12,15 [N=19]	72,73 ± 33,29 [N=28]
1	6,151 ± 3,376 [N=17]	5,284 ± 4,286 [N=17]	56,20 ± 19,23 [N=17]	50,24 ± 41,584 [N=14]	67,74 ± 28,18 [N=18]
p	0,636	0,097	0,885	0,349	0,602

* - Mann-Whitney, brez oznak - T-test

Diplotipski podskupini 1 in 2 smo združili, ker so bile samo tri preiskovanke z dvema kopijama diplotipa CC.

MKG kolka se je po enoletnem zdravljenju z alendronatom pri preiskovankah z eno ali dvema kopijama diplotipa CC precej bolj povečala, kot pri tistih nobeno kopijo diplotipa TC, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,097$).

4.4.5 ZDRAVLJENJE Z RALOKSIFENOM

V statistično obdelavo smo vključili 56 pomenopavznih osteoporoznih preiskovank, ki so se zdravile z raloksifenom. V preglednicah XLIII do XLVII so za polimorfizem -1734C>T in -1227C>T ter njune diplotipe podane povprečne vrednosti in SD parametrov ter vrednosti p.

Preglednica XLIII: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za polimorfizem -1734C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, CTX – C – terminalni telopeptid)

Ge	dMKG l [%]**	dMKG f [%]**	dMKG t [%]**	dOC [%]	dBALP [%]	dCTX [%]
CC	3,11 ± 4,55 [N=15]	1,11 ± 5,18 [N=15]	0,24 ± 8,19 [N=15]	-26,16 ± 20,67 [N=15]	-20,73 ± 25,05 [N=14]	-33,44 ± 21,28 [N=15]
CT	0,82 ± 4,40 [N=25]	1,70 ± 5,35 [N=25]	-3,52 ± 19,99 [N=25]	-23,98 ± 18,74 [N=25]	-22,94 ± 21,70 [N=22]	-17,46 ± 29,18 [N=25]
TT	2,79 ± 4,57 [N=14]	1,85 ± 5,66 [N=14]	3,66 ± 10,47 [N=14]	-24,78 ± 16,47 [N=13]	-29,30 ± 13,70 [N=11]	-37,52 ± 24,63 [N=13]
p	0,938	0,063	0,338	0,939	0,591	0,050

brez oznak – ANOVA, ** - ANCOVA

V primeru spremembe CTX smo opazili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi spremembe CTX v posameznih genotipskih podskupinah ($p=0,050$). S Scheffe post-hoc testom nismo ugotovili statistično značilne razlike med povprečnimi vrednostmi sprememb CTX v genotipskih podskupinah, čeprav so se koncentracije CTX pri preiskovankah z genotipom TT po enoletnem zdravljenju z raloksifenom mnogo bolj zmanjšale, kot pri tistih z genotipom CT.

MKG vratu stegenice se je po enoletnem zdravljenju z raloksifenom pri preiskovankah z genotipom CT in TT precej bolj povečala kot pri tistih z genotipom CC, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,063$).

Preglednica XLIV: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za polimorfizem -1227C>T (Ge – genotipska podskupina, N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, CTX – beta C – terminalni telopeptid)

Ge	dMKG l [%]**	dMKG f [%]**	dMKG t [%]**	dOC [%]	dBALP [%]	dCTX [%]
CC	2,489 ± 5,657 [N=22]	1,191 ± 4,789 [N=22]	3,937 ± 9,705 [N=22]	-24,35 ± 20,60 [N=21]	-25,75 ± 18,58 [N=18]	-31,20 ± 30,22 [N=21]
CT	1,792 ± 3,540 [N=24]	1,687 ± 5,818 [N=24]	-5,845 ± 19,309 [N=24]	-27,24 ± 14,16 [N=24]	-23,64 ± 22,79 [N=21]	-22,89 ± 25,15 [N=24]
TT	1,049 ± 4,042 [N=8]	2,291 ± 5,545 [N=8]	2,561 ± 9,878 [N=8]	-18,62 ± 24,38 [N=8]	-19,65 ± 23,73 [N=8]	-27,65 ± 26,18 [N=8]
p	0,721	0,204	0,058	0,523	0,799	0,599

brez oznak – ANOVA, ** - ANCOVA

MKG kolka se je po enoletnem zdravljenju z raloksifenom pri preiskovankah z genotipom CT zmanjšala v primerjavi s tistimi z genotipom CC in TT, kjer se je MKG kolka povečala, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,058$).

Preglednica XLV: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za diplotip TC (N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, CTX – beta C – terminalni telopeptid)

TC	dMKG l [%]	dMKG f [%]*	dMKG t [%]*	dOC [%]	dBALP [%]	dCTX [%]
0	3,111 ± 4,553 [N=15]	1,114 ± 5,178 [N=15]	0,239 ± 8,190 [N=15]	-26,16 ± 20,67 [N=15]	-20,73 ± 25,05 [N=14]	-33,44 ± 21,28 [N=15]
1	0,931 ± 4,346 [N=26]	1,811 ± 5,275 [N=26]	-3,569 ± 19,584 [N=26]	-24,34 ± 18,06 [N=26]	-22,53 ± 21,29 [N=23]	-18,24 ± 28,87 [N=26]
2	2,716 ± 4,750 [N=13]	1,632 ± 5,828 [N=13]	4,309 ± 10,602 [N=13]	-24,1 ± 17,00 [N=12]	-30,88 ± 13,34 [N=10]	-37,50 ± 25,72 [N=12]
p	0,268	0,879	0,198	0,946	0,479	0,067

* - Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Koncentracije CTX so se po enoletnem zdravljenju z raloksifenom pri preiskovankah z dvema kopijama diplotipa TC precej bolj zmanjšala kot pri tistih eno kopijo diplotipa TC, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,067$).

Preglednica XLVI: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za diplotip CT (N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, CTX – beta C – terminalni telopeptid)

CT	dMKG l [%]	dMKG f [%]	dMKG t [%]*	dOC [%]	dBALP [%]	dCTX [%]
0	2,54 ± 5,53 [N=23]	1,34 ± 4,74 [N=23]	3,56 ± 9,65 [N=23]	-24,75 ± 20,20 [N=22]	-25,10 ± 18,27 [N=19]	-31,50 ± 29,52 [N=22]
1	1,71 ± 3,59 [N=23]	1,56 ± 5,91 [N=23]	-5,89 ± 19,74 [N=23]	-26,98 ± 14,41 [N=23]	-24,15 ± 23,26 [N=20]	-22,25 ± 25,52 [N=23]
2	1,05 ± 4,04 [N=8]	2,29 ± 5,55 [N=8]	2,56 ± 9,88 [N=8]	-18,62 ± 24,38 [N=8]	-19,65 ± 23,73 [N=8]	-27,65 ± 26,18 [N=8]
p	0,686	0,912	0,131	0,553	0,830	0,528

*- Kruskal-Wallis, brez oznak - ANOVA

Pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom po enem letu zdravljenja nismo dokazali stistično značilnega vpliva diplotipa CT na odzivnost zdravljenja z raloksifenom.

Preglednica XLVII: Povprečne vrednosti in SD MKG in spremembe vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom za diplotip CC (N – število preiskovancev, MKG l – MKG ledvenih vretenc, MKG f – MKG vratu stegenice, MKG t – MKG kolka, OC – osteokalcin, BALP – kostna alkalna fosfataza, CTX – piridinolidin in deoksipiridinolidin)

CC	dMKG l [%]	dMKG f [%]	dMKG t [%]	dOC [%]	dBALP [%]	dCTX [%]
0	1,57 ± 4,00 [N=39]	1,96 ± 5,82 [N=39]	-1,37 ± 17,39 [N=39]	-23,48 ± 17,37 [N=38]	-25,80 ± 19,69 [N=34]	-26,17 ± 26,98 [N=38]
1	3,00 ± 5,72 [N=15]	0,58 ± 3,52 [N=15]	1,36 ± 7,84 [N=15]	-28,13 ± 21,25 [N=15]	-18,46 ± 24,33 [N=13]	-28,75 ± 28,53 [N=15]
p	0,301	0,397	0,721	0,414	0,290	0,759

* - Mann-Whitney, brez oznak - T-test

Diplotipski podskupini 1 in 2 smo združili, ker je bila samo ena preiskovanka z dvema kopijama diplotipa CC.

Pri preiskovankah, ki so se zdravile z raloksifenom po enem letu zdravljenja nismo dokazali stistično značilnega vpliva diplotipa CC na odzivnost zdravljenja z raloksifenom.

4.4.6 SKUPINA ZLOMI

V statistično obdelavo smo vključili 54 osteoartroznih preiskovancev, ki so imeli artroplastiko kolka ter 83 osteoporoznih preiskovancev, ki so imeli nizkoenergijski zlom kolka. S χ^2 testom za dva neodvisna vzorca smo proučevali pogostnost polimorfizmov -

1734C>T in -1227C>T ter njunih diplotipov na tveganje za zlom kolka, tako da smo primerjali določeno skupino z zlomom kolka z drugimi skupinami preiskovancev. Najprej smo primerjali skupino preiskovancev z zlomom kolka (osteoporoza) s skupino preiskovancev z osteoartrazo ter nato še skupino osteoporoznih preiskovancev z zlomom z različnimi skupinami preiskovancev, ki niso imeli zloma kolka. Ostale skupine preiskovancev so bile naslednje:

Skupina 1 – pomenopavzne preiskovanke

Skupina 2 – zdrave pomenopavzne preiskovanke (nimajo osteoporoze)

Skupina 3 – osteoporozne pomenopavzne preiskovanke (imajo znižano MKG, a nimajo zloma kolka)

Skupina 4 – moški in pomenopavzne preiskovanke brez zlomov kolka

Preglednica XLVIII prikazuje rezultate χ^2 testa med posameznimi skupinami preiskovancev za polimorfizema -1734C>T in -1227C>T ter njune diplotipe.

Preglednica XLVIII: Rezultati χ^2 testa za polimorfizem -1734C>T in -1227C>T ter njune diplotipe (TC, CT in CC)

PRIMERJANI SKUPINI PREISKOVANCEV		Rezultati χ^2 testa (p vrednost)				
		-1734 C>T	-1227 C>T	TC	CT	CC
preiskovanci z osteoporozo, ki so doživeli zlom kolka	preiskovanci z osteoartrazo	0,522	0,938	0,522	0,938	0,162
preiskovanci z osteoporozo, ki so doživeli zlom kolka	Skupina 1	0,780	0,631	0,757	0,588	0,013
preiskovanci z osteoporozo, ki so doživeli zlom kolka	Skupina 2	0,454	0,691	0,450	0,691	0,003
preiskovanci z osteoporozo, ki so doživeli zlom kolka	Skupina 3	0,966	0,641	0,900	0,557	0,085
preiskovanci z osteoporozo, ki so doživeli zlom kolka	Skupina 4	0,767	0,757	0,739	0,723	0,118

Rezultati so pokazali, da ne obstaja nobene statistično značilne razlike med frekvencami polimorfizmov -1734C>T in -1227C>T v skupini z zlomom kolka in drugih primerjanih skupinah.

V primeru diplotipa CC smo ugotovili statistično značilno razliko med skupino preiskovancev z osteoporozo, ki so doživeli zlom kolka in skupinama 1 ($p=0,013$) in 2 ($p=0,003$). Po rezultatih lahko sklepamo, da prisotnost diplotipa CC (večja) pomeni manjše tveganje za zlom kolka v skupini pomenopavznih preiskovank in zdravih pomenopavznih preiskovank.

4.5 MOŽNA FUNKCIJSKA VLOGA POLIMORFIZMOV V REGULACIJI IZRAŽANJA GENA ZA PLEIOTROPIN

S pomočjo teoretičnega programa TFSEARCH (32) za iskanje vezavnih motivov za transkripcijske faktorje (TF), ki se vežejo na določeno zaporedje DNA, smo ugotavljali, do kakšnih sprememb vezave transkripcijskih faktorjev prihaja ob prisotnosti različnih nukleotidov na mestih -1734 in -1227 v promotorju gena za PTN. Preglednici XLIX in L prikazujeta razlike v vrsti transkripcijskega faktorja, ki bi se lahko vezal na nukleotidno zaporedje v promotorju gena PTN in homologijo ujemanja zaporedja z znanim zaporedjem za opisani TF.

Preglednica XLIX: Razlike v vezavi in homologijo vezave TF glede na prisotnost nukleotida C oz. T na mestu -1734 v promotorju gena za PTN.

na mestu -1734 prisoten nukleotid C		na mestu -1734 prisoten nukleotid T	
TF	homologija ujemanja (%)	TF	homologija ujemanja (%)
ADR1	92,3	ADR1	93,8
GCR1	86,4	/	/
MZF1	85,2	MZF1	90,4

Vidimo lahko, da prisotnost nukleotida T na mestu - 1734 povzroči, da se transkripcijski faktor GCR1 ne veže več na zaporedje, medtem ko se spremeni homologija ujemanja zaporedja z znanim zaporedjem za transkripcijski faktor ADR1 in MZF1. Zaradi vseh teh sprememb bi lahko prišlo do drugačnega izražanja gena za pleiotropin (večjega ali manjšega), kajti različni TF različno vplivajo na izražanje genov.

Preglednica L: Razlike v vezavi in homologijo vezave TF glede na prisotnost nukleotida C oz. T na mestu -1227 v promotorju gena za PTN.

na mestu -1227 prisoten nukleotid C		na mestu -1227 prisoten nukleotid T	
TF	homologija ujemanja (%)	TF	homologija ujemanja (%)
HSF	95,3	/	/
HSF	93,7	/	/
		ELK-1	85,7
		CAP	85,1

V primeru prisotnosti nukleotida T na mestu -1227 se na zaporedje vežeta druga transkripcijska faktorja, kar lahko pomeni drugačno izražanje gena za pleiotropin, kajti različni TF različno vplivajo na izražanje genov.

Drugačno izražanje gena za pleiotropin bi v lahko pomenilo manjšo ali večjo tvorbo pleiotropina, kar lahko privede do nastanke osteoporoze ali pa deluje protektivno.

5 SKLEP

V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti pogostost polimorfizmov -1734C>T in -1227C>T in njunih diplotipov v promotorju gena za pleiotropin ter njihovo povezanost z mineralno kostno gostoto in biokemijskimi kazalci kostne premene. Prav tako smo poskušali ugotoviti vpliv obeh polimorfizmov in njunih diplotipov na odzivnost na zdravljenje z alendronatom in raloksifenom ter na tveganje za zlom kolka.

Povezanost polimorfizma -1734C>T v promotorju gena za pleiotropin z MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene smo dokazali v primeru:

- MKG vratu stegenice pri premenopavznih preiskovankah, ($p=0,048$),
- koncentracij osteokalcina pri zdravih pomenopavznih preiskovankah ($p=0,041$).

Povezanost polimorfizma -1227C>T v promotorju gena za pleiotropin z MKG smo dokazali v primeru MKG ledvenih vretenc pri zdravih pomenopavznih preiskovankah ($p=0,014$).

Nadalje smo ugotovili povezanost diplotipov TC in CT z MKG in kazalci kostne premene:

- povezanost diplotipa TC z MKG vratu stegenice pri premenopavznih preiskovankah ($p=0,048$),
- povezanost diplotipa TC s koncentracijo osteokalcina pri zdravih pomenopavznih preiskovankah ($p=0,041$),
- povezanost diplotipa CT z MKG ledvenih vretenc pri zdravih pomenopavznih preiskovankah ($p=0,012$).

Vpliva obeh polimorfizmov in njunih diplotipov na odzivnost zdravljenja z raloksifenom nismo dokazali. Ugotovili pa smo vpliv polimorfizma -1227C>T na povečanje odzivnosti zdravljenja z alendronatom ($p=0,020$), kajti MKG ledvenih vretenc se je v povprečju po enoletnem zdravljenju z alendronatom pri preiskovankah z genotipom TT bolj povečala, kot pri tistih z genotipom CT ($p=0,022$) ter prav tako diplotipa CT na povečanje odzivnosti zdravljenja z alendornatom ($p=0,020$), kajti MKG ledvenih vretenc se je v povprečju po

enoletnem zdravljenju pri preiskovankah z dvema kopijama diplotipa CT bolj povečala, kot pri tistih z eno kopijo diplotipa CT ($p=0,022$).

V skupini pomenopavznih preiskovank smo dokazali vpliv diplotipa CC na tveganje za zlom kolka. Ugotovili smo, da več kopij diplotipa CC pomeni manjše tveganje za zlom kolka.

Zaključimo lahko, da bi lahko bila polimorfizma v promotorju gena za pleiotropin pomembna pri razvoju osteoporoznega fenotipa ter vplivala na odzivnost zdravljenja z zdravili in tveganje za zlom kolka, vendar bi bile v prihodnje potrebne še dodatne raziskave na večjem številu preiskovancev. Smiselno bi se bilo še usmeriti na vrednotenje še drugih polimorfizmov v genu za pleiotropin ter v proučevanje kombinacij z ostalimi geni, ki bi lahko imeli pomembno vlogo pri nastanku osteoporoze. Rezultati potrjujejo ugotovitve vsegenomske študije izražanja genov, kjer se je gen za pleiotropin izkazal kot potencialno pomemben osteoporozni gen in predstavljajo prispevek k pojasnjevanju genetskih vplivov na nagnjenost k osteoporozi ter bodo v prihodnje prispevali k razumevanju genetskega ozadja osteoporoze in služili kot potencialne nove tarče za zdravlila.

6 LITERATURA

1. Gueldner SH, Grabo TN, Newman ED, Cooper DR: Osteoporosis, Clinical guidelines for prevention, diagnosis and management, Springer publishing company New York, 2008: 20-1
2. Gueldner SH, Grabo TN, Newman ED, Cooper DR: Osteoporosis, Clinical guidelines for prevention, diagnosis and management, Springer publishing company New York, 2008: 21-3
3. Stevenson JC, Marsh MC: An atlas of osteoporosis 3rd edition, Informa UK Ltd 2007: 11-2
4. Kocijančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. Zdrav Vestn 2002; 71: 571–3
5. Žorž G: Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. ISIS 2006; 15(3): 34-37
6. Gueldner SH, Grabo TN, Newman ED, Cooper DR: Osteoporosis, Clinical guidelines for prevention, diagnosis and management, Springer publishing company New York, 2008: 10-2
7. Mednarodno združenje za osteoporozo. Dostopno na: <http://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics.html>
8. Olszynski WP, Shawn Davison K, Adachi JD et al: Osteoporosis in men: epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. Clin Ther 2004; 26(1): 15- 28
9. Dostopno na: http://media.wiley.com/product_data/excerpt/70/04700196/0470019670.pdf
10. Gueldner SH, Grabo TN, Newman ED, Cooper DR: Osteoporosis, Clinical guidelines for prevention, diagnosis and management, Springer publishing company New York, 2008: 23
11. Kanis JA: Diagnosis of osteoporosis and assesement of fracture risk. Lancet 2002; 359: 1929-36
12. Prezelj J , Kocijančič A: Ultrazvočna opredelitev osteoporoze. Zdrav Vestn 1999; 285-352
13. Seibel MJ: Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. Clin Biochem Rev November 2005; 97-106

14. Garnero P: Advances in bone turnover assesement with biochemical markers. *Medicographia* 2008; 30(4): 339-49
15. Kocjan T, Franić D: Osteoporoza in nadomestno hormonsko zdravljenje. *Zdrav Vestn* 2008; 77 Suppl 3: III-43–8
16. Preželj J, Kocjan T, Gantar-Rott U, Pfeifer M: Dopnilo k smernicam za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze
17. Franić D: Novi vidiki diagnostike in zdravljenja osteoporoze. *Zdrav Vestn* 2009; 78: I-143–50
18. Ralston SH, B de Crombrughe: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes & Dev* 2006 (20); 2492-2506
19. Stewart TL, Ralston SH: Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis, *Journal of endokrinology* 2000; 166: 235-245
20. Novosti v osteologiji: monografija vabljenih predavanj II. Osteoloških dnevov. Maribor 9. – 10. Oktober 2009, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru; 135-143
21. Deuel TF, Zhang N, Yeh HJ, Silos-Santiago I, Wang ZY: Pleiotrophin: A Cytokine with Diverse Functions and a Novel Signaling Pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002; 397: 162-171
22. Trošt Z, Trebše R, Preželj J, Komadina R, Bitenc Logar D, Marc J: A microarray based identification of osteoporosis-related genes in primary culture of human osteoblasts. *Bone* 2009; 46:72-80
23. Ensembl. Dostopno na:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000105894
24. Westendorf J, Kahler RA, Schroeder TM: Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004 (341); 19-39
25. NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's Manual
26. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski doagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55:215-220
27. TaqMan[®] SNP Genotyping Assays Protocol. Applied Biosystems 2006 Part Number 4332856 Rev. C 05/2006

28. Stephens M, Smith N, Donnelly P: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. American Journal of Human Genetics 2001; 68: 978-989.
29. Program EMLD. Dostopno na:
<https://cge.mdanderson.org/~qhuang/Software/pub.htm>
30. Mathematical and population genetics; 113-125
31. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M: Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. Nature reviews Genetics 2002; 3: 299-309
32. Computational Biology Research Center. Dostopno na:
<http://www.cbrc.jp/index.eng.html>

7 PRILOGE

PRILOGA 1: Genotipi preiskovancev za polimorfizma -1734C>T in -1227C>T v promotorju gena za pleiotropin.

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
666	1Y	TT	CT
667	2Y	CC	TT
668	3Y	CT	CT
669	4Y	CC	CT
670	5Y	CT	CT
671	6Y	TT	CC
672	7Y	CT	CT
673	8Y	CC	TT
674	9Y	CC	CT
675	10Y	CT	CT
676	11Y	TT	CC
677	12Y	CT	CT
678	13Y	CC	CT
679	14Y	CT	CC
680	15Y	TT	CC
681	16Y	TT	CC
682	17Y	CT	CT
683	18Y	TT	/
684	19Y	CT	CC
685	20Y	CT	CT
686	21Y	CT	CT
687	22Y	CC	CT
688	23Y	CT	CC
689	24Y	CC	TT
690	25Y	TT	CC
691	26Y	CC	CT
692	27Y	CC	TT
693	28Y	CT	CT
694	29Y	CC	TT
695	30Y	CT	CT
696	31Y	CC	CT
697	32Y	TT	CC
698	33Y	CC	CT
699	34Y	CT	CT
700	35Y	TT	CC
701	36Y	CT	CT
702	37Y	CT	CT
703	38Y	CT	CC
704	39Y	CT	CT
705	40Y	CT	CT
706	41Y	/	/
707	42Y	CC	TT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
708	43Y	CT	CT
709	44Y	CC	/
710	45Y	CC	TT
711	46Y	CC	TT
712	47Y	CT	CT
713	48Y	CC	TT
714	49Y	CT	CC
715	50Y	CC	CT
716	51Y	CT	CT
717	52Y	CT	CT
718	53Y	TT	CC
719	54Y	CT	CT
720	55Y	CT	CT
721	56Y	CC	CT
722	57Y	/	/
723	58Y	TT	CC
724	59Y	TT	CC
725	60Y	CC	TT
726	61Y	CC	TT
727	62Y	CT	CT
728	63Y	CC	CT
729	64Y	CC	CT
730	65Y	CC	TT
731	66Y	CC	CT
732	67Y	CT	CT
733	68Y	CC	TT
734	69Y	CC	CT
735	70Y	CT	CC
736	71Y	CC	TT
737	72Y	CT	CC
738	73Y	/	/
739	74Y	CC	TT
740	75Y	CT	CT
741	76Y	TT	CC
742	77Y	CC	CT
743	78Y	CC	CT
744	79Y	CT	CT
745	80Y	CC	CT
746	81Y	TT	CC
747	82Y	CT	CT
748	83Y	CC	CT
749	84Y	/	/

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
750	85Y	CC	TT
751	86Y	TT	CC
752	87Y	CC	CT
753	89Y	TT	CC
754	90Y	CT	CT
755	91Y	TT	/
756	92Y	CC	TT
757	93Y	CT	/
758	94Y	CT	/
759	95Y	CT	CT
760	96Y	CT	CT
761	97Y	CT	CT
762	98Y	CC	TT
763	99Y	CT	CC
764	100Y	CC	CT
765	101Y	CC	CT
766	102Y	CT	CT
767	103Y	CT	CT
768	104Y	CC	/
769	105Y	CT	CT
770	106Y	CT	CT
771	107Y	CC	CT
772	108Y	CT	CT
773	109Y	CT	CT
774	110Y	/	/
775	111Y	CT	CT
776	112Y	/	/
777	113Y	TT	CC
778	114Y	CT	CC
779	189Y	CT	CT
780	190Y	CT	CT
781	191Y	CT	CT
782	192Y	CT	CT
783	193Y	CT	CT
784	194Y	/	/
785	195Y	CT	CT
786	196Y	CC	/
787	197Y	CC	CT
788	198Y	CT	CT
789	199Y	CC	TT
790	200Y	CT	CT
791	201Y	CT	CT
792	202Y	CC	TT
793	203Y	CT	CT
794	204Y	TT	CC
795	205Y	CC	/
796	206Y	CC	TT
797	207Y	CC	TT
798	208Y	CC	TT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
799	209Y	CT	CT
800	210Y	CT	CT
801	211Y	CC	TT
802	212Y	CT	CC
803	213Y	CT	CC
804	214Y	TT	CC
805	215Y	TT	CC
806	216Y	CC	CT
807	217Y	CT	CT
808	219Y	CT	CC
809	220Y	TT	CC
810	218Y	TT	CC
811	221Y	CT	CT
812	222Y	CT	CT
813	223Y	CT	CC
814	224Y	CC	TT
815	225Y	CT	CC
816	226Y	CT	CC
817	227Y	CT	CT
818	228Y	CC	TT
819	229Y	TT	CC
820	230Y	CC	TT
821	231Y	CC	CT
822	232Y	TT	CC
823	233Y	CT	CC
824	234Y	CC	CT
825	168Y	CT	CC
826	169Y	CT	CC
827	170Y	CT	CC
913	115Y	TT	CC
914	116Y	TT	CC
915	117Y	TT	CC
916	118Y	CC	TT
917	119Y	/	/
918	120Y	/	CT
919	121Y	CT	CT
920	122Y	CT	CT
921	123Y	CT	CT
922	124Y	TT	CC
923	125Y	CT	CT
924	126Y	CT	CT
925	127Y	CT	CT
926	128Y	CT	CT
927	129Y	CT	CC
928	130Y	TT	CC
929	131Y	CT	CC
930	132Y	CT	CT
931	88Y	CT	CT
932	133Y	CT	CT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
933	134Y	TT	CC
934	135Y	CT	CT
935	136Y	TT	CC
936	137Y	CT	CT
937	138Y	CT	CT
938	139Y	CT	CT
939	140Y	CT	CC
940	141Y	CT	CT
941	142Y	CT	CT
942	143Y	CT	CT
943	144Y	CT	CT
944	145Y	CT	CC
945	146Y	TT	CC
946	147Y	CC	CT
947	148Y	TT	CC
948	149Y	CC	TT
949	150Y	CT	CT
950	151Y	CC	TT
951	152Y	CT	CT
952	153Y	TT	/
953	154Y	CC	TT
954	155Y	CC	TT
955	156Y	CT	CC
956	157Y	CC	CT
957	158Y	CC	TT
958	159Y	TT	CC
959	160Y	CT	CT
960	161Y	CT	CT
961	162Y	CT	CT
962	163Y	CT	CT
963	164Y	TT	CC
964	165Y	TT	CC
965	166Y	CC	TT
966	167Y	CC	CT
967	171Y	CC	TT
968	172Y	CC	CT
969	173Y	CT	CT
970	174Y	CC	TT
971	175Y	CC	TT
972	176Y	CC	CT
973	177Y	CT	CT
974	178Y	/	/
975	179Y	CC	CT
976	180Y	TT	CC
977	181Y	CC	CT
978	182Y	CC	TT
979	183Y	CC	CT
980	184Y	CC	CT
981	185Y	TT	CC

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
982	186Y	CT	CT
983	187Y	TT	CC
984	188Y	CC	CT
985	229Y	TT	CC
986	230Y	TT	CC
987	231Y	CT	CT
988	232Y	TT	CC
989	233Y	CT	CT
990	234Y	CT	CC
991	235Y	CC	CT
992	236Y	CT	CT
993	237Y	CT	CC
994	238Y	CT	CT
995	239Y	CT	CC
996	240Y	CT	CC
997	241Y	TT	CC
998	242Y	CT	CT
999	243Y	/	/
1000	244Y	/	/
1001	245Y	/	/
1002	246Y	CT	CT
1003	247Y	CC	CT
1004	248Y	CT	CT
1005	249Y	CT	CT
1006	250Y	CT	CC
1007	251Y	CC	CT
1008	252Y	CC	TT
1009	253Y	TT	CC
1010	254Y	CC	TT
1011	255Y	CT	CT
1012	256Y	TT	CC
1013	257Y	CC	TT
1014	258Y	CC	TT
1015	259Y	CT	CT
1016	260Y	CT	CT
1017	261Y	CT	CT
1018	262Y	CT	/
1019	263Y	TT	CC
1020	264Y	CC	TT
1021	265Y	TT	CC
1022	266Y	CC	TT
1023	267Y	/	/
1024	268y	/	/
1025	269y	CC	CC
1026	270Y	TT	CC
1027	271Y	CT	CC
1028	272Y	CC	CT
1029	273Y	/	/
1030	274Y	CC	TT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
1031	275Y	TT	CC
1032	276Y	TT	CC
1033	277Y	CT	CT
1034	278Y	CT	CT
1035	279Y	CC	CT
1036	280Y	CT	CT
1037	281Y	CT	CT
1038	282Y	CT	CT
1039	283Y	/	/
1040	284Y	CT	CT
1041	285Y	CT	CT
1042	286Y	CC	TT
1043	287Y	CC	TT
1044	288Y	CT	CC
1045	289Y	TT	CC
1046	290Y	CC	CC
1047	291Y	/	/
1048	292Y	/	/
1049	293Y	CC	CT
1050	294Y	CT	CT
1051	295Y	TT	CC
1052	296Y	CT	CT
1053	297Y	/	/
1054	298Y	CT	CC
1055	299Y	CC	CT
1056	300Y	CC	TT
1057	301Y	CC	CC
1058	302Y	TT	CC
1059	303Y	CC	TT
1060	304Y	TT	CC
1061	305Y	CC	TT
1062	306Y	CT	CT
1063	307Y	CT	CT
1064	308Y	CT	CT
1065	309Y	CC	TT
1066	310Y	TT	CC
1067	311Y	/	/
1068	312Y	CT	CT
1069	313Y	CC	CT
1070	314Y	TT	CC
1071	315Y	TT	CC
1072	316Y	CT	CC
1073	317Y	TT	CC
1074	318Y	CC	TT
1075	320Y	CC	TT
1076	321Y	TT	CC
1077	322Y	CT	CT
1078	323Y	TT	CC
1079	324Y	TT	CC

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
1080	325Y	CT	CT
1081	326Y	CT	CT
1082	327Y	CC	TT
1083	328Y	CC	TT
1084	329Y	CT	CT
1085	330Y	CT	CC
1086	331Y	CT	CT
1087	332Y	TT	CC
1088	333Y	TT	CC
1089	334Y	CT	CT
1090	335Y	CT	CC
1091	336Y	TT	CC
1092	337Y	CT	CC
1093	338Y	/	/
1094	339Y	CT	CT
1095	340Y	CT	CT
1096	341Y	TT	CC
1097	342Y	CT	CT
1098	343Y	CT	CT
1099	344Y	CT	CC
1100	345Y	CC	TT
1101	346Y	CT	CC
1102	347Y	CT	CT
1103	348Y	CT	CT
1104	349Y	CT	CC
1105	350Y	CC	TT
1106	351Y	CT	CT
1107	352Y	CC	TT
1108	353Y	TT	CC
1109	354Y	CC	TT
1110	355Y	/	/
1111	356Y	CC	TT
1112	357Y	CT	CT
1113	358Y	CT	CT
1114	359Y	CT	CT
1115	360Y	TT	CC
1116	361Y	CC	CT
1117	362Y	CC	TT
1118	363Y	CT	CT
1119	364Y	CC	TT
1120	365Y	CT	CC
1121	366Y	CC	TT
1122	367Y	CT	CT
1123	368Y	CT	CT
1124	369Y	CT	CC
1125	370Y	/	/
1126	371Y	CT	CC
1127	372Y	CC	TT
1128	373Y	CC	TT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
1129	374Y	CT	CT
1130	375Y	CT	CT
1131	376Y	CC	CT
1132	377Y	CT	CT
1133	378Y	CT	/
1134	379Y	CC	TT
1135	380Y	TT	CC
1136	381Y	CT	CT
1137	382Y	CC	TT
1138	383Y	TT	CC
1139	384Y	TT	CC
1140	385Y	/	/
1141	386Y	CT	CT
1142	387Y	CC	CC
1143	388Y	TT	CC
1144	389Y	TT	CC
1145	390Y	/	/
1146	391Y	CT	CT
1147	118	CC	TT
1148	319Y	CC	TT
1149	392Y	CC	CT
1150	393Y	CC	TT
100f	Fosamax	CT	CT
101f	Fosamax	CT	CC
102f	Fosamax	/	/
103f	Fosamax	TT	CC
106f	Fosamax	CT	CT
108f	Fosamax	CC	TT
109f	Fosamax	CC	CC
110f	Fosamax	CC	TT
111f	Fosamax	CC	CC
112f	Fosamax	CT	CT
113f	Fosamax	CC	CC
114f	Fosamax	CT	CT
115f	Fosamax	CC	TT
117f	Fosamax	CC	CT
118f	Fosamax	CC	CT
119f	Fosamax	CC	CT
120f	Fosamax	CT	CT
121f	Fosamax	CC	TT
122f	Fosamax	CC	TT
123f	Fosamax	TT	CC
124f	Fosamax	CT	CC
125f	Fosamax	CT	CT
126f	Fosamax	CC	TT
129f	Fosamax	CC	TT
130f	Fosamax	CC	CT
131f	Fosamax	CT	CT
134f	Fosamax	CC	TT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
135f	Fosamax	CT	CT
136f	Fosamax	CC	TT
137f	Fosamax	TT	CC
138f	Fosamax	CC	TT
139f	Fosamax	CT	CT
140f	Fosamax	CC	CT
141f	Fosamax	CC	CT
142f	Fosamax	TT	CC
146f	Fosamax	TT	CC
148f	Fosamax	CT	CT
149f	Fosamax	CC	TT
155f	Fosamax	CC	TT
156f	Fosamax	CT	CC
158f	Fosamax	CT	CC
159f	Fosamax	CT	CC
160f	Fosamax	TT	CC
161f	Fosamax	CT	CC
163f	Fosamax	CT	CT
167f	Fosamax	TT	CC
168f	Fosamax	CT	CC
169f	Fosamax	CT	CC
170f	Fosamax	CT	CC
171f	Fosamax	/	/
174f	Fosamax	/	/
175f	Fosamax	CT	CT
176f	Fosamax	CC	CT
93f	Fosamax	CC	TT
94f	Fosamax	TT	CC
95f	Fosamax	CC	TT
96f	Fosamax	TT	CC
97f	Fosamax	CC	TT
98f	Fosamax	CT	CC
99f	Fosamax	CT	CC
1	opg	CT	CC
2	opg	CT	CC
3	opg	CC	CT
4	opg	CT	CT
5	opg	CC	TT
6	opg	CT	CT
7	opg	TT	CC
8	opg	CC	CC
9	opg	CC	CC
10	opg	CT	CC
11	opg	CC	CT
12	opg	CC	CT
13	opg	CT	CT
14	opg	TT	CC
15	opg	TT	CC
16	opg	CT	CC

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
17	opg	CT	CT
18	opg	TT	CC
19	opg	CC	CT
20	opg	CC	TT
21	opg	CT	CC
22	opg	CT	CT
23	opg	/	/
24	opg	CC	CT
25	opg	CC	CT
26	opg	TT	CC
27	opg	CT	CT
28	opg	CT	CT
29	opg	CC	TT
30	opg	TT	CC
31	opg	TT	CC
32	opg	TT	CC
33	opg	CC	TT
34	opg	CC	CT
35	opg	CC	CT
36	opg	TT	CC
37	opg	CT	CT
38	opg	CC	TT
39	opg	CC	TT
40	opg	CC	TT
41	opg	CC	CT
42	opg	CC	TT
43	opg	TT	CC
44	opg	CC	TT
45	opg	CC	TT
46	opg	TT	CC
47	opg	CT	CT
48	opg	TT	CC
49	opg	TT	CC
50	opg	CT	CT
51	opg	CC	TT
52	opg	CT	CT
53	opg	CT	CT
54	opg	CT	CC
55	opg	CC	CT
56	opg	CT	CT
57	opg	TT	CC
58	opg	CT	CT
59	opg	TT	CC
60	opg	TT	CC
61	opg	CC	CT
62	opg	CT	CC
63	opg	CT	CC
64	opg	CC	CT
65	opg	CT	CC

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
66	opg	CC	CT
67	opg	CC	CT
68	opg	TT	CC
69	opg	CT	CT
70	opg	CT	CC
71	opg	CC	TT
72	opg	/	/
73	opg	CC	CT
74	opg	CT	CT
75	opg	TT	CC
76	opg	CT	CT
77	opg	CT	CC
78	opg	CC	TT
79	opg	CT	CT
80	opg	CT	CT
81	opg	CC	TT
82	opg	/	/
83	opg	TT	CC
84	opg	CC	CT
85	opg	CC	TT
86	opg	TT	CC
87	opg	CC	CT
88	opg	CC	TT
89	opg	CT	CT
90	opg	CT	CT
91	opg	CT	CT
92	opg	CT	CT
93	opg	CT	CT
94	opg	CT	CC
95	opg	CT	CT
96	opg	CT	CT
97	opg	CC	TT
98	opg	CC	CT
99	opg	CT	CT
100	opg	TT	CC
101	opg	CC	CT
102	opg	TT	CC
103	opg	CT	CT
104	opg	CC	TT
105	opg	CC	TT
106	opg	TT	CC
107	opg	CT	CT
108	opg	CT	CT
109	opg	/	/
110	opg	CT	CC
111	opg	TT	CC
112	opg	CT	CT
113	opg	CT	CT
114	opg	CC	CT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
115	opg	TT	CC
116	opg	CC	CT
117	opg	TT	CC
587	ralo	CT	CT
588	ralo	CC	TT
589	ralo	TT	CC
590	ralo	CT	CT
591	ralo	TT	CC
592	ralo	CT	CC
593	ralo	CC	CT
594	ralo	CT	CT
595	ralo	CC	TT
596	ralo	CC	CT
597	ralo	CT	CT
598	ralo	TT	CC
599	ralo	CC	CT
600	ralo	CT	CT
601	ralo	CC	CT
602	ralo	CT	CT
603	ralo	CT	CC
604	ralo	CT	CT
605	ralo	TT	CC
606	ralo	CT	CT
607	ralo	CC	TT
608	ralo	CT	CC
609	ralo	CT	CC
610	ralo	CC	CT
611	ralo	CC	TT
612	ralo	CC	CC
613	ralo	CC	TT
614	ralo	CC	TT
615	ralo	TT	CC
616	ralo	CT	CT
617	ralo	TT	CC
618	ralo	CC	CT
619	ralo	CT	CT
620	ralo	CC	TT
621	ralo	TT	CC
622	ralo	CT	CT
623	ralo	CC	TT
624	ralo	CC	TT
625	ralo	CT	CT
626	ralo	CT	CC
627	ralo	CT	CT
628	ralo	TT	CC
629	ralo	CT	CT
630	ralo	TT	CC
631	ralo	CT	CT
632	ralo	CT	CC

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
633	ralo	TT	CC
634	ralo	TT	CC
635	ralo	TT	CC
636	ralo	TT	CT
637	ralo	CT	CC
638	ralo	CT	CC
639	ralo	CT	CC
640	ralo	CT	CC
659	ralo	CT	CT
660	ralo	/	/
661	ralo	/	/
662	ralo	CT	CT
663	ralo	CC	CT
664	ralo	TT	CC
665	ralo	CC	TT
666	ralo	CT	CT
667	ralo	CT	CT
1002Z	ZIT	CC	TT
1003Z	ZIT	CT	CT
1004Z	ZIT	/	/
1005Z	ZIT	/	/
1006Z	ZIT	/	/
1007Z	ZIT	CT	CT
1008Z	ZIT	/	/
1009Z	ZIT	CT	CC
1010Z	ZIT	/	/
1011Z	ZIT	/	/
1012Z	ZIT	CC	TT
1021Z	ZIT	CC	TT
1028Z	ZIT	/	/
1030Z	ZIT	/	/
1031Z	ZIT	/	/
1032Z	ZIT	TT	CC
1033Z	ZIT	CT	CC
1034Z	ZIT	CC	TT
1035Z	ZIT	CT	CT
1036Z	ZIT	CT	CT
1037Z	ZIT	CC	CT
1038Z	ZIT	CT	CT
1039Z	ZIT	CT	CT
1040Z	ZIT	CT	CC
1041Z	ZIT	CC	TT
1042Z	ZIT	CC	TT
1043Z	ZIT	CC	CT
1045Z	ZIT	CC	TT
1049Z	ZIT	CT	CC
1051Z	ZIT	CC	TT
1052Z	ZIT	CT	CC
1053Z	ZIT	CC	CT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
1054Z	ZIT	/	/
1055Z	ZIT	CT	CT
1056Z	ZIT	CT	CT
1057Z	ZIT	CC	CT
1058Z	ZIT	TT	CC
1059Z	ZIT	CC	TT
1060Z	ZIT	TT	CC
1061Z	ZIT	CT	CT
1062Z	ZIT	CT	CT
1064Z	ZIT	CC	TT
1065Z	ZIT	TT	CC
1066Z	ZIT	CT	CC
1067Z	ZIT	CT	CT
1068Z	ZIT	CT	CC
1069Z	ZIT	CC	TT
1070Z	ZIT	CT	CT
1071Z	ZIT	CT	CT
1072Z	ZIT	TT	CC
1074Z	ZIT	CC	CT
1075Z	ZIT	CC	CT
1076Z	ZIT	TT	CC
1077Z	ZIT	TT	CC
1078Z	ZIT	TT	CC
1079Z	ZIT	CT	CT
1081Z	ZIT	TT	CC
1082Z	ZIT	CC	TT
1083Z	ZIT	TT	CC
1085Z	ZIT	TT	CC
1087Z	ZIT	CT	CT
1088Z	ZIT	CC	TT
1089Z	ZIT	CT	CC
1090Z	ZIT	CC	TT
1091Z	ZIT	TT	CC
1092Z	ZIT	CT	CC
1093Z	ZIT	TT	CC
1094Z	ZIT	CC	TT
1095Z	ZIT	CC	TT
1097Z	ZIT	CT	CT
1098Z	ZIT	CT	CC
1100Z	ZIT	CT	CT
1101Z	ZIT	CC	CT
1102Z	ZIT	TT	CC
1103Z	ZIT	TT	CC
1104Z	ZIT	CT	CC
1105Z	ZIT	CT	CT
1106Z	ZIT	CT	CT
1107Z	ZIT	CC	CT
1108Z	ZIT	CT	CC
1110Z	ZIT	CT	CT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
c01	zlomi_D	CT	CT
c02	zlomi_D	CC	TT
c03	zlomi_D	CT	CC
c04	zlomi_D	CC	CT
c05	zlomi_D	TT	CC
c06	zlomi_D	CT	CT
c07	zlomi_D	CT	CT
c08	zlomi_D	CC	TT
c09	zlomi_D	CT	CT
c10	zlomi_D	CC	TT
c11	zlomi_D	/	/
c13	zlomi_D	CC	TT
c14	zlomi_D	CC	CT
c31	zlomi_D	CC	CT
c33	zlomi_D	CT	CC
c34	zlomi_D	TT	CC
c35	zlomi_D	TT	CC
c36	zlomi_D	CT	CT
c37	zlomi_D	CC	CC
c38	zlomi_D	CT	CT
c39	zlomi_D	CC	CT
c40	zlomi_D	TT	CC
c41	zlomi_D	TT	CC
c42	zlomi_D	CT	CT
c43	zlomi_D	CT	CT
c44	zlomi_D	TT	CC
c45	zlomi_D	TT	CC
c46	zlomi_D	CT	CT
c47	zlomi_D	CC	TT
c48	zlomi_D	CC	TT
c49	zlomi_D	CC	TT
c50	zlomi_D	CT	CT
c51	zlomi_D	CT	CC
c52	zlomi_D	CT	CT
c53	zlomi_D	CT	CT
c54	zlomi_D	TT	CC
c55	zlomi_D	TT	CC
c56	zlomi_D	CT	CT
c57	zlomi_D	TT	CC
c58	zlomi_D	CT	CC
c59	zlomi_D	TT	CC
c60	zlomi_D	TT	CC
c61	zlomi_D	TT	CC
c62	zlomi_D	CT	CT
c63	zlomi_D	CC	TT
c64	zlomi_D	CT	CT
c65	zlomi_D	CT	CT
c66	zlomi_D	CT	CC
c67	zlomi_D	CT	CT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
c68	zlomi_D	CT	CC
c69	zlomi_D	CC	TT
c70	zlomi_D	CT	CT
c71	zlomi_D	CC	CT
c73	zlomi_D	CT	CT
c74	zlomi_D	TT	CC
c75	zlomi_D	CC	TT
c76	zlomi_D	CC	TT
c77	zlomi_D	CC	TT
c78	zlomi_D	CT	CT
c79	zlomi_D	CT	CT
c80	zlomi_D	TT	CC
c81	zlomi_D	CT	CT
c82	zlomi_D	CT	CT
c83	zlomi_D	CC	CT
c84	zlomi_D	CC	TT
c85	zlomi_D	TT	CC
c87	zlomi_D	CC	CC
c88	zlomi_D	CC	TT
c89	zlomi_D	TT	CC
c90	zlomi_D	CT	CT
c91	zlomi_D	CC	TT
c92	zlomi_D	CC	CT
c93	zlomi_D	CT	CT
c94	zlomi_D	CT	CT
c95	zlomi_D	CC	CT
c96	zlomi_D	CC	TT
c97	zlomi_D	CC	CT
c98	zlomi_D	CT	CT
c99	zlomi_D	CC	TT
c100	zlomi_D	CT	CT
C01	zlomi_V	TT	CC
C02	zlomi_V	CC	TT
C03	zlomi_V	TT	CC
C04	zlomi_V	CT	CC
C05	zlomi_V	CT	CT
C06	zlomi_V	TT	CC
C07	zlomi_V	CT	CC
C08	zlomi_V	TT	CC
C09	zlomi_V	CT	CT
C10	zlomi_V	CT	CT
C11	zlomi_V	CT	CT
C12	zlomi_V	CC	TT
C13	zlomi_V	CT	CT
C14	zlomi_V	CT	CC
C15	zlomi_V	TT	CC
C16	zlomi_V	CT	CT
C17	zlomi_V	CC	TT
C18	zlomi_V	CC	CT

Zap.št.	Oznaka	Genotip za polimorfizem	
		-1734C>T	-1227C>T
C19	zlomi_V	CC	TT
C20	zlomi_V	CT	CT
C21	zlomi_V	CT	CT
C22	zlomi_V	CC	CT
C23	zlomi_V	CC	TT
C24	zlomi_V	CT	CT
C25	zlomi_V	CT	CT
C26	zlomi_V	CC	TT
C27	zlomi_V	TT	CC
C28	zlomi_V	CT	CT
C29	zlomi_V	CT	CT
C30	zlomi_V	CT	CC
C31	zlomi_V	CC	TT
C32	zlomi_V	CC	TT
C33	zlomi_V	CT	CT
C34	zlomi_V	TT	CC
C35	zlomi_V	TT	CC
C36	zlomi_V	CT	CT
C37	zlomi_V	CT	CT
C38	zlomi_V	CT	CT
C39	zlomi_V	TT	CC
C41	zlomi_V	CT	CT
C42	zlomi_V	CC	CT
C43	zlomi_V	CC	TT
C44	zlomi_V	CC	TT
C45	zlomi_V	CT	CT
C49	zlomi_V	CC	TT
C50	zlomi_V	CT	CT
C51	zlomi_V	CT	CT
C52	zlomi_V	TT	CC
C53	zlomi_V	CT	CT
C54	zlomi_V	CC	TT
C55	zlomi_V	TT	CC
C56	zlomi_V	CC	CC
C57	zlomi_V	CC	CT
C61	zlomi_V	CT	CT