

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA PETROVIČ

DIPLOMSKA NALOGA

**VPLIV GENSKIH DELECIJ *GSTMI* IN *GSTTI* NA MINERALNO KOSTNO
GOSTOTO**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA PETROVIČ

DIPLOMSKA NALOGA

**VPLIV GENSKIH DELECIJ *GSTM1* IN *GSTT1* NA MINERALNO KOSTNO
GOSTOTO**

**INFLUENCE OF *GSTM1* AND *GSTT1* GENE DELETIONS ON BONE MINERAL
DENSITY**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm. in somentorstvom asist. Simone Jurković Mlakar, mag. farm. Meritve mineralne kostne gostote so bile opravljene na UKC Ljubljana, UKC Maribor in SB Celje. Meritve koncentracij biokemičnih kazalcev so bile izmerjene v laboratoriju Klinike za nuklearno medicino, UKC Ljubljana.

Zahvala

V prvi vrsti se želim zahvaliti mentorici, prof. dr. Janji Marc, za potrpežljivost in koristne nasvete. Zahvala gre tudi asist. Simoni Jurković Mlakar za skrbno vodenje skozi laboratorijsko delo ter pomoč pri premagovanju ovir, ki so bile nazadnje vedno rešljive. Prav tako se želim zahvaliti preostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za prijaznost in pomoč pri delu v laboratoriju.

Predvsem pa se želim zahvaliti mojim staršem, ki so vedno podpirali, spodbujali in razumevajoče spremljali mojo študijsko pot.

Še enkrat hvala vsem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Janje Marc, mag. farm. in somentorice asist. Simone Jurković Mlakar, mag. farm.

Ljubljana, marec 2010

Maja Petrovič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član diplomske komisije:izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	i
SEZNAM OKRAJŠAV.....	iii
POVZETEK.....	v
KAZALO SLIK.....	vii
KAZALO PREGLEDNIC.....	viii
KAZALO GRAFOV.....	xii
1 UVOD.....	1
1.1 Vloga kosti.....	1
1.1.1 Zgradba kosti in sestava.....	1
1.1.2 Fiziološko obnavljanje kosti.....	2
1.2 Osteoporoza.....	3
1.2.1 Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze.....	4
1.2.2 Klinična slika.....	5
1.2.3 Diagnostika.....	6
1.2.4 Prevalenca.....	9
1.2.5 Zdravljenje.....	10
1.3 Oksidativni stres.....	11
1.3.1 Oksidativni stres in osteoporoza.....	12
1.4 Glutation S-transferaza.....	15
1.4.1 Glutation S-transferaza mu 1 (GSTM1) in glutation S-transferaza theta 1 (GSTT1).....	16
1.4.2 GSTM1, GSTT1 in genski polimorfizem.....	17
2 NAMEN DELA.....	19
3 METODE IN MATERIALI.....	20
3.1 Preiskovanci.....	20
3.2 Določitev vrednosti mineralne kostne gostote in biokemičnih kazalcev kostne remodelacije.....	20
3.3 Opis vzorcev DNA.....	21
3.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	21
3.4.1 Pomnoževanje odsekov DNA.....	22
3.4.1.1 Priprava reakcijske zmesi za pomnoževanje.....	23
3.4.1.2 Optimizacija reakcijske zmesi.....	24
3.4.1.3 Potek PCR reakcije.....	25
3.4.1.4 Preverjanje uspešnosti PCR reakcije.....	26
3.4.2 Reagenti in oprema.....	27
3.4.2.1 Verižna reakcija s polimerazo.....	27
3.4.2.2 Agarozna gelska elektroforeza.....	28

3.5	Statistične metode	30
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	Optimizacija postopka genotipizacije	32
4.2	Ugotavljanje pogostnosti polimorfizmov	34
4.2.1	<i>Pogostnost delecijjskih polimorfizmov GSTM1*0 in GSTT1*0 pri Slovencih</i>	36
4.2.2	<i>Ocena povezanosti polimorfizmov GSTM1*0 in GSTT1*0 z mineralno kostno gostoto in biokemičnimi kazalci kostne remodelacije</i>	38
4.2.2.1	Vsi preiskovanci	38
4.2.2.2	Vse preiskovanke	41
4.2.2.3	Pomenopavzalne preiskovanke	43
4.2.2.4	Premenopavzalne preiskovanke	45
4.2.2.5	Vsi moški preiskovanci	45
4.2.2.6	Preiskovanci, oboleli za osteoporozo	46
4.2.2.7	Zdravi preiskovanci	48
4.2.2.8	Preiskovanci, starejši od 65 let	48
4.2.2.9	Preiskovanci, stari 65 let ali manj	52
5	SKLEP	54
6	LITERATURA	57
7	PRILOGE	63
7.1	Priloga 1: Rezultati genotipizacije	63
7.2	Priloga 2: Rezultati statistične analize	70
7.2.1	<i>Vsi preiskovanci</i>	70
7.2.2	<i>Vse preiskovanke</i>	72
7.2.3	<i>Pomenopavzalne preiskovanke</i>	74
7.2.4	<i>Premenopavzalne preiskovanke</i>	75
7.2.5	<i>Moški preiskovanci</i>	77
7.2.6	<i>Preiskovanci, oboleli za osteoporozo</i>	79
7.2.7	<i>Zdravi preiskovanci</i>	81
7.2.8	<i>Preiskovanci, starejši od 65 let</i>	82
7.2.9	<i>Preiskovanci, stari 65 let ali manj</i>	84

SEZNAM OKRAJŠAV

ANCOVA – analiza kovarianc

ANOVA – analiza varianc

BALP – kostna alkalna fosfataza (ang. *bone alkaline phosphatase*)

BMDfn – mineralna kostna gostota vratu stegenice

BMDfn – mineralna kostna gostota vratu stegenice

BMDls – mineralna kostna gostota ledvenih vretenc

BMDtot – mineralna kostna gostota celotnega kolka

BMU – osnovna večcelična enota

DEXA – dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (ang. *dual-energy X-ray absorptiometry*)

DNA – deoksiribonukleinska kislina

dNTP – deoksiribonukleozid trifosfat

FoxO – transkripcijski faktorji Forkhead box O

GST – glutation S-transferaza

GSH – reducirana oblika glutationa

GSSG – oksidirana oblika glutationa

IL – interlevkin

ITM – indeks telesne mase

M-CSF – makrofagne kolonije stimulirajoč faktor

MKG – mineralna kostna gostota (ang. *bone mineral density*)

NADPH-oksidaza – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidaza

NF- κ B – jedrni faktor kappa-B

OC – osteokalcin

OPG – osteoprotegerin

PCR – verižna reakcija s polimerazo

PTH – parathormon

RANKL – ligand receptor za aktivacijo jedrnega faktorja kappa-B (ang. *ligand receptor for nuclear factor kappa B ligand*)

ROS – reaktivne kisikove spojine

SD – standardna deviacija

SZO – Svetovna zdravstvena organizacija

SOD – superoksid-dismutaza

TAE – Tris-acetat EDTA

TNF- α – dejavnik tumorske nekroze alfa

POVZETEK

VPLIV GENSKIH DELECIJ *GSTM1* IN *GSTT1* NA MINERALNO KOSTNO GOSTOTO

Glutation S-transferaza je družina encimov, ki sodeluje v obrambi organizma pri oksidativnem stresu. Visoke ravni ROS porušijo redoks ravnovesje v celici in jo podvržejo oksidativnemu stresu, ki je povezan z etiologijo nekaterih degenerativnih obolenj. Ena možnih posledic oksidativnega stresa je znižana mineralna kostna gostota. Posledično to lahko vodi v nastanek osteoporoze. V okviru diplomske naloge smo s pomočjo 721 preiskovancev proučevali pogostnost delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* ter *GSTT1*0* in kliničen pomen obeh polimorfizmov. S pomočjo večkratne sočasne verižne reakcije s polimerazo smo pomnožili tarčna odseka DNA posameznih vzorcev. Podatke o pogostnosti delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* smo statistično obdelali v skupini vseh preiskovancev ter po posameznih skupinah preiskovancev, ki so se razlikovale v lastnostih, kot so spol, starost, status mene in obolelost za osteoporozo. Ugotovili smo, da je delecijjski polimorfizem *GSTT1*0* pri vseh preiskovancih statistično značilno povezan z višjo mineralno kostno gostoto vratu stegenice ($p = 0,020$) in celotnega kolka ($p = 0,025$), v skupini preiskovank je povezan z višjo mineralno kostno gostoto ledvenih vretenc ($p = 0,043$), v skupini preiskovancev, starih 65 let ali manj, pa z višjo mineralno kostno gostoto vratu stegenice ($p = 0,032$), celotnega kolka ($p = 0,046$) in ledvenih vretenc ($p = 0,043$). Vpliv delecijjskega polimorfizma *GSTM1*0* je statistično značilen v skupini preiskovancev, starejših od 65 let, kjer je povezan z nižjo mineralno kostno gostoto vratu stegenice ($p = 0,005$) in celotnega kolka ($p = 0,047$) ter v skupini zdravih preiskovancev, kjer je statistično značilno povezan z nižjo mineralno kostno gostoto ledvenih vretenc ($p = 0,032$). V skupini preiskovancev, starejših od 65 let, smo ugotovili še statistično značilno povezavo delecijjskega polimorfizma *GSTT1*0* z zvišano vrednostjo kostne alkalne fosfataze ($p = 0,016$), medtem ko je delecijjski polimorfizem *GSTM1*0* statistično značilno povezan z nižjo vrednostjo taistega biokemičnega označevalca v skupini pomenopavzalnih preiskovank ($p = 0,020$) in v skupini preiskovancev, obolelih za osteoporozo ($p = 0,030$). Delecijjski polimorfizem *GSTT1*0* je statistično značilno povezan z višjo vrednostjo osteoprotegerina v skupini moških preiskovancev ($p = 0,031$). Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da bi gena *GSTM1* in *GSTT1* lahko uvrstili med gene, ki vplivajo na razvoj bolezni kosti, kot je npr. osteoporozo. Smiselno bi bilo ponoviti raziskavo na večjem številu preiskovancev in razjasniti mehanizem vpliva genov *GSTM1* in *GSTT1* na mineralno kostno gostoto in biokemične označevalce kostne remodelacije.

ABSTRACT

INFLUENCE OF *GSTM1* AND *GSTT1* GENE DELETIONS ON BONE MINERAL DENSITY

Glutathione S-transferase is a family of enzymes, which is involved in a protection of human organism against oxidative stress. Excess in reactive oxygen species can demolish redox balance in the cell and provoke oxidative stress, causing development of various degenerative diseases. One of the possible consequences related to oxidative stress is the loss of bone mineral density which might lead to osteoporosis. Within the scope of our diploma thesis we studied the frequency of deletion polymorphisms *GSTM1*0* and *GSTT1*0* in clinical studies on 721 volunteers. Initially we multiplied target DNA sequences for *GSTM1* and *GSTT1* genes by using a multiplex polymerase chain reaction (PCR). For purposes of processing statistical data, we classified volunteers in several groups, regarding differences in sex, age, menopause status and diagnostic osteoporosis status. Based on the results of statistical analysis, we discovered that polymorphism *GSTT1*0* is statistically significant in connection to higher values of bone mineral density of the femoral neck

($p = 0,020$) and the hip ($p = 0,025$) for all volunteers, statistically significant in connection to greater values of bone mineral density of the lumbar spine for female volunteers ($p = 0,043$) and also significant in connection to greater values of bone mineral density of the femoral neck ($p = 0,032$), the hip ($p = 0,046$) and the lumbar spine ($p = 0,043$) for volunteers, aged up to 65 years. We also discovered that polymorphism *GSTM1*0* is statistically significant in connection to lower values of bone mineral density of the femoral neck ($p = 0,005$) and the hip ($p = 0,047$) for volunteers, older than 65 years of age, and also significantly connected to lower values of bone mineral density of the lumbar spine in a group of healthy volunteers ($p = 0,032$). Results of statistical analysis also showed that polymorphism *GSTT1*0* is statistically significant in connection to greater value of bone alkaline phosphatase for volunteers, older than 65 years of age, while polymorphism *GSTM1*0* proved to be statistically significant in connection to its lower value for menopausal women ($p = 0,020$) and for volunteers, suffering from osteoporosis ($p = 0,030$). Polymorphism *GSTT1*0* also demonstrated statistically significant connection to greater value of osteoprotegerin for male volunteers ($p = 0,031$). Based on our findings, we can conclude that *GSTM1* and *GSTT1* genes can be classified among genes, which are importantly comprehended in a development of various bone diseases, e.g. osteoporosis. It would be reasonable to repeat this clinical study on a wider range of volunteers to clarify mechanism and impact of *GSTM1* and *GSTT1* genes on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover.

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Prikaz remodelacije kosti.....</i>	<i>3</i>
<i>Slika 2: Vpliv staranja na izgubo mineralne kostne gostote.</i>	<i>5</i>
<i>Slika 3: Mikroarhitektura zdrave in osteoporotične kosti.....</i>	<i>6</i>
<i>Slika 4: Smernice za zdravljenje osteoporoze v Sloveniji.</i>	<i>10</i>
<i>Slika 5: Reakcija redukcije molekule O₂.....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 6: Shematski prikaz aktiviranih signalnih poti z ROS in vpliv na življenjsko dobo osteoblastov in osteoklastov.</i>	<i>13</i>
<i>Slika 7: Poenostavljen prikaz vpletenosti glutation S-transferaze v redoks reakcije glutaciona.....</i>	<i>15</i>
<i>Slika 8: Filogenetsko drevo citosolnih GST encimov.....</i>	<i>16</i>
<i>Slika 9: Lokacija gena GSTM1 na 1. kromosomu.....</i>	<i>16</i>
<i>Slika 10: Lokacija gena GSTT1 na 22. kromosomu.....</i>	<i>17</i>
<i>Slika 11: Opis treh stopenj enega cikla pomnoževanja tarčnega DNA odseka.....</i>	<i>22</i>
<i>Slika 12: Elektroforeza produktov večkratne sočasne PCR reakcije na 2 % agaroznem gelu.</i>	<i>33</i>

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Definicija osteoporoze na osnovi merjenja MKG z DEXA.	6
Preglednica II: Zaporedja oligonukleotidnih začetnikov.....	23
Preglednica III: Količinska sestava zmesi reagentov za pripravo enega vzorca za večkratno sočasno PCR reakcijo (po optimizaciji).	24
Preglednica IV: Optimiziran program za večkratno sočasno PCR reakcijo.	25
Preglednica V: Količinska sestava zmesi reagentov za pripravo enega vzorca za PCR reakcijo (po optimizaciji).....	25
Preglednica VI: Sestava 2 % agaroznega gela.....	26
Preglednica VII: Pogostnosti polimorfizmov GSTM1*0 in GSTM1*0 pri Slovencih.....	36
Preglednica VIII: Pogostnosti polimorfizmov GSTM1*0 in GSTM1*0 iz podatkov meta-študije.	36
Preglednica IX: Pogostnosti kombinacij polimorfizmov GSTM1*0 in GSTM1*0 v preučevanih skupinah. ...	38
Preglednica X: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk testa ANCOVA (povprečne vrednosti – srednja vrednost ± SD) za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri vseh preiskovancih. ...	39
Preglednica XI: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk testa ANCOVA (povprečne vrednosti – srednja vrednost ± SD) za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri vseh preiskovancih.....	39
Preglednica XII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk testa ANCOVA (povprečne vrednosti – srednja vrednost ± SD) za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri preiskovancih, starejših od 65 let.	49
Preglednica XIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk testa ANCOVA (povprečne vrednosti – srednja vrednost ± SD) za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri preiskovancih starejših od 65 let.	49
Preglednica XIV: Zbrani podatki genotipizacije za GSTM1 in GSTT1.....	63
Preglednica XV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri vseh preiskovancih.	70
Preglednica XVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih.	70
Preglednica XVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih.....	71
Preglednica XVIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri vseh preiskovancih.....	71
Preglednica XIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih.	71
Preglednica XX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih.....	71
Preglednica XXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih.....	72
Preglednica XXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri vseh preiskovankah.	72
Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.....	72
Preglednica XXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.....	72

Preglednica XXV: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri vseh preiskovankah.....	73
Preglednica XXVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.....	73
Preglednica XXVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.....	73
Preglednica XXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.....	73
Preglednica XXIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri pomenopavzalnih preiskovankah.....	74
Preglednica XXX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.....	74
Preglednica XXXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.....	74
Preglednica XXXII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri pomenopavzalnih preiskovankah.....	75
Preglednica XXXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.....	75
Preglednica XXXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.....	75
Preglednica XXXV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.....	75
Preglednica XXXVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri premenopavzalnih preiskovankah.....	76
Preglednica XXXVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.....	76
Preglednica XXXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.....	76
Preglednica XXXIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.....	76
Preglednica XL: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.....	77
Preglednica XLI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.....	77
Preglednica XLII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri moških preiskovancih. ..	77
Preglednica XLIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri moških preiskovancih.	78

Preglednica XLIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri moških preiskovancih.....	78
Preglednica XLV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri moških preiskovancih.	78
Preglednica XLVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri moških preiskovancih.	79
Preglednica XLVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.....	79
Preglednica XLVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.	79
Preglednica XLIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.....	80
Preglednica L: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.	80
Preglednica LI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.	80
Preglednica LII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.....	80
Preglednica LV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.....	81
Preglednica LVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri zdravih preiskovancih. ...	81
Preglednica LVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.....	81
Preglednica LVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.....	81
Preglednica LIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.....	82
Preglednica LX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.....	82
Preglednica LXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.....	82
Preglednica LXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri preiskovancih, starejših od 65 let.....	82
Preglednica LXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starejših od 65 let.....	83
Preglednica LXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starejših od 65 let.	83

Preglednica LXV: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri preiskovancih, starejših od 65 let.	83
Preglednica LXVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starejših od 65 let.	84
Preglednica LXVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starejših od 65 let.	84
Preglednica LXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.	84
Preglednica LXIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.	85
Preglednica LXX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.	85
Preglednica LXXI: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.	85
Preglednica LXXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.	86
Preglednica LXXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.	86
Preglednica LXXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.	86

KAZALO GRAFOV

<i>Graf 1: Povprečne vrednosti BMDfn za gen GSTM1 pri vseh preiskovancih.....</i>	<i>40</i>
<i>Graf 2: Povprečne vrednosti BMDfn za gen GSTM1 pri vseh preiskovancih.....</i>	<i>40</i>
<i>Graf 3: Povprečne vrednosti BMDfn za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri vseh preiskovancih.....</i>	<i>40</i>
<i>Graf 4: Povprečne vrednosti BMDls za gen GSTM1 pri vseh preiskovankah.....</i>	<i>42</i>
<i>Graf 5: Povprečne vrednosti BMDls za gen GSTT1 pri vseh preiskovankah.....</i>	<i>42</i>
<i>Graf 6: Povprečne vrednosti BMDls za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri vseh preiskovankah.....</i>	<i>42</i>
<i>Graf 7: Povprečne vrednosti BALP za gen GSTM1 pri pomenopavzalnih preiskovankah.....</i>	<i>43</i>
<i>Graf 8: Povprečne vrednosti BALP za gen GSTT1 pri pomenopavzalnih preiskovankah.....</i>	<i>43</i>
<i>Graf 9: Povprečne vrednosti BALP za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri pomenopavzalnih preiskovankah.....</i>	<i>43</i>
<i>Graf 10: Povprečne vrednosti BMDls za gen GSTM1 pri pomenopavzalnih preiskovankah.....</i>	<i>44</i>
<i>Graf 11: Povprečne vrednosti BMDls za gen GSTT1 pri pomenopavzalnih preiskovankah.....</i>	<i>44</i>
<i>Graf 12: Povprečne vrednosti BMDls za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri pomenopavzalnih preiskovankah.....</i>	<i>44</i>
<i>Graf 13: Povprečne vrednosti BALP za gen GSTM1 pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.....</i>	<i>47</i>
<i>Graf 14: Povprečne vrednosti BALP za gen GSTT1 pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.....</i>	<i>47</i>
<i>Graf 15: Povprečne vrednosti BALP za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.....</i>	<i>47</i>
<i>Graf 16: Povprečne vrednosti BALP za gen GSTM1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.....</i>	<i>50</i>
<i>Graf 17: Povprečne vrednosti BALP za gen GSTT1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.....</i>	<i>50</i>
<i>Graf 18: Povprečne vrednosti BALP za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.....</i>	<i>50</i>
<i>Graf 19: Povprečne vrednosti BMDfn za gen GSTM1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.....</i>	<i>51</i>
<i>Graf 20: Povprečne vrednosti BMDfn za gen GSTM1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.....</i>	<i>51</i>
<i>Graf 21: Povprečne vrednosti BMDfn za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.....</i>	<i>51</i>
<i>Graf 22: Povprečne vrednosti BMDfn za gen GSTM1 pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.....</i>	<i>53</i>
<i>Graf 23: Povprečne vrednosti BMDfn za gen GSTM1 pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.....</i>	<i>53</i>
<i>Graf 24: Povprečne vrednosti BMDfn za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.....</i>	<i>53</i>

1 UVOD

1.1 Vloga kosti

Okostje je visoko specializiran in dinamičen organ, ki daje telesu oporo, mu omogoča gibanje v prostoru ter predstavlja ogrodje za pritrnitev mišic, kit in ligamentov. Je organski sistem, ki ščiti in vzdržuje natančen položaj mehkih tkiv v telesu in na ta način zagotavlja stabilnost in obliko telesa. Kosti, ki skupaj s hrustancem predstavljajo vezivno tkivo skeleta, skladiščijo kalcij, fosfate, magnezij, natrij in druge ione, v središčnih votlinah nekaterih kosti pa se nahaja kostni mozeg (1).

1.1.1 Zgradba kosti in sestava

Organski matriks predstavlja 35 % mase kosti, medtem ko anorganski oziroma mineralni del predstavlja preostalih 65 %. Veliko večino organskega matriksa (90 %) sestavljajo kolagenska vlakna, manjšinski del pa ne-kolagenske beljakovine osteonektin, osteokalcin, osteoneptin in kostni sialoprotein. Mineralni del kostnine, ki je pomemben za trdnost kosti, kemijsko sestavljajo kalcij in fosfati, v obliki amorfnih soli in kristaliničnega hidroksiapatita, ki ima v svojih kristalnih mrežah vključene majhne količine kalcijevega karbonata in kalcijevega fluorida (1, 2). Kostnina obsega dve vrsti tkiva: kompaktno **kortikalno** tkivo na površini kosti obdaja spongiozno oziroma **trabekularno** tkivo, ki je v notranjosti kosti. Kortikalna kost predstavlja pri odraslem človeku največ 80 % okostja, vendar se delež trabekularne kosti v nekaterih delih okostja, kot je na primer ledveni del hrbtenice, bistveno poveča (2).

Kortikalna in trabekularna kost vsebujeta specializirane kostne celice. Popolnoma diferencirani **osteoblasti** proizvajajo in izločajo proteine, ki so sestavni del kostnega matriksa in nadzirajo njegovo kasnejšo mineralizacijo. Izvirajo iz pluripotentnih mezenhimskih matičnih celic kostnega mozga in so del fibroblastnih kolonijskih enot. Njihov glavni produkt je kolagen tipa I. Zrele osteoblastne celice so nujne za izvajanje procesa mineralizacije oziroma odlaganja hidroksiapatita v kosteh. Izločajo encim alkalno fosfatazo, ki je usidrana na zunanji strani površine plazemske membrane in določa dnevno hitrost mineralizacije (3, 4). Največje celice v kosteh so **osteociti**. Nastanejo iz osteoblastov, ki se ujamejo v notranjost lakune mineraliziranega matriksa ali pa ostanejo

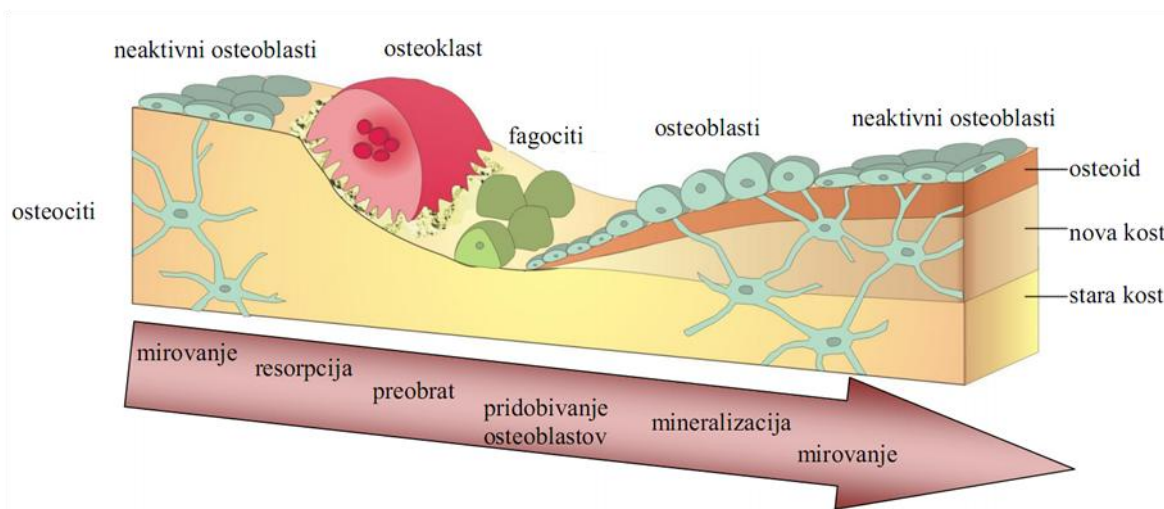
na površini kosti, kjer izločajo kolagenazo in s tem omogočijo oprijem osteoklastom. Medsebojna komunikacija poteka s pomočjo mnogokratnih podaljškov plazemske membrane, ki potekajo vzdolž kanalikul, napolnjenih s kostno zunajcelično tekočino. Njihova postavitve jim omogoča mehanosenzorno zaznavanje potreb po remodelaciji kosti, zaradi morebitne funkcionalne prilagoditve okostja ali potreb po popravilu mikropoškodb (3). Glavna vloga večjedrnih celic, **osteoklastov**, je posredovanje pri resorpciji kalcificiranega kostnega matriksa. Izvirajo iz hematopoetskih monocitno-makrofagnih vrst. Membrana osteoklastov vsebuje integrine, s pomočjo katerih prepoznajo pritrditveno mesto, kjer se usidrajo v matriks. Od ATP odvisne protonske črpalke v membrani osteoklasta ustvarjajo kislo mikrookolje, v katerem poteka resorpcija hidroksiapatita. Osteoklasti proizvajajo še nekatere lizosomske encime (npr. TRAP, katepsin K) in imajo receptorje za kalcitonin in estrogen (4).

1.1.2 Fiziološko obnavljanje kosti

Proces modeliranja okostja poteka v obdobju rasti in razvoja kosti, t.j. od zarodka do 20. leta starosti. V tem času okostje pridobi svojo obliko, velikost in največjo kostno maso (ang. *peak bone mass*). Kadar okostje doseže svojo največjo razvitost, stopi v ospredje ciklični proces obnavljanja kosti oziroma **remodelacija**. Letno se na ta način zamenja 5 - 10 % okostja. Za popolno obnovitev okostja odraslega je potrebnih vsaj 10 let (2).

Za razgradnjo kosti so odgovorni osteoklasti, medtem ko so za nastanek nove kosti odgovorni osteoblasti. Oboji pripadajo edinstveni strukturi, imenovani osnovna večcelična enota (BMU, ang. *basic multicellular unit*) oziroma kostna remodelacijska enota (BRU, ang. *bone remodelling unit*). Posamezna enota obsega skupino osteoklastov v ospredju ter skupino osteoblastov v ozadju, centralno žilno kapilaro in oživčenje. Remodelacija kortikalne in trabekularne kosti se začne z razgaljenjem kostne površine zaradi umika neaktivnih ploščatih osteoblastov. Nato sledi **aktivacija osteoklastov**, ki se pripenje na tarčno površino kosti ter jo izdolbejo z nakisanjem in proteolitično presnovo (**faza resorpcije**). V **fazi preobrata** se osteoklasti umaknejo (BMU se pomika naprej), enojedni fagociti pa očistijo lakune in jih obložijo s cementno plastjo. Te nadomestijo osteoprogenitorne celice, ki se diferencirajo v osteoblaste (**faza pridobivanja osteoblastov**). V **fazi mirovanja** te zapolnijo nastale vdolbine in sprožijo proces nastanka nove kosti in tvorbo osteocita (5, 6, 7). Posamezna BMU ima življenjsko dobo šest do

devet mesecev in v tem obdobju zamenja $0,025 \text{ mm}^3$ kostne mase. Njena življenjska doba je veliko daljša od življenjske dobe osteoklastov (dva tedna) in aktivnih osteoblastov (tri mesece) (3).



Slika 1: Prikaz remodelacije kosti (8).

Proces remodelacije kosti kontrolirajo sistemsko ali krajevno proizvedeni citokini, parathormon (PTH), 1,25-dihidroksiholetkalciferol ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$), kalcitonin in insulinu podobni rastni dejavniki (ang. *insulin-like growth factors*). Vzdrževanje zdrave, mehansko odporne, kostne mase je odvisno od ravnotežja med nastajanjem in razgradnjo kosti. Prevlada procesa razgradnje kosti je značilna za bolezen osteoporozo.

1.2 Osteoporoz

Osteoporoz je sistemska bolezen okostja, pri kateri je izmerjena mineralna kostna gostota (MKG) za 2,5 ali več standardnih deviacij (SD) večja pod povprečno vrednostjo za mlade odrasle osebe, ob sočasni spremembi mikroarhitekture kostnega tkiva, kar vse vodi do večje lomljivosti kosti (2). Ločimo dve veliki skupini osteoporoze:

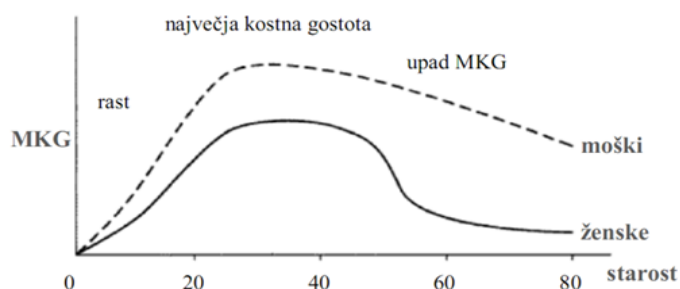
- primarna osteoporoz, ki je lahko
 - juvenilna osteoporoz,
 - idiopatična osteoporoz ali
 - involutivna osteoporoz, ki jo delimo na
 - *pomenopavzhalno osteoporozo* in
 - *senilno osteoporozo*;

- sekundarna osteoporoza, ki nastane kot posledica drugih bolezni ali delovanja toksičnih snovi na kost.

Pomenopavzalna osteoporoza se pojavi pri ženskah med 50. in 70. letom starosti. Vzrok za njen pojav je pomanjkanje estrogenov, kar zviša raven izražanja osteoblastogeneze in osteoklastogeneze, vendar je življenjska doba osteoblastov skrajšana, medtem ko je pri osteoklastih podaljšana. Posledica tega je povečana remodelacija s povečano resorpcijo in zmanjšano tvorbo kosti, kjer ima novo nastala kost manjšo MKG. Za pomenopavzalno osteoporozo so značilni kompresijski zlomi vretenc, zlomi reber, medenice, najbolj distalnega dela koželjnice in podlahtnice, t.j. tistih kosti, kjer po sestavi prevladuje trabekularna kost (3, 7). **Senilna osteoporoza** se pojavlja v visoki starosti nad 70 let in prizadene tudi moške. Količina novo nastale kosti se med vsakim ciklusom remodelacije s starostjo zmanjšuje. Vzroki te oblike osteoporoze so zmanjšana absorpcija kalcija iz črevesa, posledično zvišane ravni PTH v krvi ter zmanjšano nastajanje $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ v ledvicah (7).

1.2.1 Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze

Za kasnejši morebitni razvoj osteoporoze je odločilna največja kostna masa, dosežena ob koncu pubertete. Na doseženo vrednost največje kostne mase vplivajo **genetski faktorji** (belci dosegaajo najmanjše vrednosti MKG med vsemi rasami in MKG je pri ženskah manjša). Telesna vadba mladostnikov pomembno prispeva k večjim vrednostim MKG v obdobju razvoja, prav tako **prehrana** bogata s kalcijem. S **starostjo** se kostna masa vztrajno zmanjšuje. K dodatnemu zmanjšanju pripomorejo zmanjšane ravni, oziroma **izguba spolnih hormonov** (estrogen, testosteron) ter spremembe v črevesju, povezane z zmanjšano absorpcijo kalcija v kri.



Slika 2: Vpliv staranja na izgubo mineralne kostne gostote (9).

Dodatni dejavniki za osteoporozo so še:

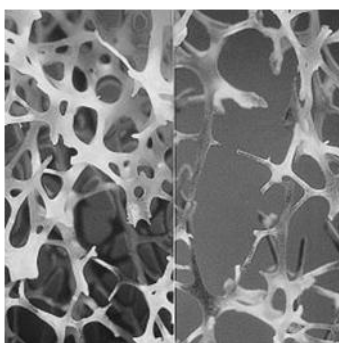
- življenjske razvade – kajenje, čezmerno uživanje alkohola,
- indeks telesne mase (ITM), manjši od 20 kg/m^2 ,
- jemanje nekaterih zdravil (npr. glukokortikoidi),
- telesna neaktivnost ali prekomerna telesna vadba (možen pojav amenoreje),
- pomanjkanje vitamina D,
- spremljajoče kronične bolezni: sladkorna bolezen, hipertiroidizem, ateroskleroza, hiperparatiroidizem (1, 2, 10).

1.2.2 Klinična slika

Osteoporozo je pred pojavom osteoporoznih zlomov neznačilna in nerazpoznavna. Že majhne telesne obremenitve lahko povzročijo kompresijski zlom vretenc (običajno med osmim prsnim in drugim ledvenim vretencem). Kasnejši ponovni zlomi vretenc vodijo do deformacije hrbtenice in kronične tope bolečine v hrbtu, ki pa ni vedno sorazmerna s stopnjo osteoporoze. Kadar pride do postopne deformacije vretenc, je bolnik lahko povsem brez bolečin. Zaradi kompresijskih zlomov prsnih in ledvenih vretenc se zmanjša telesna višina tudi do 20 cm in nastane značilna ukrivljenost hrbta v predelu prsnega koša (torakalna kifoza).

Najhujši zaplet osteoporoze je zlom kolka, ki nastane zaradi zmanjšanja kortikalnega in trabekularnega dela kosti. Zlomi kosti pri osteoporozni niso posledica zgolj količinskega zmanjšanja kostnine, ampak tudi strukturnih kostnih sprememb, kot je tanjšanje trabekul. Te sprva postanejo luknjičaste, nato izginejo, prostori med trabekulami pa se večajo. Najmanjše nepravilnosti kosti se zaradi upočasnenih remodelacijskih procesov v starosti,

ne popravljajo več pravočasno in popolno, zato pride do zloma že ob majhnem padcu ali neprimerni obremenitvi (10).



Slika 3: Mikroarhitektura zdrave (levo) in osteoporotične kosti (desno) (11).

1.2.3 Diagnostika

Po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) je diagnozo osteoporoze možno postaviti na osnovi merjenja mineralne kostne gostote (MKG) z **dvoenergetsko rentgensko absorpciometrijo** (DEXA, ang. *dual-energy X-ray absorptiometry*) ali na osnovi že dokazanih osteoporotičnih zlomov. Pri metodi dvoenergijske rentgenske absorpciometrije gre za absorpcijo dveh rentgenskih žarkov pri prehodu skozi kosti, pri čemer en žarek meri absorpcijo mehkega tkiva, drugi pa absorpcijo celotnega okostja. Razlika obeh žarkov je absorpcija zaradi kostne mase.

Preglednica I: Definicija osteoporoze na osnovi merjenja MKG z DEXA (10).

MKG standardni odklon (T)	poimenovanje
0 do -1	normalna kostna gostota
-1 do -2,5	osteopenija
pod -2,5	osteoporoza
pod -2,5 + zlomi	huda osteoporoza

Poleg DEXA so za oceno MKG na voljo še nekatere druge tehnike:

- **enoenergetska rentgenska absorpciometrija** (ang. *single-energy absorptiometry*), ki podobno kot DEXA, omogoča določitev MKG obrobnih delov okostja (npr. zapestje, petnica, podlaht), medtem ko je z DEXA možna določitev MKG tudi vretenca in kolka. Za razliko od DEXA, ki temelji na usmeritvi snopov žarkov dveh energij skozi preiskovan del telesa, se pri tej metodi uporablja snop žarkov ene energije (2, 12).

- najstarejša, najenostavnejša in najmanj zanesljiva metoda je **enojna fotonska absorpciometrija** (ang. *single photon absorptiometry*), kjer je ^{125}I vir sevanja. Metoda ni primerna za merjenje kosti, ki jih obdaja več mehkih tkiv, zato se uporablja za merjenje kostne gostote obrobni delov okostja (npr. petnica). Na klinično pomembnih mestih (vretenca, kolk) meritve s SPA niso možne.
- metoda **dvojne fotonske absorpciometrije** (ang. *dual-photon absorptiometry*) izkorišča gama žarke z dvema različnima energijama, in sicer ^{153}Gd , ki seva fotone dveh energij. S to metodo lahko merimo kostno gostoto celotnega telesa, hrbtenice in kostno maso vratu in velike grče stegenice (13).
- **kvantitativna računalniška tomografija** (ang. *computed tomography*) omogoča volumetrično določitev (v mg/cm^3) trabekularne in kortikalne gostote vretenc in kolka, kot tudi obrobni delov okostja (podlaket, golenica). Metoda temelji na ustvarjanju tridimenzionalne podobe notranjosti opazovanega predmeta na osnovi velikega števila serij dvodimenzionalnih rentgenskih žarkov okrog iste rotacijske osi. Končna informacija je podoba, ki odraža sposobnost odboja rentgenskih žarkov od različnih struktur v organizmu (14).
- **kvantitativna ultrazvočna denzitometrija** (ang. *quantitative ultrasound densitometry*) temelji na merjenju hitrosti zvoka (ang. *speed of sound*) in/ali širokopasovnega pojemanja ultrazvoka (ang. *broadband ultrasound attenuation*). Metoda se uporablja za napovedovanje zlomov pri pomenopavzalnih ženskah (v vretencih, kolkih in za oceno celokupnega tveganja za zlom). Prednost metode je neizpostavljenost rentgenskim žarkom (12).
- **scintigrafija okostja** je invazivna metoda, pri kateri je potrebna intravenska aplikacija radiofarmacevtika. Metoda z aplikacijo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -metilendifosfonata dobro ločuje med osteoporotičnimi zlomi vretenc, ki povzročajo heterogene spremembe kostnega mozga, in metastazami, ki povzročajo homogene spremembe kostnega mozga in proizvedejo homogen signal (15).
- **kostna biopsija** je invazivna metoda, pri kateri se z uporabo električnega svedra odvzame vzorec tkiva iz grebena črevnice. Histopatološki pregled omogoča oceno deleža kostnine v vzorcu (kortikalna in trabekularna kostnina), celično aktivnost (osteoblasti, osteociti, osteoklasti), oceno zrele kosti, količine osteoida in pregled okolnega kostnega mozga ter njegove celičnosti. Indikacije za kostno biopsijo so

sum na osteomalacijo oziroma neznanu razmerje med osteoporozo in osteomalacijo ter pomenopavzalna osteoporozna z nenavadnim potekom (16).

Določitev **biokemičnih označevalcev** omogoča spremljanje morebitnih sprememb tvorbe oziroma razgradnje kostne mase, t.j. kostne premene (ang. *bone turnover*), istovetenje hitre ali počasne izgube kostne mase v pomenopavzalnem obdobju in neodvisno prognostično oceno tveganja za osteoporozo ali zlom. Prav tako omogočajo spremljanje uspešnosti zdravljenja osteoporoze in so v pomoč pri nadaljnjem sprejemanju odločitev glede zdravljenja. Slabost določitev biokemičnih označevalcev je premajhna občutljivost in specifičnost za prognozo osteoporoze pri posameznih nezdravljenih bolnikih (17).

Biokemični označevalci kostne tvorbe:

- BALP – kostna alkalna fosfataza (ang. *bone alkaline phosphatase*) je encim, ki ga izločajo osteoblasti in je kazalec njihove aktivnosti; določamo v serumu.
- OC – osteokalcin (ang. *osteocalcin*) izločajo osteoblasti v fazi mineralizacije kosti; določamo v serumu.
- PICP – prokolagen tip I C propeptid (ang. *C-terminal propeptide of type I collagen*), ki nastane po cepitvi molekule prokolagena tipa I; določamo v serumu.
- PINP – prokolagen tip I N propeptid (ang. *N-terminal propeptide of type I collagen*), ki nastane po cepitvi molekule prokolagena tipa I; določamo v serumu.

Biokemični označevalci kostne resorpcije:

- HYP – hidroksiprolin (ang. *hydroxyproline*) se nahaja v kolagenu; določamo v urinu.
- PYP – piridinolin (ang. *pyridinoline*), ki nastane po razgradnji kolagena; določamo v urinu.
- DPD – deoksimiridinolin (ang. *deoxypyridinoline*), ki nastane po razgradnji kolagena in je bolj specifičen v primerjavi z PYP; določamo v urinu.
- ICTP – prečnopovezani karboksiterminalni telopeptid kolagena tipa I (ang. *cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen*); določamo v serumu.
- CTX – karboksiterminalni prečno povezani telopeptid, ki nastane pri razgradnji ICTP; določamo v serumu ali urinu.

- NTX – aminoterminalni prečnopovezani telopeptid; določamo v serumu ali urinu.
- TRAP - tartrat rezistentna kislina fosfataza (ang. *tartrate-resistant acid phosphatase*), ki jo izločajo osteoklasti; določamo jo v serumu.
- Ca – kalcij; določamo v urinu.
- GHYL – glikozid hidroksilizina (ang. *hydroxylysine-glycosides*) nastane pri razgradnji kolagena; določamo v urinu (16, 17).

Eden najnovejših prognostičnih kazalcev osteoporoze je **indeks FRAX** (ang. *fracture risk assessment tool*). Ta z uporabo računalniškega programa in ob upoštevanju posameznikovih značilnosti, kot so starost, spol, vrednost MKG in drugih dejavnikov tveganja (ITM, pojav zloma kosti v družini, kajenje, pitje alkohola, zdravljenje z glukokortikosteroidi, revmatoidni artritis, itd.) predvidi odstotek možnosti zloma kosti v nadaljnjih desetih letih (19). Diagnostični kazalec se, kot del diagnostike osteoporoze, še ponekod (tudi v Sloveniji) ne izvaja.

Pred pričetkom zdravljenja ugotovljene osteoporoze je obvezno izključiti sekundarno osteoporozo z naslednjimi preiskavami v serumu oziroma krvi: krvna slika, kalcij, fosfat, alkalna fosfataza, kreatinin, proteinogram, aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, tiroideo stimulirajoči hormon, pri moških celokupni testosteron (20).

1.2.4 Prevalenca

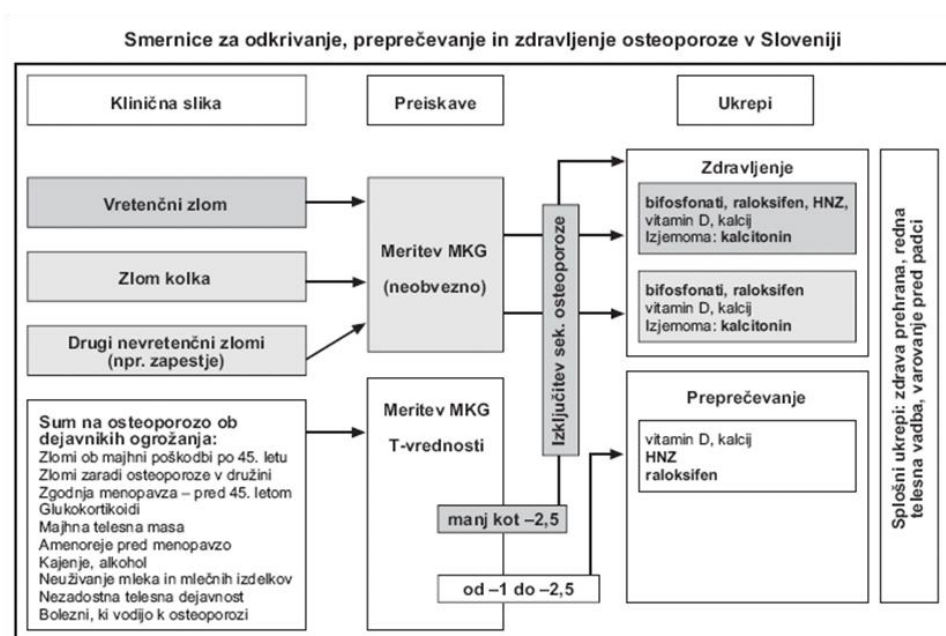
V raziskavi leta 2001 so pri 1332 preiskovankah od 2196 (61 %) ugotovili osteoporozo z merjenjem MKG ledvene hrbtenice in/ali kolka z DEXA. V raziskavi so sodelovale preiskovanke, ki so morale izpolnjevati naslednja merila: vsaj petletno pomenopavzalno obdobje, ITM manj kot 26 kg/m² in nikoli prej diagnosticirana osteoporozo. Rezultati raziskave so pokazali, da je prevalenca osteoporoze pri mlajših od 55 let 34 %, v skupini od 55 do 59 let je ta 50 %, pri starejših od 60 let pa 69 %. Preiskovank obolelih za osteoporozo, mlajših od 55 let, je bilo 8 %, starejših od 75 let pa 17 % (21).

V študiji prevalence osteoporoze v Sloveniji, opravljene leta 2006, je sodelovalo 509 preiskovancev, od tega 341 žensk, starejših od 50 let, in 168 moških, starejših od 60 let. Za ugotavljanje osteoporoze so merili MKG preiskovancev z metodo DEXA. Izvidi meritev z DEXA so pri 143 preiskovancih (23,4 %) pokazali vrednosti, značilne za osteoporozo.

Rezultati študije so pokazali, da je prevalenca osteoporoze pri ženskah nad 65. letom starosti 41,2%, pri moških nad 65. letom starosti pa 15,7% (22).

1.2.5 Zdravljenje

Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze v Sloveniji temeljijo na priporočilih International Osteoporosis Foundation ali IOF (Osteoporosis Intern 1999; 259-265) in »Medical Guidelines for clinical practice for the prevention and management of postmenopausal osteoporosis« (Endocrine Practice 2001; 7: 293-312). Smernice navajajo



Slika 4: Smernice za zdravljenje osteoporoze v Sloveniji, po priporočilih IOF in »Guidelines for clinical practice for the prevention and management of postmenopausal osteoporosis« (20).

uporabo naslednjih zdravil: zaviralcev kostne resorpcije (hormonsko nadomestno zdravljenje oziroma HNZ, bisfosfonati, raloksifen, kalcitonin), jemanje pripravkov s kalcijem in vitaminom D ter jemanje analogov vitamina D (1,25-(OH)₂D₃, alfakalcidiol) (20). Vendar sta leta 2003 Evropska agencija za zdravila (EMA) in Ameriška agencija za zdravila (FDA) podali svoje priporočilo po katerem HNZ ni primerno zdravilo izbora za zdravljenje osteoporoze, ker je tveganje večje od koristi samega zdravljenja za to indikacijsko področje. Zato danes velja, da HNZ ni zdravilo prvega izbora tako pri preprečevanju kot zdravljenju osteoporoze (19).

Smernice ne vključujejo nekaterih novejših možnosti za zdravljenje:

- stroncijev ranelat – povečuje osteoblastogenezo in sintezo osteocitom podobnih celic;
- teriparatid – humani rekombinantni parathormon, ki pri bolnicah s pomenopavzalno osteoporozo za polovico zniža tveganje za vretenčne in nevretenčne zlome;
- denosumab – monoklonsko protitelo, ki zavira receptorski aktivator RANKL in na ta način zavira osteoklastogenezo, hkrati pa zmanjšuje kostno premeno in zvišuje MKG pri osteoporotičnih bolnikih;
- novi selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM) – lazofoksifen in arzoksifen (slednji je zaenkrat še predmet raziskav).

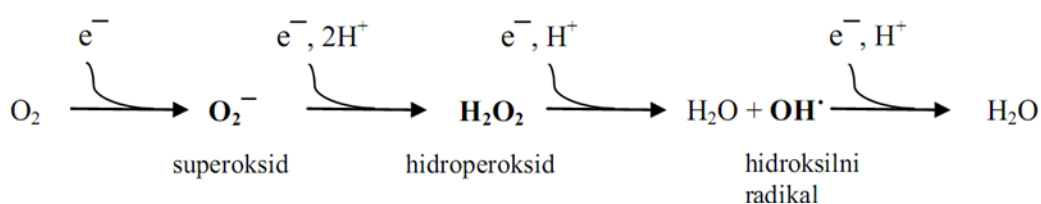
Zaviralci katepsina K, aktivatorji kalcijevih receptorjev (kalcimimetiki), anti-sklerostin monoklonska protitelesa in zaviralci aktivina predstavljajo nekatera nova izhodišča za zdravljenje osteoporoze in so zaenkrat predmet raziskav (23).

1.3 Oksidativni stres

Oksidativni stres nastane zaradi porušenega ravnovesja med produkti, nastalimi pod vplivom snovi z oksidativnimi lastnostmi (»pro-oksidenti«) in snovmi z antioksidativnimi lastnostmi. Ravnotežje v prid nastanku oksidiranih produktov v organizmu, pomeni večjo možnost za razvoj patoloških stanj. Živi organizmi so nenehna tarča napadov reaktivnih spojin, kot so reaktivne kisikove spojine (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Najpomembnejši endogeni vir ROS so reaktivni intermediati, ki nastanejo pri redukciji kisika v vodo v reakciji oksidativne fosforilacije, ki je glavni vir celične energije. To so superoksid, hidroperoksid in hidroksilni radikal.

ROS se v njihovih reakcijah pridružujejo tudi reaktivne dušikove spojine (RNS). Tako na primer potencialno citotoksičnemu peroksinitritu (ONOO⁻), ki nastane po reakciji superoksida in dušikovega oksida (NO), pripisujejo povezavo z različnimi nevrotoksičnimi stanji in nevrodegenerativnimi boleznimi (24).

ROS lahko nastanejo tudi po aktivaciji nevtrofilcev in makrofagov, v stanju hiperoksije, ishemično-reperfuzijskih stanjih, posledično zaradi kroničnega uživanja alkohola, prekomerne telesne vadbe, staranja, ob izpostavitvi različnim sevanjem (gama-, rentgensko-, UV-), cigaretnemu dimu in drugim onesnaževalcem ozračja.



Slika 5: Reakcija redukcije molekule O_2 (41).

Obrambni sistem zoper oksidativni stres sestavljajo tako eksogeni in endogeni antioksidanti (»lovilci radikalov«), encimi z antioksidativnimi lastnostmi kot tudi celični mehanizmi. Encimi reagirajo z ROS in jih pretvorijo v netoksične produkte, medtem ko vitamin E, flavonoidi ter endogeni antioksidanti, kot je sečna kislina, zaključijo radikalno verižno reakcijo. Med lovilce radikalov z encimatskimi lastnostmi sodijo superoksid-dismutaza (SOD), katalaza, glutation-peroksidaza in glutation-reduktaza. Lovilci radikalov, ki nimajo encimatskih lastnosti, so vitamin E, askorbinska kislina, karotenoidi, sečna kislina ter melatonin. Če oksidativni stres ni ustrezno uravnan z antioksidativnimi obrambnimi mehanizmi, lahko pride do nastanka neposrednih in posrednih poškodb celic ter tkiva. Tarče neposrednih poškodb so nukleinske kisline, proteini, lipidi in majhne molekule (npr. biogeni amini). Posredne poškodbe so bolj kompleksne in pomenijo poseg v številne celične procese, vključno s tistimi, ki aktivirajo gene, povezane s promocijo apoptoze (25, 41).

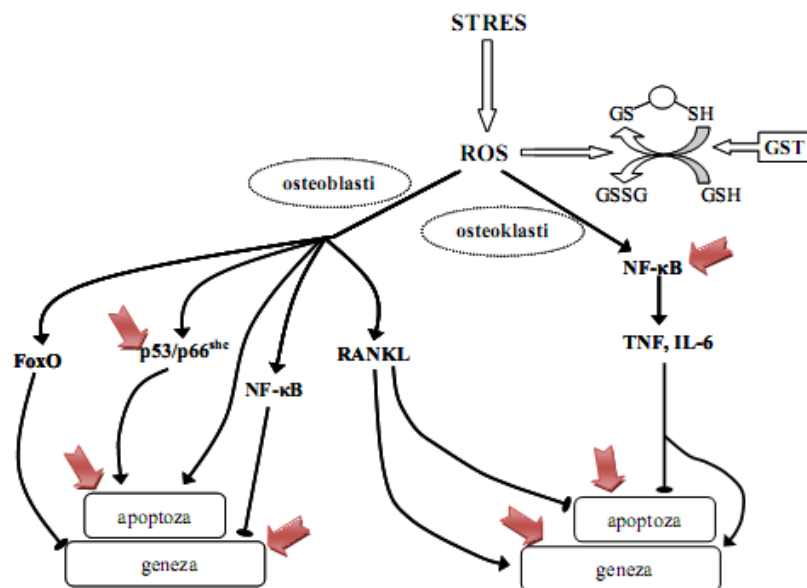
1.3.1 Oksidativni stres in osteoporoza

Visoke ravni ROS porušijo redoks ravnovesje v celici in jih podvržejo oksidativnemu stresu, ki je povezan z etiologijo nekaterih degenerativnih obolenj: diabetesom, aterosklerozo, artitritsom, nevrodegenerativnimi boleznimi, rakavimi obolenji in procesom staranja. Zvišane ravni ROS imajo dva učinka: poškodujejo celične komponente ali pa sprožijo specifične fiziološke signalne poti (26, 27).

Sprožitev fizioloških signalnih poti poteka prek različnih transkripcijskih dejavnikov: HSF-1 (ang. *heat shock factor 1*), jedrnega faktorja κB (NK- κB), tumor supresorskega proteina p53 ali prek signalnih poti encimov, ki vplivajo na transkripcijske dejavnike (sistemi PI3K/Akt, JNK, p38/MAPK). Končni odgovor vpliva tako na gensko podvojevanje kot na gensko prepisovanje in je odvisen od trajanja in jakosti stresa oziroma vrste sproženih signalnih poti in ravnovesja med njimi. Jakost oksidativnega stresa se večja

s staranjem, zato je končni odgovor signalnih poti povezan z zmanjšano delitvijo, rastjo in diferenciacijo celic kot tudi celično smrtjo (26).

Nekatere signalne poti so občutljive na ROS – za osteoklaste so bistveno pomembne NF- κ B, c-Jun aminoterminalna kinaza (JNK), fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K) in p38 MAP kinaza (26, 28, 29). Na diferenciacijo osteoklastov skupaj pomembno vplivata dva dejavnika: M-CSF (ang. *macrophage colony stimulating factor*) in membranski citokin RANKL, ki je aktivator receptorja NF- κ B (oziroma RANK). RANKL se veže na receptorje RANK, ki se nahajajo na površini hematopoetskih prednic osteoklastnih celic in tako stimulira diferenciacijo v zrele osteoklastne celice. Tej dejavnosti nasprotuje receptor osteoprotegerin (OPG), ki tekmuje z receptorji RANK za vezavo liganda. Večje izražanje RANKL v osteoblastih sprožajo 1,25-(OH) $_2$ D $_3$, PTH ter citokini interleukin-6 (IL-6), interleukin-11 (IL-11) in interleukin-1 (IL-1). Pomanjkanje estrogena, ob pridruženih dejavnikih, kot so starost in povečan nastanek ROS, spodbujajo izražanje RANKL v stromalnih osteoblastnih celicah in posledično vplivajo na povečano tvorbo osteoklastov in resorpcijo kosti. Vpliv ROS na izražanje RANKL so proučevali Bai in sodelavci, ki so ugotovili, da omenjena povezava lahko sproži osteoporozo pri miših (30).



Slika 6: Shematski prikaz aktiviranih signalnih poti z ROS in vpliv na življenjsko dobo osteoblastov in osteoklastov. Rdeče puščice prikazujejo mesta, kjer s svojim delovanjem vpliva estrogen zaviralno(31).

Celica se brani zoper ROS z zvišanjem ravni encimov oziroma lovilcev radikalov kot sta manganova superoksid-dismutaza (Mn-SOD) in katalaza ter s povečanim izražanjem

genov, odgovornih za popravljanje poškodb DNA (npr. Gadd45). Tak odgovor zahteva aktivacijo družine transkripcijskih faktorjev imenovanih FoxO (ang. *Forkhead Box O*), za katero je potrebna vezava proteina β -katenina, kar so na osteoblastnih celičnih linijah pokazali Manolagas in sodelavci. β -katenin se po vezavi proteina Wnt na receptorski kompleks LRP5 ali LRP6 (ang. *low density lipoprotein receptor-related proteins 5 or 6*), kopiči v citoplazmi. Združen s T-celičnim faktorjem (TCF, ang. *T-cell factor*) uravnava izražanje Wnt tarčnih genov. Wnt/ β -kateninska signalna pot je povezana s povečanjem kostne mase zaradi spodbujanja osteoblastogeneze, zaviranja apoptoze osteoblastov in zaviranja osteoklastogeneze. Manolagas in sodelavci so v isti raziskavi pokazali, da oksidativni stres (ponazorjen z H_2O_2) spodbuja združevanje proteinov FoxO in β -katenina in, da H_2O_2 spodbuja transkripcijo FoxO preko Wnt-/TCF-transkripcije in diferenciacije osteoblastov (32, 33).

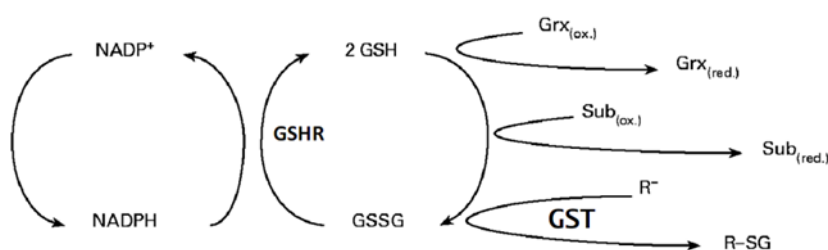
Povečana proizvodnja ROS v celici je povezana tudi s citokini. Na njihovo izražanje v organizmu pomembno vpliva prisotnost spolnih hormonov. Estrogen in testosteron sta povezana z zmanjšano produkcijo citokina IL-6 ter zmanjšano ekspresijo dveh podenot receptorja za IL-6 (IL-6R α in gp130) v stromalnih osteoblastnih celicah kostnega mozga (3, 34, 35, 36). Poleg tega IL-6 v kombinaciji z IL-1 stimulira resorpcijo kosti v miših (37). Estrogen bi naj, poleg IL-6, zmanjšal še izražanje citokinov tumorje-nekrotizirajočega faktorja α (TNF- α) ter IL-1 v stromalnih celicah osteoklastne vrste (38, 39). ROS vplivajo na povečano izražanje TNF- α ter na ta način povečujejo izgubo kosti v stanjih pomanjkljivega antioksidativnega obrambnega sistema, kot je ovariektomija (40). Pomanjkanje estrogena in povečano nastajanje citokinov IL-1, IL-6 in TNF- α je povezano s porastom števila osteoblastov in osteoklastov ter z obsegom njihove aktivacije. Kvalitativna posledica je globlja erozija osteoklastov, ki lahko po sprva prehodnem zmanjšanju kostne gostote, ob prehodu osteoklastov v trabekularno kost, povzroči nepovratne spremembe (5).

Osteoklasti vsebujejo encim citokrom b_{558} , del NADPH-oksidadnega elektronskega transportnega sistema, ki proizvaja ROS *in situ* med kostno resorpcijo (42). Rezultati *in vitro* študij na celicah podgan so pokazali, da ROS tudi neposredno aktivirajo osteoklaste (43, 44).

1.4 Glutation S-transferaza

Celica je neprestano izpostavljena ksenobiotikom, na katere se je, zavoljo preživetja, biološko privadila tako, da je razvila biokemijsko zaščito. Med encime, ki sodelujejo v procesu detoksikacije oziroma biotransformacije ksenobiotikov, spadajo tudi glutacion S-transferaze (GST). Gre za družino encimov, ki opravljajo vrsto nalog v celici, kot so: odstranjevanje ROS, regeneracija tiolnih funkcionalnih skupin celičnih proteinov (nastalih v procesu oksidativnega stresa), kataliza konjugacij s celičnimi endogenimi ligandi in kataliza presnovnih poti, ki niso povezane z detoksikacijo (45). Medtem ko v reakcijah I. faze poteka biotransformacija ksenobiotikov predvsem z encimi citokrom P-450 monooksigenaznega sistema, GST sodelujejo v reakcijah II. faze. Katalizirajo konjugacijo ligandov z GSH in redukcijo hidroperoksidov do nastanka oksidirane glutaciona (GSSG). GST so dimerni, večinoma citosolni encimi. Obstajajo tudi mikrosomalni GST, ki so vključeni v presnovo membranskih eikozanoidov; imenovani MAPEG (ang. *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione*) (46).

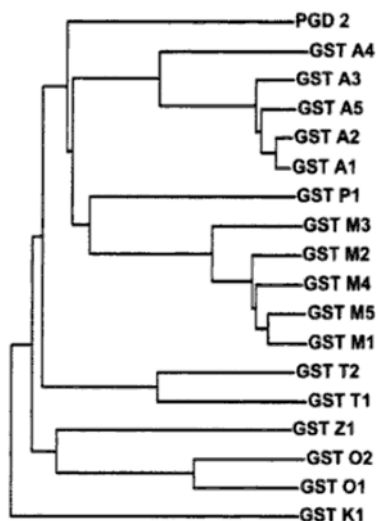
Družina citosolnih glutacion S-transferaz je razdeljena v razrede, ki se med seboj razlikujejo v aminokislinskem zaporedju, imunoloških in kinetičnih lastnostih. Do danes je znanih 8 razredov, v katere so razvrščeni citosolni GST sesalcev: alpha, kappa, mu (M), omega, pi, sigma, theta (T) in zeta. Te kodirajo geni petih različnih lokusov: *alpha*, *mu* (M), *theta* (T), *pi* in *gamma* (48). Znotraj posameznega razreda encimov obstaja vsaj 60 % istovetnost. Največji poudarek je na primarni strukturi N-terminalnega konca, ki je znotraj razredov najbolj ohranjena in vsebuje del aktivnega mesta – aminokislinski ostanki tirozina, serina in cisteina – ki reagira s tiolno skupino glutaciona (49).



Slika 7: Poenostavljen prikaz vpletenosti glutacion S-transferaze v redoks reakcije glutaciona. $Sub_{(ox.)}$ in $Sub_{(red.)}$ se nanašata na oksidiran in reduciran substrat, GSHR predstavlja glutacion reduktazo; GST označuje glutacion-S-transferazo; $Grx_{(ox.)}$ in $Grx_{(red.)}$ se nanašata na oksidiran in reduciran glutaredoksin; R^- predstavlja nukleofilno sestavino; R-SG predstavlja sestavino konjugirano z glutacionom (47).

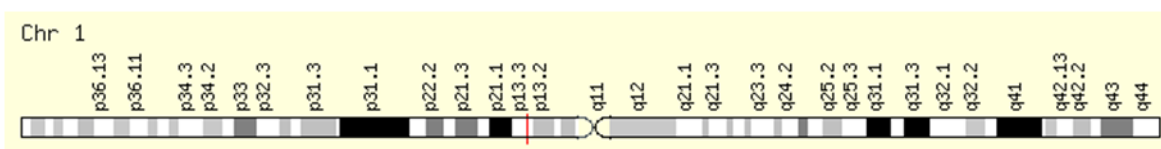
1.4.1 Glutation S-transferaza mu 1 (*GSTM1*) in glutation S-transferaza theta 1 (*GSTT1*)

GSTM1 je eden izmed genov, ki kodirajo mu razred encimov GST in je del organizirane gruče genov na prvem kromosomu, na kromosomski regiji p13.3. *GSTM1* je velik 5.926 bp, vsebuje deset eksonov in je visoko polimorfen (51, 52). *GSTM1* encim je v



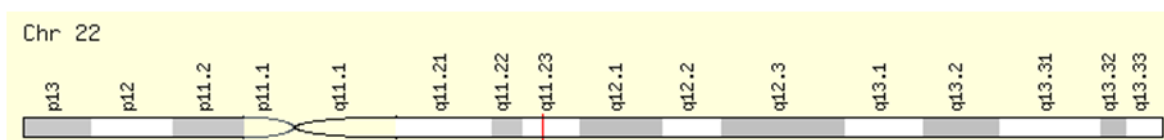
Slika 8: Filogenetsko drevo citosolnih GST encimov. (PGD 2 – prostaglandin D₂ sintaza) (50).

človeškem organizmu prisoten predvsem v jetrih. Precej manj ga je v modih, še manj v možganih, nadledvični žlezi, ledvicah in trebušni slinavki. Najmanj ga je prisotnega v pljučih in srcu (53).



Slika 9: Lokacija gena *GSTM1* na 1. kromosomu (52).

Geni, ki kodirajo razred theta encimov GST, se nahajajo na dvaindvajsetem kromosomu, na kromosomski regiji p11.23. Mednje sodi tudi *GSTT1*, ki je velik 8.131 bp in vsebuje šest eksonov. Za katalitično aktivnost encima *GSTT1* ima večji pomen serinski aminokislinski ostanek na N-terminalnem koncu (54). *GSTT1* je v človeškem organizmu prisoten predvsem v ledvicah in jetrih, manj pa v tankem črevesu, vranici, možganih, prostati, trebušni slinavki in modih. Podobno kot *GSTM1*, je *GSTT1* najmanj prisoten v srcu in pljučih (53).



Slika 10: Lokacija gena *GSTT1* na 22. kromosomu (52).

1.4.2 *GSTM1*, *GSTT1* in genski polimorfizem

DNA človeka je predmet številnih sprememb (mutacij), kar na ravni zaporedja baz lahko povzroči zamenjavo, delecijo ali pa insercijo ene ali večih nukleotidnih baz. Spremenjeno DNA zaporedje spremeni gensko informacijo (gen). Različno spremenjena DNA zaporedja, ki se pojavljajo na istem mestu na kromosomu oziroma lokusu, se imenuje aleli. Število spremenjenih zaporedij DNA na istem lokusu se izraža kot število alelov oziroma polimorfizmov (55).

Koncept genskega polimorfizma izhaja iz dognanj, da veliko fenotipskih lastnosti, kot so krvne skupine, histokompatibilni antigeni in variante encimov, obstajajo v človeški populaciji v taki pogostnosti, ki se je ne da razložiti kot posledico spontanah mutacij (56). Genski **polimorfizem** je definiran kot monogenska lastnost, ki obstaja v populaciji v vsaj dveh fenotipih (in verjetno v vsaj dveh genotipih), od katerih nobeden ni redek oziroma je njuna pogostnost večja od 1 %. Genski polimorfizem ima evlucijski vpliv in pomeni odgovor organizma na spremembe v okolici (npr. na toksične snovi ali sestavine hrane). Posledica je tudi sprememba v strukturi prebivalstva, ker se povečuje možnost za preživetje. Najpomembnejša klinična posledica evolucije encimov v človeškem organizmu pa je polimorfizem v presnovi endogenih in eksogenih spojin. Najpogostejši genski polimorfizem *GSTM1* in *GSTT1* je homozigotna delecija: genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0*, v nadaljevanju delecijska polimorfizma *GSTM1*0* in *GSTT1*0*. Posledično nastane protein brez encimske aktivnosti in s povečano občutljivostjo na citogenetske poškodbe (57).

Podatki meta-analize izvedene na 12.525 Kavkazijcih, 2.136 Azijcih ter 996 Afro-američanih navajajo pogostnosti delecijskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* (58). *GSTM1*0/GSTM1*0* genotip je prisoten pri 53,1 % Kavkazijcev (območje 42 – 60 %), pri 27 % Afro-američanov (območje 16 - 36 %) in pri 53 % Azijcev (območje 42 – 52 %).

Genotip *GSTT1*0/GSTT1*0* je prisoten pri 20 % Kavkazijcev (območje 13 – 26 %) in pri 47 % Azijcev (območje 35 – 53 %) (58, 59).

Encima *GSTM1* in *GSTT1* ščitita celice pred stranskimi produkti lipidne peroksidacije in oksidativnega stresa, zato delecijo ustreznih genov oziroma odsotnost normalne encimske aktivnosti povezujejo s stopnjevanimi mutagenimi procesi, ki so vključeni v večjo dovzetnost z vnetjem povezanimi rakavimi obolenji gastrointestinalnega trakta, kot je npr. rak trebušne slinavke. Delecijo genov *GSTM1* in *GSTT1* povezujejo še s hepatocelularnim karcinomom, karcinomom pljuč, mehurja, dojk, kolorektalnim karcinomom ter skvamozno celičnim karcinomom glave in vratu (60).

2 NAMEN DELA

Osteoporozna je prepoznavna in dobro definirana bolezen, ki je po oceni SZO iz leta 2000 prizadela več kot 75 milijonov ljudi po Evropi, ZDA in na Japonskem. Po podatkih IOF (ang. *International Osteoporosis Foundation*), vsaj ena izmed treh žensk, starejših od 50 let in vsaj eden izmed petih moških, starejših od 50 let, doživi osteoporotični zlom kosti.

Raznolika etiologija bolezni vključuje tako genetsko dovzetnost, kot tudi okoljske dejavnike in njihov vpliv na razvoj bolezni. Slabše delovanje antioksidativnih mehanizmov ali presežek okoljskih dejavnikov, ki ga fiziološko funkcionalni antioksidativni mehanizmi ne zmorejo pretvoriti v neškodljive snovi, vodi v stanje oksidativnega stresa, kar se odrazi tudi na kostnem tkivu. Del tega antioksidativnega obrambnega sistema je tudi družina encimov glutation S-transferaze.

Namen diplomske naloge je ugotoviti ali homozigotni deleciji genov *GSTM1* in *GSTT1* (delecijska polimorfizma *GSTM1*0* in *GSTT1*0*) vplivata na mineralno kostno gostoto (MKG) in na razvoj osteoporoze. S statističnimi testi bomo poskušali poiskati povezavo med omenjenima genskima polimorfizmoma in MKG ter biokemičnimi kazalci kostne remodelacije v skupini 721 preiskovancev.

Študija bo potekala v dveh korakih. Najprej bomo s predhodno optimizirano večkratno sočasno verižno reakcijo s polimerazo pomnožili tarčne odseke DNA. Tako bomo pridobili podatke o vzorcih tistih preiskovancev, katerih DNA vsebuje polimorfizem *GSTM1*0* ali *GSTT1*0* ali pa oba. Dobljene podatke bomo statistično ovrednotili in jih primerjali s podatki o MKG preiskovancev ter podatki o koncentracijah biokemičnih kazalcev v serumu in urinu.

3 METODE IN MATERIALI

3.1 Preiskovanci

V študijo smo vključili 721 preiskovancev, od tega 553 žensk in 117 moških. Preiskovance smo razdelili v naslednje skupine:

- vsi preiskovanci (N = 721)
- vse preiskovanke (N = 553)
- pomenopavzalne preiskovanke (N = 476)
- premenopavzalne preiskovanke (N = 57)
- moški preiskovanci (N = 117)
- preiskovanci, oboleli za osteoporozo (N = 254)
- zdravi preiskovanci (N = 179)
- preiskovanci, starejši od 65 let (N = 235)
- preiskovanci, stari 65 let ali manj (N = 435)

3.2 Določitev vrednosti mineralne kostne gostote in biokemičnih kazalcev kostne remodelacije

Za ugotavljanje povezave med polimorfizmom in mineralno kostno gostoto, smo obravnavali naslednje parametre preiskovancev: starost, MKG, ITM, t-vrednosti, RANKL (aktivator receptorja NF- κ B), BALP (kostna alkalna fosfataza), pOC (osteokalcin), sCTX (karboksiterminalni prečno povezani telopeptid) in sOPG (osteoprotegerin). **Meritev koncentracije biokemičnih označevalcev** je bila izvedena v laboratorijih Klinike za nuklearno medicino, UKC Ljubljana. Vzorci so bili odvzeti preiskovancem zjutraj, zaradi cirkadianega ritma merjenih parametrov. Biokemične označevalce kostne remodelacije in tvorbe kosti smo določili iz seruma in urina. Koncentracija OC je bila določena v plazmi s kemiluminescentno imunometrično metodo (po navodilih proizvajalca - IMMULITE[®]-Osteocalcin, DMC, ZDA). Koncentracija BALP je bila določena z imunoradiometrično metodo (po navodilih proizvajalca – Tandem-R-ostase, Beckman Coulter). Koncentracija CTX je bila določena elektrokemiluminescentno (CLIA) metodo po navodilih proizvajalca (Elsys β -cross Labi; Roche, Nemčija).

Meritve mineralne kostne gostote (MKG) (ang. *bone mineral density*, BMD) so bile opravljene na UKC Ljubljana, UKC Maribor in SB Celje z uporabo metode DEXA. Meritev poteka na različnih delih okostja: dobimo vrednosti MKG za ledvena vretenca (BMDls, ang. *lumbar spine*), vrat stegenice (BMDfn, ang. *femoral neck*) in celotnega kolka (BMDtot, ang. *total hip*). Mineralno kostno gostoto lahko izrazimo kot gram na cm² ali kot t-vrednost, pri čemer je ta definirana kot število standardnih odklonov nad in pod povprečjem vrednosti MKG zdrave mlade odrasle osebe. Osteoporoza je definirana, kadar je t-vrednost -2,5 standardnih odklonov, medtem ko ima zdrav posameznik t-vrednost enako ali večjo od -1.

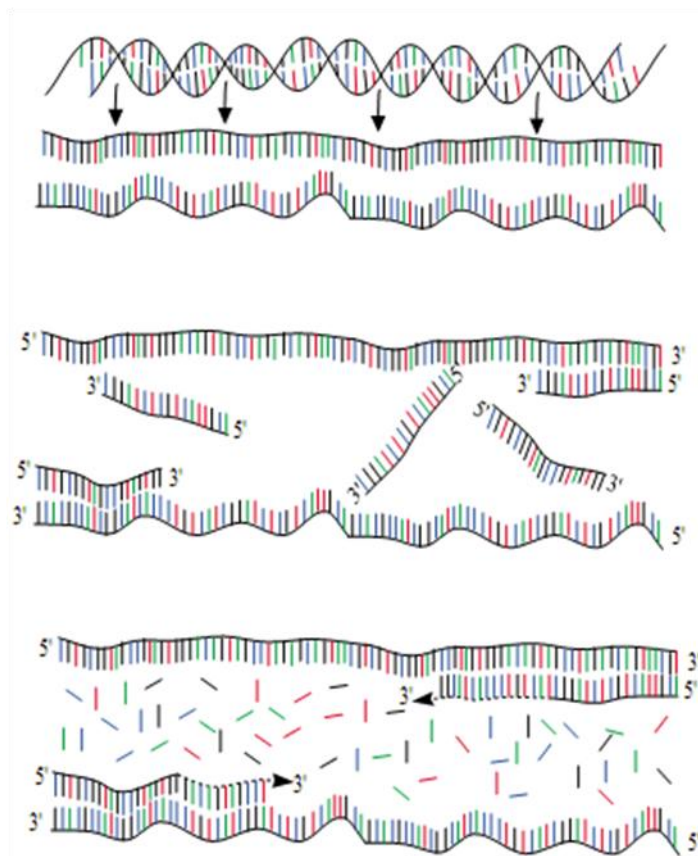
3.3 Opis vzorcev DNA

Preiskovancem so na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove UKC Ljubljana, v Splošni bolnišnici Celje in v Ambulanti za osteoporozo Zdravilišča Dolenjske Toplice odvzeli periferno vensko kri. Kri so shranili pri -20°C. Nato je bila v petih dneh iz levkocitov izolirana genomska DNA. Postopek je bil izveden s pomočjo metode izsoljevanja po Millerju.

3.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Metoda verižne reakcije s polimerazo ali metoda PCR je oblika *in vitro* pomnoževanja tarčnih odsekov DNA. Metoda PCR je hitra, natančna in preprosta metoda, ki temelji na prileganju in podaljševanju dveh začetnih oligonukleotidov, ki omejujeta področje DNA, ki ga želimo pomnožiti, t.j. tarčni odsek. Osnovni trije koraki PCR reakcije so začetna denaturacija dvoverižne DNA, ciklično pomnoževanje in končno podaljševanje verige DNA s termostabilno DNA polimerazo. Ciklično pomnoževanje se ponavlja nekje med 30- do 40-krat. Ponavljanje ciklov ima za posledico eksponentno povečanje količine zelenega odseka DNA. Posamezen cikel opisuje *Slika 11*.

V večkratni sočasni verižni reakciji z DNA polimerazo (ang. *multiplex polymerase chain reaction*) je možno istočasno pomnoževanje več kot enega tarčnega odseka DNA in vključuje uporabo več kot enega para oligonukleotidnih začetnikov.



Slika 11: Opis treh stopenj enega cikla pomnoževanja tarčnega DNA odseka:

1. stopnja: začetna ločitev verig (denaturacija) dvovertične DNA s segrevanjem na 95 °C (1 min).

2. stopnja: ohlajanje na 57 °C za 1 min in pripenjanje oligonukleotidnih začetnikov na ustrezne komplementarne regije (hibridizacija).

3. stopnja: podaljševanje verige DNA s Taq polimerazo v smeri 5' proti 3' (1 min pri 72 °C).

Po zadnjem zaključenem ciklu (v našem primeru po 35. ciklu), sledi faza končnega podaljševanja (8 min pri 72 °C) in inkubacija DNA pri 8 °C.

3.4.1 Pomnoževanje odsekov DNA

Gene *GSTM1*, *GSTT1* in *GPX1* smo pomnoževali v večkratni sočasni PCR reakciji. Uspešnost izvedene reakcije v vzorcu smo vrednotili s pomnoževanjem gena *GPX1*, ki se je moral pomnožiti v vsakem vzorcu (interna kontrola). Če se je po elektroforezi izkazalo, da se gen *GPX1* ni pomnožil, smo tako reakcijo obravnavali kot neuspešno. V tem primeru smo postopek pomnoževanja odsekov DNA ponovili. Izbira oligonukleotidnih začetnikov je upoštevala njihove molekularne lastnosti, podobnost pomnoževalnih zmogljivosti tarčnih odsekov, vsebnost gvaninov in citozinov ter podobnost temperatur tališča (T_m). Molekularne lastnosti oligonukleotidnih začetnikov je pomembno upoštevati, sicer lahko

pride do nastanka njihovih dimerov ali večmolekularnih asociatov in nespecifičnega prileganja na tarčni odsek DNA.

Preglednica II: Zaporedja oligonukleotidnih začetnikov.

označba oligonukleotidnega začetnika	zaporedje	dolžina pomnoženega zaporedja
<i>GSTM1 forward*</i>	GCTTCACGTGTTATGGAGGTT	154 bp
<i>GSTM1 reverse**</i>	CGGGAGATGAAGTCCTTCAGA	
<i>GSTT1 forward</i>	ATGTGACCCTGCAGTTGC	69 bp
<i>GSTT1 reverse</i>	AGATGTGAGGACCAGTAAGG	
<i>GPX1 forward</i>	AGCCCAACTTCATGCTCTTC	400 bp
<i>GPX1 reverse</i>	AGATGTGAGGACCAGTAAGG	

*ang. *forward primer* ali istosmerni oligonukleotidni začetnik; **ang. *reverse primer* ali obratnosmerni oligonukleotidni začetnik.

3.4.1.1 Priprava reakcijske zmesi za pomnoževanje

Na uspešnost izvedene PCR reakcije vplivajo tudi pogoji v laboratoriju in način priprave vzorcev. Kakršnakoli kontaminacija okolja, v katerem smo pripravljali vzorce, s tujo DNA, lahko povzroči nastanek nespecifičnih produktov PCR reakcije. V tem smislu so občutljive zlasti večkratne sočasne PCR reakcije, ker v njih sodeluje večje število oligonukleotidnih začetnikov in je pomnoževanje nespecifičnih zaporedij učinkovitejše. Zato smo vzorce za PCR pripravljali v ločenem prostoru, kjer so bili gibanje, vstop in stopnja čistote omejeni.

V ločen prostor za pripravo zmesi vzorcev, smo vstopali v namenskih, čistih delovnih haljah. Pred pričetkom dela smo si najprej nadeli rokavice iz lateksa (brez smukca). Sledilo je čiščenje notranjosti delovne komore z 10 % raztopino etanola in 6 % raztopino vodikovega peroksida. V notranjost komore smo dodajali delovni pribor (avtoklavirane nastavke za pipete v škatlicah in epruvice s pokrovčki) po predhodnem čiščenju s 3 % raztopino natrijevega hipoklorita. Po opravljenem čiščenju delovnega pribora in komore, smo notranjost komore izpostavili viru UV svetlobe za najmanj 25 minut. Medtem smo iz zamrzovalnika vzeli reagente (shranjeni pri -20 °C), da bi se pravočasno odtalili. Po zaključenem obsevanju delovnega pribora z UV svetlobo, smo v komoro dodali reagente in delovne raztopine vzorcev, ki smo jih predhodno očistili z natrijevim hipokloritom. DNA polimerazo smo dali v komoro tik pred uporabo. Nato smo jo takoj pospravili v zamrzovalnik, ker ob izpostavljenosti sobni temperaturi izgublja svojo aktivnost. Delovne

raztopine vzorcev smo hranili v hladilniku pri 4 °C. Te so bile pripravljene z redčenjem prečiščenih vzorcev DNA (shranjeni pri -20 °C) v razmerju 1:10.

3.4.1.2 Optimizacija reakcijske zmesi

Preden smo izvedli večkratno sočasno PCR reakcijo z uporabo treh parov oligonukleotidnih začetnikov, smo morali določiti optimalne pogoje, ki bi zagotovili pomnoževanje vseh tarčnih odsekov z ustrezno občutljivostjo in specifičnostjo. Občutljivost PCR reakcije je odvisna od števila tarčnih molekul, števila ciklov in lastnosti okolice DNA molekule, t.j. sosednjih zaporedij, ki jih ne pomnožujemo. Prisotnost več kot enega para oligonukleotidnih začetnikov pomeni večjo verjetnost pojava nespecifičnih produktov v reakciji. Nespecifičen produkt ni samo tuja DNA, temveč tudi dimeri oligonukleotidnih začetnikov (61). Čas pripenjanja oligonukleotidnih začetnikov, čas podaljševanja verige, koncentracije dNTP, MgCl₂ in tip izbrane DNA polimeraze vplivajo na natančnost PCR reakcije. V splošnem velja, da krajša optimalna časa pripenjanja in podaljševanja in manjši optimalni koncentraciji dNTP in MgCl₂, pomenijo manjšo verjetnost vključevanja napačnih nukleotidov v pomnoževano zaporedje (62).

Preglednica III: Količinska sestava zmesi reagentov za pripravo enega vzorca za večkratno sočasno PCR reakcijo (po optimizaciji).

reagent	volumen reagenta (v µl)
pufer 10x	2
raztopina MgCl ₂	2
dNTP (2mM)	4
istosmerni začetni oligonukleotidi za <i>GSTM1</i>	1,5
obratnosmerni začetni oligonukleotidi za <i>GSTM1</i>	1,5
istosmerni začetni oligonukleotidi za <i>GSTT1</i>	1,5
obratnosmerni začetni oligonukleotidi za <i>GSTT1</i>	1,5
istosmerni začetni oligonukleotidi za <i>GPXI</i>	1,5
obratnosmerni začetni oligonukleotidi za <i>GPXI</i>	1,5
AmpliTaq Gold™ polimeraza DNA	0,3
avtoklavirana ultračista voda	1,7
vzorec DNA	1

Pripravili smo od 3- do največ 50-kratno količino raztopine reagentov, jo premešali in nato odpipetirali 19 µl v vsako plastično epruvetko s pokrovčkom. Tej smo nato dodali 1 µl delovne raztopine DNA. Vsaki enajsti epruvetki s pokrovčkom smo, namesto delovne raztopine vzorca, dodali 1 µl avtoklavirane ultračiste vode (slepi vzorec z vlogo negativne kontrole PCR reakcije).

3.4.1.3 Potek PCR reakcije

Vsako zaprto plastično epruvetko smo, po dodatku delovne raztopine DNA, premešali in nato centrifugirali. V računalniku cikličnega termostata smo predhodno nastavili optimiziran temperaturni program, časovne intervale med posameznimi stopnjami in število ciklov. Sledila je postavitve zaprtih plastičnih epruvetk in vklop programa (TRIPLEX.CYC).

Po preverjanju uspešnosti multipleksne PCR reakcije, smo ugotovili neuspešno pomnoževanje nekaterih vzorcev (N = 42). Vzorce DNA, ki so se neuspešno pomnoževali v multipleksni PCR reakciji, smo še enkrat pomnožili v PCR reakciji, v katero smo vključili le en par oligonukleotidnih začetnikov (za *GSTMI* ali za *GSTTI*). V tem primeru smo namesto gena *GPX1*, kot kontrolo uporabili delovno raztopino vzorca DNA, za katerega je že bila ugotovljena odsotnost polimorfizma *GSTMI**0 oziroma *GSTTI**0.

Preglednica IV: Optimiziran program za večkratno sočasno PCR reakcijo.

stopnja reakcije	temperatura	časovni interval	
začetna denaturacija	95 °C	10 min	
ločitev verig DNA	95 °C	1 min	
pripenjanje oligonukleotidnih začetnikov	57 °C	1 min	35-krat
podaljševanje verige z DNA polimerazo	72 °C	1 min	
končno podaljševanje verige z DNA polimerazo	72 °C	8 min	
inkubacija	8 °C	∞	

Preglednica V: Količinska sestava zmesi reagentov za pripravo enega vzorca za PCR reakcijo (po optimizaciji).

reagent	volumen reagenta (v µl)
pufer 10x	2
raztopina MgCl ₂	2
dNTP (2 mM)	2
istosmerni začetni oligonukleotid	2
obratnosmerni začetni oligonukleotid	2
AmpliAq Gold™ DNA polimeraza	0,1
avtoklavirana ultračista voda	8,9
vzorec DNA	1

Temperaturni program za PCR reakcijo, v katero je bil vključen en par oligonukleotidnih začetnikov, smo optimizirali tako, da smo povečali število ciklov s 35-krat na 40-krat.

3.4.1.4 Preverjanje uspešnosti PCR reakcije

Po vsakem zaključenem temperaturnem programu je sledilo preverjanje uspešnosti PCR reakcije z agarozno gelsko elektroforezo. To je standardna metoda, ki se uporablja za ločevanje, prepoznavo, pa tudi čiščenje DNA oziroma DNA odsekov. Potovanje molekul DNA v gelu je mogoče pod vplivom električnega polja. Negativno nabita DNA potuje proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Hitrost potovanja oziroma prepotovana razdalja DNA je odvisna od velikosti molekule DNA, oblike DNA (krožna, linearna, sproščena oblika), jakosti električnega polja, sestave elektroforeznega pufra, koncentracije agaroze in dodanih interkelirajočih barvil. Krajše in s tem manjše molekule se, zaradi manjšega upora, hitreje prebijajo skozi gel, v primerjavi z večjimi molekulami.

Preglednica VI: Sestava 2 % agaroznega gela.

sestavina	količina
agarozna	1,5 g
TAE puffer	75 ml
etidijev bromid / SYBR safe™	6 µl / 5 µl

Prepoznavo produktov PCR reakcije smo izvajali na 2 % agaroznem gelu. Po natehtanju ustrezne količine agaroze v erlenmajerico, smo dodali puffer TAE. Z urnim steklom pokrito erlenmajerico smo segrevali v mikrovalovni pečici (3-krat po 25 sekund). Nato pa vsebino erlenmajerice premešali, postavili na tehtnico in nadomestili količino izparele destilirane vode. Po ponovnem premešanju smo pustili vročo raztopino ohlajati, medtem pa v digestoriju pripravili nosilec za gel z ustreznimi glavnički. V toplo raztopino agaroze smo odpipetirali 6 µL etidijevega bromida ali 5 µL barvila SYBR safe™. Vsebino erlenmajerice smo prelili v pripravljen nosilec in ga zaščitili pred dnevno svetlobo. Gel se je strdil v 30-ih minutah. Nato smo ga prenesli v elektroforezno kadičko in prelili s pufrom TAE. Produkta PCR reakcije smo, pred nanosom v »žepok« gela, nanесли na parafilm in premešali z 2,5 µl nanašalnega pufra (glicerol in ksilencianol). Glicerol poveča gostoto vzorca in omogoča lažje usedanje produktov PCR reakcije v žepku. Ksilencianol obarva vzorce in s tem omogoča spremljanje hitrosti potovanja DNA odsekov. V prvi žepok smo skupaj z nanašalnim pufrom nanесли 2 µl komercialno pripravljenega označevalca velikosti odsekov. V ostale žepke smo nanесли produkte PCR reakcije. Seriji desetih vzorcev je sledil slepi vzorec, obravnavan pod istimi pogoji. Elektroforeza je potekala 25 minut pri 90 V. Po končani elektroforezi smo gel previdno odstranili iz banjice in ga prenesli v

komoro z digitalnim fotoaparatom in virom UV svetlobe. S pomočjo računalniškega programa smo posnetek programske dokumentirali in na sliki označili položaje lis.

Vloga interkelirajočih barvil je prikaz potujočega odseka DNA pod UV svetlobo. Molekula etidijevega bromida ima planarno strukturo, s katero se vrine (interkelira) v hidrofobno okolje med baznimi pari v dvovijačni DNA molekuli. To lastnost izkoristimo za detekcijo, saj interkelirane molekule DNA fluorescirajo veliko močneje, kot proste molekule barvila. Kemijska struktura barvila SYBR safeTM je patentirana, vendar se barvilu pripisuje podoben mehanizem vrinjanja kot ga ima etidijev bromid. SYBR safeTM je fluorescirajoče barvilo, ki ima nižji mutageni potencial v primerjavi z etidijevim bromidom in je ocenjeno kot nenevarno. Poleg tega je razvit tako, da se ga lahko uporablja za prikazovanje DNA odsekov ob uporabi transiluminatorja modre svetlobe, ki ne poškoduje DNA (63).

3.4.2 Reagenti in oprema

3.4.2.1 Verižna reakcija s polimerazo

Reagenti:

- DNA polimeraza AmpliTaq GoldTM, 5U/μl (Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- delovne raztopine DNA redčene iz izolata v razmerju 1:20
- začetni oligonukleotidi, redčenje 1:20 (proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
- 10x PCR pufer Gold Buffer MgCl₂, 25 mM, 1,5 ml (Applied Biosystem, Roche, ZDA); sestava: 150 mM Tris-HCl, 500 mM, pH (pufer) = 8, pri T = 25 °C
- raztopina dNTP, 2 mM; sestava: 10 μL vsake od raztopin dATP, dGTP, dCTP indTTP koncentracije 100 mM z dodatkom 460 μL avtoklavirane ultračiste vode (Perkin Elmer)
- 25 mM raztopina MgCl₂ (Applied Biosystem, Roche, ZDA)
- avtoklavirana ultračista voda (iz aparata ELGA, Purelab Classic)

Aparature in pribor:

- brezprašne rokavice Safeeskin PFE, velikost S (Kimberly-Clark)
- sterilni nastavki za pipete brez filtra e.p.T.I.P.S., 10 μl in 200 μl (Sarstadt, Nemčija)

- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete (Sarstadt, Nemčija)
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 0,5 in 1,5 mL (Sarstadt, Nemčija)
- avtoklav (Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija)
- delovna komora za PCR (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner (UVC/T-M-AR, Latvija)
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 µl; 2-20 µl; 20-200 µl (Eppendorf, Nemčija)
- mikrocentrifuga (FVL-2400N Combi-Spin (Biosan Latvija))
- mikrocentrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- ciklični termostat (MWG AG Biotech Primus 96^{Plus}, Nemčija)

3.4.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Reagenti:

- agarozna (Agarose for routine use, Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- TAE pufer (Tris-acetat in EDTA), redčen 1:50
- ultra čista voda (aparatus Elga, Purelab Classic)
- etidijev bromid, 10mg/mL (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemčija)
- SYBR safeTM (proizvajalec Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)
- označevalec velikosti DNA; odseki velikosti 50, 150, 300, 500, 700, 1000bp (PCR Markers G316A, Promega Corp. ZDA)
- nanašalni pufer (glicerol in ksilencianol)

Aparature in pribor:

- oranžne rokavice (Orange NitrileTM 260, SHIELDSkinTM)
- erlenmajerica z ozkim vratom (250 mL)
- merilni valj (100mL)
- plastična žlica
- urno steklo
- parafilm
- prijemalka iz gume za vročo steklovino
- elektronska tehtnica Exactan 300 EB (Tehtnica (Železniki, Slovenija))

- mikrovalovna pečica
- centrifuga Centric 150 (Tehtnica (Železniki, Slovenija))
- polavtomatske pipete (2-20 μ L)
- avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija)
- kadička za elektroforezo (BIO-RAD[®] Wide)
- komora z UV svetilko ($\lambda=302$ nm) in z digitalnim fotoaparatom za slikanje gelov (UVI Tec)
- računalnik s programom UVI Photo (verzija 99.01 s za operacijski sistem Windows)
- vir napetosti (BIO-RAD[®] Power Pac Basic, 300 V/400 mA/75 W)
- komora z UV svetilko G-BOX (Syngene, Velika Britanija)
- računalnik s programsko opremo: GeneSnap in GeneTools (Syngene, Velika Britanija)

3.5 Statistične metode

Za nadaljnjo statistično obdelavo smo se poslužili programa SPSS 17.0 for Windows, proizvajalca SPSS inc., ZDA.

V programu smo delali s sledečimi testi:

- **Kolmogorov-Smirnov test**, s katerim smo preverili normalnost porazdelitve posameznih spremenljivk (vrednost $p > 0,05$ je pomenila normalno porazdelitev spremenljivke, medtem ko je vrednost $p < 0,05$ pomenila, da se spremenljivka ne porazdeljuje normalno);
- **One-way Anova (analiza varianc)**, s katerim smo preverili povezanost polimorfizmov - *GSTMI*0* in *GSTTI*0* in kombinacijo polimorfizmov - z izbranimi spremenljivkami, ki se porazdeljujejo normalno (vrednost $p < 0,05$ je pomenila statistično pomembno razliko, medtem ko vrednost $p > 0,05$ ni bila ovrednotena kot statistično značilna)
- **Bonferroni (Post Hoc)**, s katerim smo preverjali povezanost kombinacije obeh polimorfizmov, *GSTMI*0* in *GSTTI*0*, z izbranimi spremenljivkami, ki se porazdeljujejo normalno (vrednost $p < 0,05$ je pomenila statistično pomembno razliko, medtem ko vrednost $p > 0,05$ ni bila ovrednotena kot statistično značilna);
- **Scheffe (Post Hoc)**, s katerim smo preverjali povezanost kombinacije obeh polimorfizmov, *GSTMI*0* in *GSTTI*0*, z izbranimi spremenljivkami, ki se porazdeljujejo normalno (vrednost $p < 0,05$ je pomenila statistično pomembno razliko, medtem ko vrednost $p > 0,05$ ni bila ovrednotena kot statistično značilna);
- **LSD (Post Hoc)**, s katerim smo preverjali povezanost kombinacije obeh polimorfizmov, *GSTMI*0* in *GSTTI*0*, z izbranimi spremenljivkami, ki se porazdeljujejo normalno (vrednost $p < 0,05$ je pomenila statistično pomembno razliko, medtem ko vrednost $p > 0,05$ ni bila ovrednotena kot statistično značilna);
- **ANCOVA (analiza kovarianc)**, s katerim smo preverjali povezanost polimorfizmov, *GSTMI*0* in *GSTTI*0*, z izbranimi spremenljivkami (ki se porazdeljujejo normalno) z vključitvijo kovariate (vrednost $p < 0,05$ je

pomenila statistično pomembno razliko, medtem ko vrednost $p > 0,05$ ni bila ovrednotena kot statistično značilna);

- **Kruskal-Wallis**, s katerim smo preverjali povezanost polimorfizmov *GSTM1*0*, *GSTT1*0* in kombinacijo obeh z izbranimi spremenljivkami, ki se ne porazdeljujejo normalno (vrednost $p < 0,05$ je pomenila statistično pomembno razliko, medtem ko vrednost $p > 0,05$ ni bila ovrednotena kot statistično značilna).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Optimizacija postopka genotipizacije

PCR reakcija je občutljiva metoda, zlasti če je v reakcijski zmesi več kot en par oligonukleotidnih začetnikov. Tedaj je učinkovitost pomnoževanja nespecifičnih DNA zaporedij večja. Izbira ustreznih in združljivih oligonukleotidnih začetnikov je morala upoštevati njihovo homologijo, inter- in intramolekularne interakcije, podobnosti pomnoževalnih zmogljivosti tarčnih odsekov DNA, vsebnost gvanozina in citozina v tem odseku ter podobnosti temperatur tališča (T_m). Na potek PCR reakcije vplivajo še sestava reakcijske zmesi, število ciklov, temperatura in čas posameznih stopenj v fazi cikličnega pomnoževanja. V splošnem velja, da krajši optimalni čas pripenjanja in čas podaljševanja in manjši optimalni koncentraciji dNTP in $MgCl_2$, pomembno prispevajo k specifičnosti PCR reakcije.

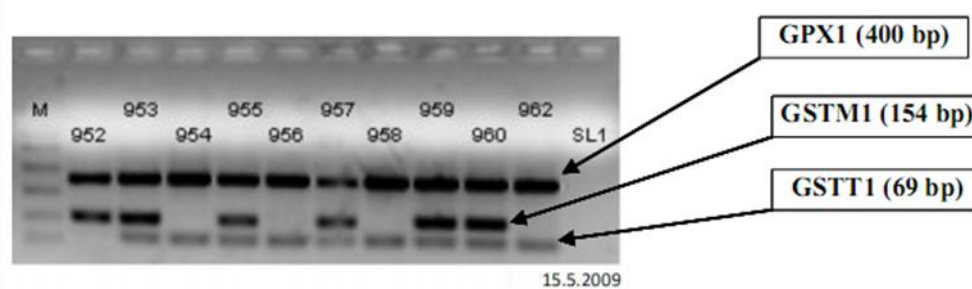
Za pomnoževanje tarčnih odsekov DNA smo uporabili naslednje oligonukleotidne začetnike:

- za gen *GSTM1*: istosmerni oligonukleotidni začetnik
5'-GCTTCACGTGTTATGGAGGTT-3', dolg 21 bp in 48 % deležem GC;
obratnosmerni oligonukleotidni začetnik
5'-CGGGAGATGAAGTCCTTCAGA-3', dolg 21 bp in 52 % deležem GC.
- za gen *GSTT1*: istosmerni oligonukleotidni začetnik
5'-ATGTGACCCTGCAGTTGC-3', dolg 18 bp in 55 % deležem GC;
obratnosmerni oligonukleotidni začetnik
5'-AGATGTGAGGACCAGTAAGG-3', dolg 20 bp in 50 % deležem GC.
- za gen *GPX1*: istosmerni oligonukleotidni začetnik
5'-AGCCCAACTTCATGCTCTTC-3', dolg 20 bp in 50 % deležem GC;
obratnosmerni oligonukleotidni začetnik
5'-AGATGTGAGGACCAGTAAGG-3', dolg 20 bp in 50 % deležem GC.

Kot začetno temperaturo tališča smo določili kot $(T_{m_{GSTM1}} + T_{m_{GSTT1}} + T_{m_{GPX1}})/3 - 4\text{ }^{\circ}\text{C} = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nadalje smo optimizirali koncentracijo Mg^{2+} ionov, ki so kofaktorji DNA polimeraze. Optimizacijo ustrezne koncentracije Mg^{2+} smo izvedli z uporabo PCR reakcije

s tremi različnimi koncentracijami Mg^{2+} (1 mM, 2 mM in 3 mM). Za ustrezno koncentracijo smo določili 2 mM, pri kateri ni prišlo do nespecifičnega pomnoževanja DNA.

Za optimizacijo koncentracije ostalih reagentov in števila ciklov smo upoštevali priporočila iz literature ter priporočila proizvajalcev reagentov. Tako smo že na začetku za večkratno sočasno PCR reakcijo določili 35 ciklov in števila nismo spreminjali. Najprej smo posamično pomnoževali tarčne odseke genov *GSTM1*, *GSTT1* in *GPX1* (količinska sestava posamezne zmesi navedena v **Preglednici 5**). Pri izvedbi večkratne sočasne PCR reakcije smo ustrezno prilagodili koncentracije reagentov: povečali koncentraciji dNTP in DNA polimeraze in zmanjšali posamezne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov. Po optimizaciji reagentov in temperaturnega programa je sledila izvedba večkratne sočasne PCR reakcije na 721 vzorcih.



Slika 12: Elektroforeza produktov večkratne sočasne PCR reakcije na 2 % agaroznem gelu z vgrajenim etidijevim bromidom. 105 do 117, 952 do 962 – oznake vzorcev; M – označevalec velikosti DNA (marker), SL, SL1 – slepi vzorec (negativna kontrola).

Čistost in dolžino produktov večkratne sočasne PCR reakcije smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo pri napetosti 90 V 25 minut. Prepoznavo pomnoženih odsekov DNA smo izvajali na 2 % agaroznem gelu, na katerega smo nanašali 5 μ l vzorca premešanega z 2,5 μ l nanašalnega pufra. Cilj pomnoževanja je bil prepoznavanje tarčnih odsekov DNA, ne glede na intenziteto lise. Pojav lise velikosti 69 bp je pomenil prisotnost gena *GSTT1*, brez polimorfizma *GSTT1*0*, v vzorcu preiskovanca. Lisa na agaroznem gelu velikosti 154 bp je pomenila prisotnost gena *GSTM1*, brez polimorfizma *GSTM1*0*, v vzorcu preiskovanca. V električnem polju je najpočasneje potovala lisa velikosti 400 bp gena *GPX1*, katere prisotnost je potrdila uspešnost reakcije pomnoževanja vzorčne DNA.

Med vsemi 721 vzorci preiskovancev, PCR reakcija ni bila uspešna pri devetih vzorcih: 755, 999, 1048, 1088, 171f, o35, o83, o109, 1097z. Vzroki so lahko prevelika količina

proteinov v vzorčni DNA, ki delujejo zaviralno na DNA polimerazo, razpad ali premajhna koncentracija vzorčne DNA.

4.2 Ugotavljanje pogostnosti polimorfizmov

Genski polimorfizem je monogenska lastnost, ki obstaja v populaciji v vsaj dveh genotipih oziroma genetskih različicah, ki se pojavljata v vsaj 1 % populacije (57). Najpogostejši genski polimorfizem genov *GSTM1* in *GSTT1* je homozigotna delecija: genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0*. Posledično nastane protein s povečano občutljivostjo na citogenetske poškodbe in nima encimske aktivnosti.

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti povezavo med delecijiskima polimorfizmoma *GSTM1*0* in *GSTT1*0* ter mineralno kostno gostoto, ki je osnovni pokazatelj osteoporoze. Vsem preiskovancem je bila predhodno, z metodo DEXA, izmerjena MKG ledvenih vretenc (BMDls), vratu stegenice (BMDfn) in celotnega kolka (BMDtot). Preiskovancem so bile določene še koncentracije biokemičnih kazalcev (sCTX, pOC, sBALP), RANKL in OPG. Na podlagi podatkov o starosti, spolu ter potrjeni diagnozi, smo za statistično obdelavo podatkov, preiskovance razdelili v 9 skupin. Prva skupina je obsegala vse preiskovance (721) in je bila po navedenih lastnostih najbolj heterogena. V drugo skupino smo razvrstili vse ženske preiskovanke (553). Skupino preiskovank smo razdelili še v tretjo skupino, pomenopavzalnih žensk (476) ter četrto skupino, premenopavzalnih žensk (57). S takšno razdelitvijo preiskovank smo želeli ugotoviti kakšna je med skupinama razlika v vrednostih MKG in biokemičnih kazalcev kostne remodelacije v povezavi *GSTM1*0* in *GSTT1*0* zaradi odsotnosti estrogena. V peto skupino smo razvrstili vse moške preiskovance (117), ker smo želeli preučiti ali obstaja razlika med spoloma v povezavi z *GSTM1*0* in *GSTT1*0*. V šesto skupino smo zajeli preiskovance, obbolele za osteoporozo (254) in v sedmo zdrave preiskovance (179), ker smo želeli ugotoviti ali obstaja razlika v vplivu *GSTM1*0* in *GSTT1*0* med obema skupinama. Nato smo vse preiskovance razdelili še v osmo in deveto skupino. Kot prikazuje **Slika 2** je najhitrejši padec vrednosti MKG med 50. in 60. letom starosti, po 65. letu starosti pa vrednosti MKG upadajo počasneje. Z namenom preučiti, ali obstaja razlika v povezavi z *GSTM1*0* in *GSTT1*0*, smo v osmo skupino vključili preiskovance, starejše od 65 let (235), v deveto pa preiskovance, stare 65 let ali manj (435).

Podatke o genih *GSTM1* in *GSTT1* preiskovancev smo obravnavali posamično, kot tudi kombinacije obeh. To pomeni, da smo najprej vsakemu preiskovancu določili morebitno prisotnost polimorfizma *GSTM1*0* in/ali *GSTT1*0*. Na podlagi dobljenih podatkov smo določili še eno spremenljivko, in sicer kombinacijo sočasne pojavnosti polimorfizmov *GSTM1*0* in/ali *GSTT1*0*. Spremenljivki »kombinacija« smo na podlagi podatkov o prisotnosti polimorfizmov določili štiri različne vrednosti: 0, 1, 2 in 3. Vrednost 0 je pomenila odsotnost (**Slika 12**, vzorec 955), medtem ko je vrednost 3 pomenila prisotnost obeh polimorfizmov. Vrednost 1 smo pripisali vzorcem s prisotnim polimorfizmom *GSTM1*0* in odsotnim polimorfizmom *GSTT1*0* (**Slika 12**, vzorec 958). Vrednost 2 smo pripisali vzorcem z odsotnim polimorfizmom *GSTM1*0* in prisotnim polimorfizmom *GSTT1*0* (**Slika 12**, vzorec 952).

Pri statistični obdelavi podatkov smo si pomagali z računalniškim programom SPSS 17.0. Postavili smo ničelno hipotezo, ki predpostavlja, da sta deleciji genov *GSTM1* in *GSTT1* povezani z MKG. Najprej smo s statističnim testom Kolmogorov-Smirnov ugotavljali normalnost porazdelitve spremenljivk. Test predpostavlja, da se spremenljivka porazdeljuje normalno ($p > 0,05$). V kolikor je $p < 0,05$ privzamemo, da se spremenljivka ne porazdeljuje normalno. V tem primeru smo vrednosti spremenljivke logaritmirali ter ponovno preverili s testom Kolmogorov-Smirnov. Če je tudi potem bila $p < 0,05$ smo privzeli, da se spremenljivka ne porazdeljuje normalno. Takšno spremenljivko smo obravnavali s testom Kruskal-Wallis. V primeru spremenljivke z normalno porazdelitvijo, smo za nadaljnjo statistično obravnavo uporabili parametrične teste ANOVA, ANCOVA in Post Hoc teste (Bonferroni, LSD in Scheffe). Namen ANOVA je testirati ali aritmetične sredine dveh ali večih skupin prihajajo iz iste vzorčne distribucije. Izpeljanka testa ANOVA je test ANCOVA v katerega je vključena neodvisna metrična spremenljivka – kovariata. Učinkovita kovariata je tista, ki visoko korelira z odvisno spremenljivko in ne korelira z neodvisnimi spremenljivkami. Kot kovariati smo izbrali starost in indeks telesne mase (ITM). V nadaljevanju testa ANOVA smo podatke spremenljivke za kombinacijo polimorfizmov obravnavali s Post Hoc testi. S temi testi lahko ugotovimo, katera skupina preiskovancev odstopa od povprečja določene vrednosti.

4.2.1 Pogostnost delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* pri Slovencih

Podatki o pogostnosti delecijjskih polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* pri Slovencih so primerljivi s podatki meta-študije o pogostnosti polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* pri Kavkazijcih, Azijcih in Afričanih (58).

Rezultati testa χ^2 (hi-kvadrat) so pokazali, da je pogostnost polimorfizma *GSTM1*0* pri 712 preiskovancih (51,1 %) primerljiva s podatki zbranih študij izvedenih na Kavkazijcih ($p = 0,291$). Prav tako je taisti test pokazal, da je pogostnost polimorfizma *GSTT1*0* pri Slovencih (19,0 %) primerljiva s podatki študij izvedenih na Kavkazijcih ($p = 0,620$).

Preglednica VII: Pogostnosti polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTM1*0* pri Slovencih, porazdeljene po preučevanih skupinah. Vrednosti p so izračunane s testom χ^2 , kjer vrednosti $p < 0,05$ pomenijo statistično pomembno razliko napram pogostnosti polimorfizma *GSTM1*0* ali *GSTT1*0* v skupini vseh preiskovancev.

Skupine preiskovancev	<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
vsi preiskovanci (N = 712)	51,1 %	19,0 %
vse preiskovanke (N = 545)	53,0 % ($p = 0,368$)	18,3 % ($p = 0,698$)
pomenopavzalne preiskovanke (N = 470)	52,1 % ($p = 0,656$)	17,0 % ($p = 0,274$)
premenopavzalne preiskovanke (N = 56)	55,4 % ($p = 0,524$)	25,0 % ($p = 0,252$)
vsi moški preiskovanci (N = 116)	44,8 % ($p = 0,177$)	19,8 % ($p = 0,820$)
preiskovanci, oboleli za osteoporozo (N = 251)	53,4 % ($p = 0,469$)	14,3 % ($p = 0,060$)
zdravi preiskovanci (N = 177)	49,7 % ($p = 0,713$)	23,7 % ($p = 0,109$)
preiskovanci, starejši od 65 let (N = 233)	50,6 % ($p = 0,889$)	20,2 % ($p = 0,648$)
preiskovanci, stari 65 let ali manj (N = 401)	52,4 % ($p = 0,611$)	16,7 % ($p = 0,242$)

Meta-analiza podatkov, ki je vključevala 69 študij, v katerih so proučevali pogostnost polimorfizma *GSTM1*0* in 35 študij, v katerih so proučevali pogostnost polimorfizma *GSTT1*0*, obsega podatke študij izvedenih na 12.525 Kavkazijcih, 2.136 Azijcih in 996 Afro-američanih (58).

Preglednica VIII: Pogostnosti polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTM1*0* iz podatkov meta-študije (58).

Polimorfizem	<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>	<i>GSTM1*0</i> in <i>GSTT1*0</i>
Kavkazijci	53,1 %	19,7 %	10,4 %
Azijci	52,9 %	47,0 %	24,6 %
Afričani	26,7 %	ni podatka	ni podatka

Primerjava podatkov skupin o pogostnosti delecijских polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* pri vseh preiskovancev s preostalimi proučevanimi skupinami ni pokazala statistično značilnih razlik (oziroma vrednost $p > 0,05$). Podatki o pogostnosti polimorfizma *GSTM1*0* pri vseh preiskovancih v primerjavi s podatki skupine vseh preiskovank so pokazali, da je pogostnost polimorfizma v slednji višja (53,0%; $p = 0,368$). Taisti polimorfizem pa je pri moških zastopan v 44,8 % ($p = 0,177$). Razlika lahko izhaja iz dejstva, da skupina preiskovank obsega večje število vzorcev (545), kot pa skupina moških preiskovancev (116). V skupini preiskovank je pogostnost višja pri premenopavzalnih preiskovankah (55,4 %; $p = 0,524$), kot pa pri pomenopavzalnih (52,1 %; $p = 0,656$). Podobno velja za podatke o pogostnosti polimorfizma *GSTT1*0*, ki je v skupini premenopavzalnih preiskovank 25,0 % ($p = 0,252$), v skupini pomenopavzalnih preiskovank pa 17,0 % ($p = 0,274$). Tudi tukaj je razlika najbrž posledica neprimerljivih velikosti populacij vzorcev skupine pomenopavzalnih preiskovank (470) napram skupini premenopavzalnih preiskovank (56). Pogostnost polimorfizma *GSTM1*0* je, v skupini preiskovancev, obolelih za osteoporozo (53,4 %), primerljiva s podatki skupine vseh preiskovancev ($p = 0,469$), medtem ko je pogostnost polimorfizma *GSTT1*0* v isti skupini, v primerjavi s podatki skupine vseh preiskovancev (19,0 %), nižja (14,3 %; $p = 0,060$). Primerjava podatkov o pogostnosti polimorfizmov v skupini zdravih preiskovancev s podatki skupine obolelih za osteoporozo, je pokazala, da se ti ne razlikujeta v pogostnosti *GSTM1*0* ($p = 0,243$), se pa razlikujeta v pogostnosti polimorfizma *GSTT1*0* ($p = 0,0005$), ki je manjša v skupini preiskovancev, obolelih za osteoporozo.

Podatki o pogostnosti polimorfizmov v posameznih kombinacijah genov *GSTM1* in *GSTT1* (tip 0, 1, 2 in 3) so v splošnem primerljivi s skupino vseh preiskovancev. Še najbolj izstopa skupina preiskovancev, obolelih za osteoporozo ($p = 0,119$), kjer je najvišja pogostnost prisotnosti zgolj *GSTM1*0* in znaša 47,4 %. Največja pogostnost kombinacije genov tipa 0 (preiskovanci, ki nimajo prisotna polimorfizma) je v skupini moških preiskovancev (44,0 %). Kombinacijo genov tipa 2 (odsotnost *GSTM1*0* in prisotnost *GSTT1*0*) je najbolj pogosta v skupini preiskovancev, starejših od 65 let (11,6 %), medtem ko je v skupini preiskovancev, starih 65 let ali manj, najmanj pogosta (7,2 %). Skupina zdravih preiskovancev (13,6 %) in skupina premenopavzalnih preiskovank (16,1 %) imata najvišjo pogostnost prisotnosti obeh polimorfizmov (kombinacija genov tipa 3). Razlog je najbrž

posledica manjšega števila vzorcev preiskovancev znotraj skupin, kar vpliva na slabšo predstavljenost posameznih populacij.

Preglednica IX: Pogostnosti kombinacij polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* v preučevanih skupinah.

Skupine preiskovancev	kombinacija <i>GSTM1*0</i> in/ali <i>GSTT1*0</i>			
	0	1	2	3
vsi preiskovanci	39,5 %	41,6 %	9,4 %	9,6 %
vse preiskovanke	37,5 %	42,8 %	8,7 %	9,4 %
pomenopavzalne preiskovanke	39,1 %	43,8 %	8,7 %	8,3 %
premenopavzalne preiskovanke	35,7 %	39,3 %	8,9 %	16,1 %
vsi moški preiskovanci	44,0 %	36,2 %	11,2 %	8,6 %
preiskovanci, oboleli za osteoporozo	38,2 %	47,4 %	8,4 %	6,0 %
zdravi preiskovanci	40,1 %	36,2 %	10,2 %	13,6 %
preiskovanci, starejši od 65 let	37,8 %	42,1 %	11,6 %	8,6 %
preiskovanci, stari 65 let ali manj	40,4 %	42,4 %	7,2 %	9,5 %

4.2.2 Ocena povezanosti polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* z mineralno kostno gostoto in biokemičnimi kazalci kostne remodelacije

4.2.2.1 Vsi preiskovanci

V statistično obdelavo smo vključili 712 preiskovancev. Skupina je mešana po spolu in starosti ter različno zastopana glede na vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne remodelacije (**Preglednica XV**). Preiskovancem je bila izmerjena MKG vratu stegenice (BMDfn), celotnega kolka (BMDtot), ledvenih vretenc (BMDls) in določene koncentracije pOC, sCTX, sBALP, RANKL in OPG. Na podlagi primerjave povprečnih vrednosti spremenljivk glede na podskupine genotipov smo lahko ocenili ali posamezna vrednost spremenljivke določenega genotipa odstopa od ostalih vrednosti toliko, da ji lahko pripišemo značilen vpliv na MKG ali biokemične kazalce kostne remodelacije.

Rezultati statistične obdelave s testom ANCOVA so pokazali statistično značilno povezavo *GSTT1*0* z MKG vratu stegenice ($p = 0,020$) in z MKG celotnega kolka ($p = 0,025$). Iz **Preglednice X** je razvidno, da so vrednosti MKG vratu stegenice in celotnega kolka pri preiskovancih z *GSTT1*0* v povprečju višje kot pri preiskovancih brez delecije taistega gena. Iz **Grafa 3** je še razvidno, da so vrednosti MKG vratu stegenice pri preiskovancih z obema polimorfizmoma v povprečju višje kot pri preiskovancih brez obeh polimorfizmov. Slednjo statistično pomembno povezavo je potrdil LSD Post Hoc test ($p = 0,023$). Prav tako je potrdil, da so vrednosti MKG vratu stegenice v povprečju višje tudi v primerjavi s preiskovanci z zgolj *GSTM1*0* ($p = 0,006$). Test ANCOVA je pokazal še statistično

značilno povezavo med $GSTM1*0$ in t-vrednostjo MKG ledvenih vretenc ($p = 0,021$; $N = 256$). Ta vrednost je v povprečju najmanjša pri preiskovancih z zgolj $GSTM1*0$ ($p = 0,044$, $N = 202$).

Preglednica X: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk testa ANCOVA (povprečne vrednosti – srednja vrednost \pm SD) za genotipa $GSTM1*0/GSTM1*0$ in $GSTT1*0/GSTT1*0$ pri vseh preiskovancih. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 - prisotnost polimorfizma)

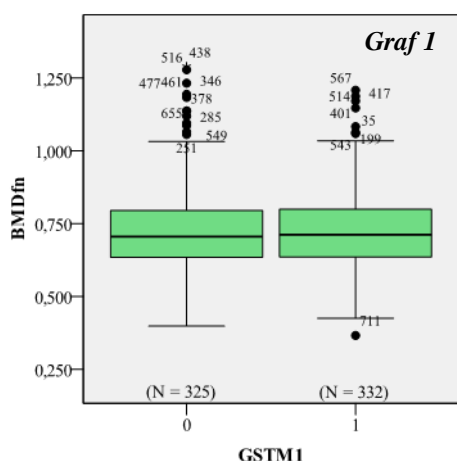
Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X \pm SD				p	
	$GSTM1*0/GSTM1*0$		$GSTT1*0/GSTT1*0$		$GSTM1*0$	$GSTT1*0$
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,328 \pm 0,181 (N = 270)	-0,333 \pm 0,181 (N = 287)	-0,339 \pm 0,181 (N = 453)	-0,293 \pm 0,178 (N = 104)	0,260	0,020
lnBMDtot	-0,142 \pm 0,175 (N = 268)	-0,141 \pm 0,183 (N = 285)	-0,148 \pm 0,178 (N = 451)	-0,110 \pm 0,182 (N = 102)	0,634	0,025

Med drugim je LSD Post Hoc test potrdil razliko povprečnih vrednosti BALP ($p = 0,027$) pri preiskovancih z zgolj $GSTM1*0$ ($N = 89$) napram preiskovancem z zgolj $GSTT1*0$ ($N = 19$). Te so pri preiskovancih z zgolj $GSTM1*0$ v povprečju nižje, medtem ko so pri preiskovancih z zgolj $GSTT1*0$ višje. Višje ravni BALP so pokazatelj večje aktivnosti osteoblastov, kar je povezano z večjo tvorbo kosti. Skladno s tem so vrednosti MKG vratu stegenice večje pri preiskovancih z zgolj $GSTT1*0$ in manjše pri preiskovancih z zgolj $GSTM1*0$, vendar omenjena povezava ni opredeljena kot statistično pomembna (**Preglednica XI**).

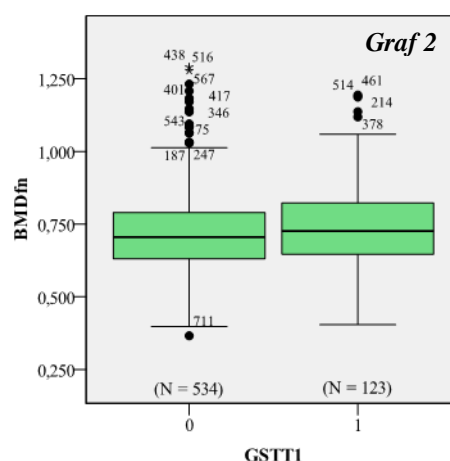
Preglednica XI: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk testa ANCOVA (povprečne vrednosti – srednja vrednost \pm SD) za kombinacijo genotipov $GSTM1*0/GSTM1*0$ in $GSTT1*0/GSTT1*0$ pri vseh preiskovancih. (0 - odsotnost obeh polimorfizmov, 1 - prisotnost $GSTM1*0$ in odsotnost $GSTT1*0$, 2 - odsotnost $GSTM1*0$ in prisotnost $GSTT1*0$, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X \pm SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,332 \pm 0,179 (N = 218)	-0,346 \pm 0,183 (N = 235)	-0,313 \pm 0,191 (N = 52)	-0,273 \pm 0,165 (N = 52)	0,067
lnBMDtot	0,148 \pm 0,176 (N = 217)	-0,148 \pm 0,180 (N = 234)	-0,112 \pm 0,172 (N = 51)	-0,107 \pm 0,193 (N = 51)	0,154

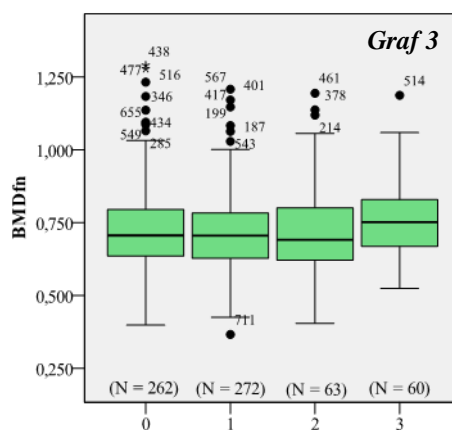
Rezultati statistične obdelave podatkov skupine vseh preiskovancev s testom Kruskal-Wallis niso pokazali statistično značilnih povezav med polimorfizmoma in biokemičnimi kazalci RANKL in OPG ali t-vrednostjo MKG vratu stegenice.



Graf 1: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za gen GSTM1 pri vseh preiskovancih. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 - prisotnost polimorfizma, N - število preiskovancev, BMDfn - MKG vratu stegenice)



Graf 2: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za gen GSTT1 pri vseh preiskovancih.



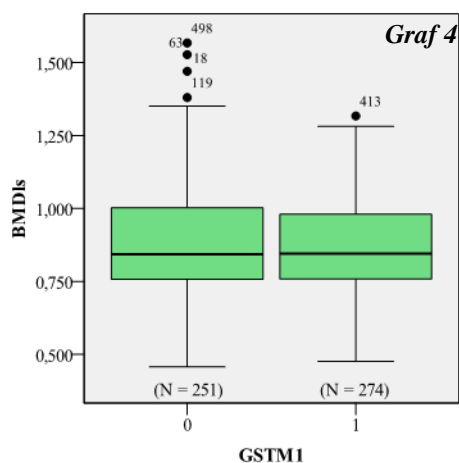
Graf 3: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri vseh preiskovancih. (0 - odsotnost obeh polimorfizmov, 1 - prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0, 2 - odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)

4.2.2.2 Vse preiskovanke

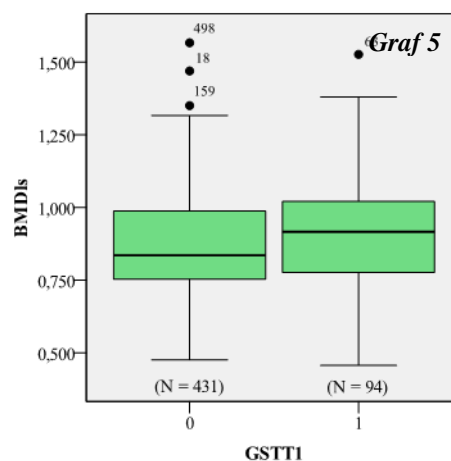
Proizvodnja ROS v celici je posredno povezana s prisotnostjo spolnih hormonov v organizmu. Njihova odsotnost vpliva na povečano proizvodnjo ROS, kar ob pomanjkljivih antioksidativnih mehanizmih prevesi ravnotežje na stran pro-oksidativnih reakcij. Na mikrobiološki ravni te povzročajo poškodbe celičnih komponent ali pa sprožajo specifične fiziološke signalne poti (*Slika 7*). Podatki o vseh preiskovankah so navedeni v *Preglednici XXII*.

Test ANCOVA je v skupini vseh preiskovank pokazal vpliv *GSTT1*0* na zvišano MKG ledvenih vretenc ($p = 0,043$), kar prikazuje tudi *Graf 5*. LSD Post Hoc test je pokazal povezavo med zvišanimi povprečnimi vrednostmi MKG vratu stegenice pri preiskovankah s prisotnima obema polimorfizmoma ($N = 48$), v primerjavi s preiskovankami z odsotnostjo obeh polimorfizmov ($p = 0,041$; $N = 201$), prisotnostjo zgolj *GSTM1*0* ($p = 0,015$; $N = 227$) in prisotnostjo zgolj *GSTT1*0* ($p = 0,015$; $N = 46$). *Graf 6* prikazuje višje povprečne vrednosti MKG ledvenih vretenc pri preiskovankah z obema polimorfizmoma (kombinacija genov tipa 3) in tistih z zgolj *GSTT1*0* (kombinacija genov tipa 2). Ker pri preiskovankah s *GSTM1*0* ni bila ugotovljena povezava z MKG ledvenih vretenc in, ker so vrednosti le-te zvišane v obeh kombinacijah genov, v katerih nastopa *GSTT1*0*, je možno sklepati, da ima v skupini vseh preiskovank *GSTT1*0* večji vpliv na MKG ledvenih vretenc, kot pa *GSTM1*0*.

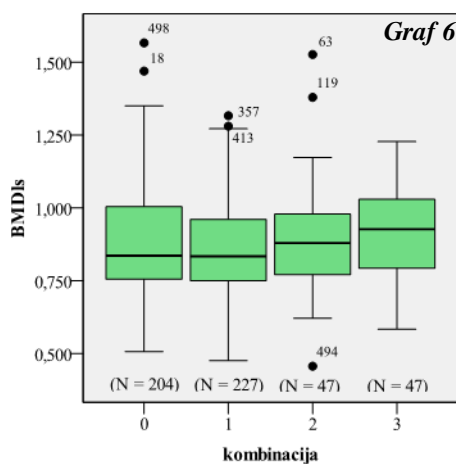
Rezultati statistične obdelave podatkov skupine vseh preiskovank s testom Kruskal-Wallis niso pokazali statistično značilnih povezav med polimorfizmoma in biokemičnimi kazalci RANKL, OPG in BALP.



Graf 4: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDls za gen GSTM1 pri vseh preiskovankah. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 - prisotnost polimorfizma, BMDls – MKG ledvenih vretenc)



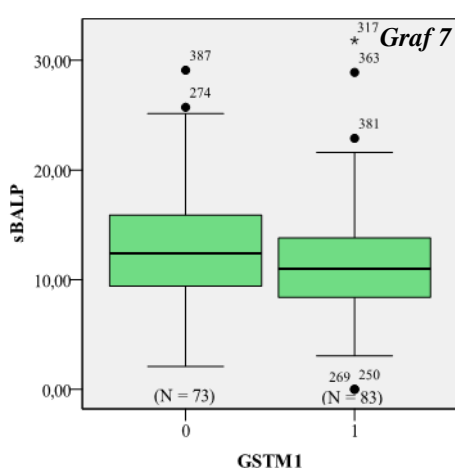
Graf 5: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDls za gen GSTT1 pri vseh preiskovankah.



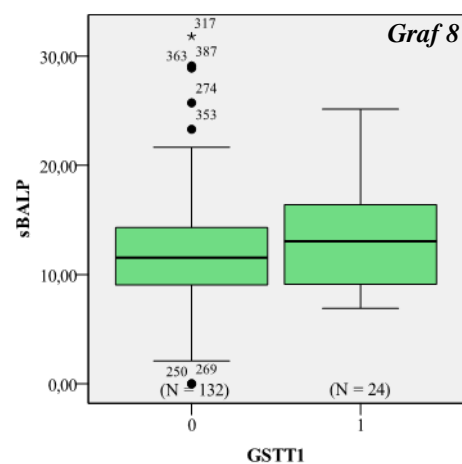
Graf 6: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDls za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri vseh preiskovankah. (0 - odsotnost obeh polimorfizmov, 1 - prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0, 2 - odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)

4.2.2.3 Pomenopavzalne preiskovanke

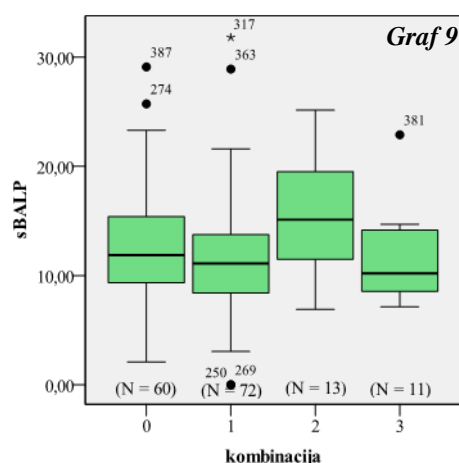
Vzrok pomenopavzalne osteoporoze je pomanjkanje estrogena, kar posredno sproži večjo resorpcijo in zmanjšano tvorbo kosti, posledica pa je nastanek kosti z manjšo MKG. Že tako krajša življenjska doba osteoblastov, zaradi odsotnosti estrogena, je ob sočasnem vplivu oksidativnega stresa lahko še dodatno skrajšana. Podatki o skupini pomenopavzalnih preiskovank so navedeni v *Preglednici XXIX*.



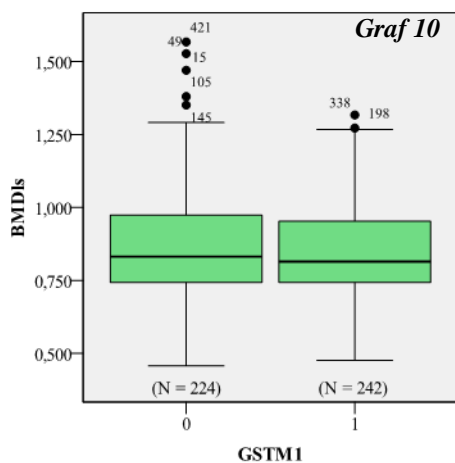
Graf 7: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za gen GSTM1 pri pomenopavzalnih preiskovankah. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 – prisotnost polimorfizma, BALP – kostna alkalna fosfataza)



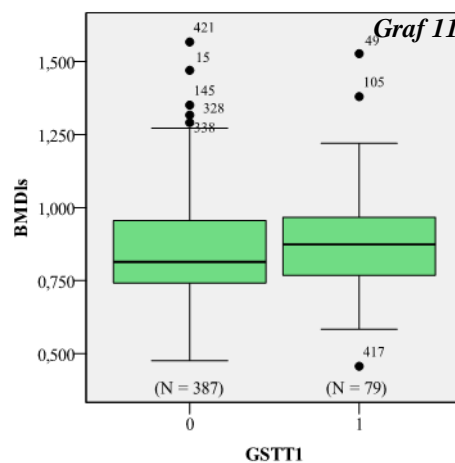
Graf 8: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za gen GSTT1 pri pomenopavzalnih preiskovankah.



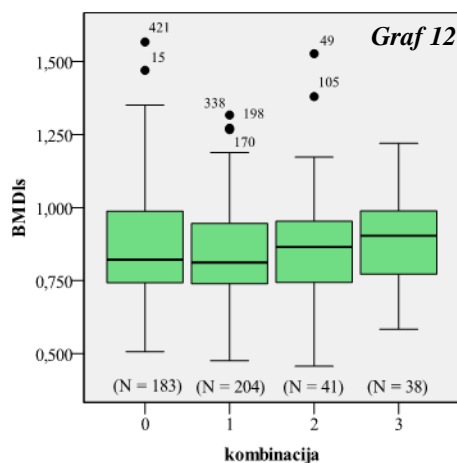
Graf 9: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri pomenopavzalnih preiskovankah. (0 - odsotnost obeh polimorfizmov, 1 - prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0, 2 - odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)



Graf 10: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDls za gen GSTM1 pri pomenopavzalnih preiskovankah. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 - prisotnost polimorfizma)



Graf 11: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDls za gen GSTT1 pri pomenopavzalnih preiskovankah.



Graf 12: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDls za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri pomenopavzalnih preiskovankah. (0 - odsotnost obeh polimorfizmov, 1 - prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0, 2 - odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)

Statistična obdelava podatkov preiskovank v pomenopavzalnem obdobju (N=470) s testom ANCOVA je potrdila povezavo GSTM1*0 in biokemičnega označevalca kostne tvorbe BALP, ki ga izločajo osteoblasti in je kazalec njihove aktivnosti ($p = 0,020$). Test ANCOVA je potrdil udeležnost GSTM1*0 v kombinacijah genov in povezavo z nižjimi vrednostmi BALP ($p = 0,040$). Razliko vrednosti BALP med skupino z zgolj GSTM1*0 (kombinacija genov tipa 1) in skupino z zgolj GSTT1*0 (kombinacija genov tipa 2) je potrdil tudi LSD Post Hoc test ($p = 0,009$), kar prikazuje **Graf 9**. Test LSD je pokazal

statistično značilno razliko v vrednostih MKG vratu stegenice med pomenopavzalnimi preiskovankami z obema polimorfizmoma in pomenopavzalnimi preiskovankami z zgolj *GSTT1*0* ($p = 0,021$). Vrednosti MKG vratu stegenice so pri preiskovankah z zgolj *GSTT1*0* v povprečju nižje, medtem ko so vrednosti BALP v povezavi z *GSTT1*0* v povprečju višje (**Graf 8 in Graf 9.**) Predpostavko o zvišani aktivnosti osteoblastov v tej skupini preiskovank potrjujejo podatki o zvišanih ravneh BALP v povezavi z *GSTT1*0*. Pri teh preiskovankah so vrednosti MKG ledvenih vretenc v povprečju višje (**Graf 11 in Graf 12**), kar pa izpodbija predpostavko o vplivu odsotnosti estrogena in posledično krajši življenjski dobi osteoblastov. Te vrednosti so v povprečju zvišane tako pri tistih, ki imajo prisoten samo *GSTT1*0* kot pri tistih z obema polimorfizmoma, vendar omenjene razlike niso statistično značilne.

Rezultati statistične obdelave podatkov skupine vseh preiskovancev s testom Kruskal-Wallis niso pokazali statistično značilnih povezav med polimorfizmoma in biokemičnimi kazalci RANKL, OPG in BALP.

4.2.2.4 Premenopavzalne preiskovanke

Rezultati statistične obdelave podatkov skupine premenopavzalnih žensk s testi ANOVA, ANCOVA, Kruskal-Wallis in Post Hoc testi so pokazali, da polimorfizma statistično značilno ne vplivata na mineralno kostno gostoto in biokemične kazalce kostne remodelacije.

4.2.2.5 Vsi moški preiskovanci

Pri skupini moških preiskovancev ($N=116$) so rezultati statistične obdelave podatkov s testom ANCOVA pokazali povezavo *GSTT1*0* z biokemičnim kazalcem OPG ($p = 0,031$; $N = 7$). Osteoprotegerin je receptor, ki tekmuje z receptorjem RANK za vezavo liganda RANKL. RANK se nahaja na hematopoetskih prednicah osteoklastnih celic in stimulira diferenciacijo v zrele celice. Povečana osteoklastna aktivnost in dejavniki, spremljajoče postopno zmanjševanje ravni testosterona, pridružene življenjske razvade (npr. kajenje) in kronične bolezni, povzročajo obolenje za osteoporozo tudi pri moških. Rezultati testa ANCOVA so potrdili povezavo *GSTT1*0* z višjimi ravnmi OPG. Skladno z naravo delovanja OPG je v povprečju zvišana tudi MKG vratu stegenice, vendar zvišanje ni

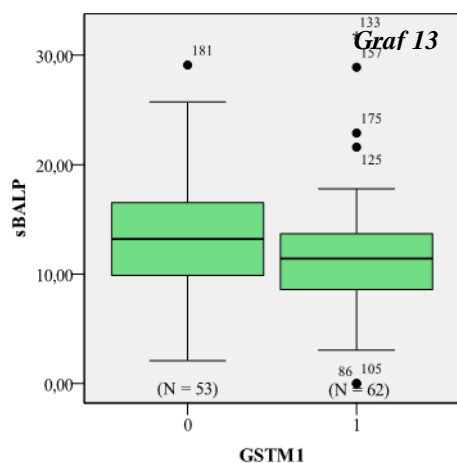
statistično značilno ($p = 0,199$). Vlogo OPG pri moških bi bilo potrebno proučiti na večjem številu preiskovancev.

Ostali rezultati testov ANOVA, ANCOVA, Kruskal-Wallis in testov Post Hoc niso pokazali statistično pomembnih povezav med polimorfizmoma in MKG oziroma biokemičnimi kazalci kostne remodelacije.

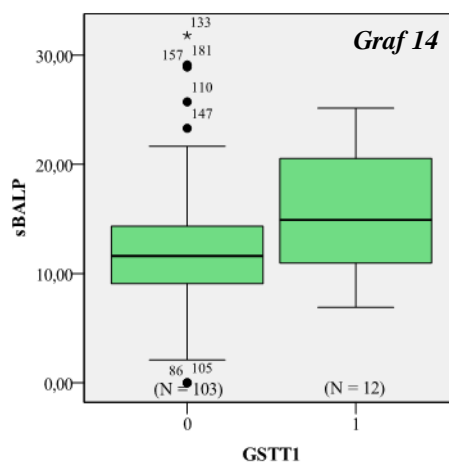
4.2.2.6 Preiskovanci, oboleli za osteoporozo

V skupini preiskovancev, obolelih za osteoporozo ($N=251$), so rezultati testa ANCOVA pokazali statistično pomembno odstopanje spremenljivke BALP v povezavi z *GSTM1*0* ($p = 0,030$), kjer so ravni BALP v povprečju znižane (**Graf 13**). V povezavi z *GSTT1*0* ($p = 0,055$) pa so ravni BALP v povprečju zvišane (**Graf 14**). Vendar je potrebno ta podatek v skupini preiskovancev, obolelih za osteoporozo, obravnavati previdno, ker so višje ravni BALP, zaradi izrazite kostne remodelacije, klinično povezane z razvojem bolezni osteoporoze. Statistično pomembno razliko vrednosti BALP pri osteoporoznih bolnikih z zgolj *GSTM1*0* napram bolnikom z zgolj *GSTT1*0* je potrdil LSD Post Hoc test ($p = 0,009$). Razliko prikazuje tudi **Graf 15** (kombinaciji genov tipa 1 in tipa 2). LSD test je potrdil povezavo med MKG vratu stegenice in preiskovanci z zgolj *GSTT1*0*, pri katerih so vrednosti MKG vratu stegenice v povprečju nižje v primerjavi z obolelimi preiskovanci s prisotnima obema polimorfizmoma ($p = 0,029$). Podobna statistično pomembna razlika med kombinacijama genov tipa 2 in tipa 3 je prisotna tudi v skupini pomenopavzalnih preiskovank. Podatki o višjih vrednostih MKG vratu stegenice, pri tistih s prisotnima obema polimorfizmoma napram tistim s prisotnim zgolj *GSTT1*0* (v obeh omenjenih skupinah preiskovancev), nakazujejo na pomembnost medsebojnega vpliva med geni. Možno je sklepati, da odsotnost funkcionalnega encima GSTT1 v tem primeru pomeni večje izražanje gena *GSTM1*, vendar bi za dokončno potrditev te domneve bilo potrebno opraviti dodatne študije o medsebojnih vplivih encimov iz družine glutation S-transferaz.

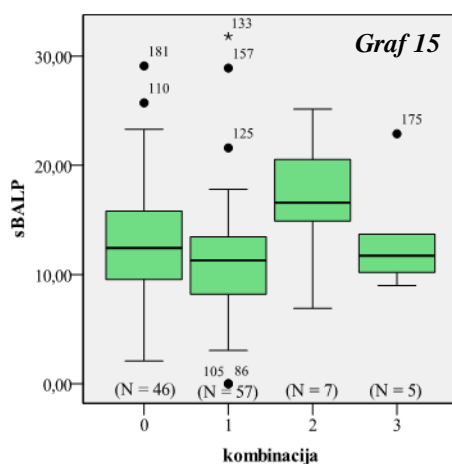
Rezultati statistične obdelave podatkov skupine preiskovancev, obolelih za osteoporozo s testom Kruskal-Wallis, niso pokazali statistično značilnih povezav med polimorfizmoma in biokemičnim kazalcem OPG ter t-vrednostjo MKG ledvenih vretenc.



Graf 13: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za gen GSTM1 pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 - prisotnost polimorfizma)



Graf 14: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za gen GSTT1 pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.



Graf 15: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo. (0 - odsotnost obeh polimorfizmov, 1 - prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0, 2 - odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)

4.2.2.7 Zdravi preiskovanci

Pri skupini zdravih preiskovancev (N=177) je statistična obdelava podatkov s testom ANCOVA pokazala povezavo *GSTM1*0* z nižjimi povprečnimi vrednostmi MKG ledvenih vretenc ($p = 0,032$; $N = 87$). Povezava nakazuje na genetsko predispozicijo pri posameznikih s prisotnim *GSTM1*0*, in sicer pri doseganju vrednosti največje kostne mase v obdobju razvoja. Za boljšo utemeljitev te domneve bi bilo potrebno opraviti genotipizacijo na večjem številu preiskovancev. Preostali rezultati statistične obdelave podatkov skupine zdravih preiskovancev s testi ANCOVA, Kruskal-Wallis in Post Hoc niso pokazali vpliva polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* na mineralno kostno gostoto in biokemične kazalce kostne remodelacije.

4.2.2.8 Preiskovanci, starejši od 65 let

Pri starosti nad 65 let je pri ženskah in moških raven spolnih hormonov v organizmu nižja, kar pri ženskah pomeni odsotnost zaščitnega vpliva estrogena, pri moških pa zmanjšan zaščitni vpliv testosterona v boju zoper oksidativni stres (*Slika 7*). Vse manj učinkoviti endogeni antioksidativni mehanizmi in verjetnost pridružene kronične bolezni, ki se v tej starostni skupini povečuje z leti, dodatno prispevajo k večji ranljivosti organizma zaradi oksidativnega stresa in njegovih učinkov. Hkrati statistična obravnava podatkov skupine preiskovancev, starejših od 65 let, ni občutljiva na vpliv spolnih hormonov, zaradi njihove odsotnosti oziroma zmanjšanih ravni, ker so lastnosti posameznikov znotraj skupine preiskovancev v tem smislu bolj homogene.

V skupini preiskovancev, starejših od 65 let ($N = 233$) je test ANCOVA potrdil povezavo med BALP in *GSTT1*0* ($p = 0,016$), kjer so vrednosti BALP v povprečju višje (*Graf 17*). Vendar, ker je omenjena povezava osnovana na podlagi podatkov petih preiskovancev, je za njeno dokončno potrditev potrebno izvesti genotipizacijo na večjem številu preiskovancev. Nižje vrednosti BALP pri preiskovancih z zgolj *GSTM1*0*, v primerjavi s preiskovanci z zgolj *GSTT1*0* ($p = 0,011$) in preiskovanci z obema polimorfizmoma ($p = 0,043$), je potrdil LSD Post Hoc test. Bolj izraziti so rezultati, ki povezujejo *GSTM1*0* z nižjimi povprečnimi vrednostmi MKG vratu stegenice ($p = 0,005$; *Graf 19*) ter MKG celotnega kolka ($p = 0,047$). V povezavi z *GSTM1*0* so v povprečju nižje tudi vrednosti MKG ledvenih vretenc, vendar ta razlika ni statistično značilna ($p = 0,104$).

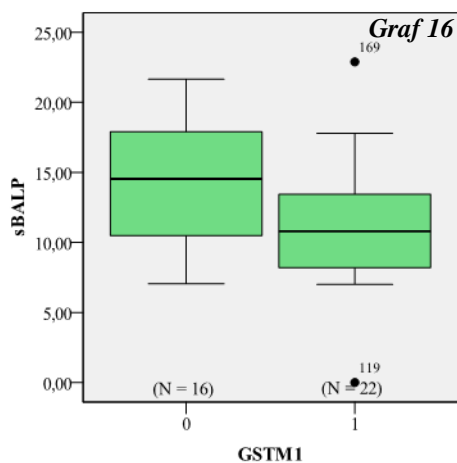
Povezavo *GSTM1*0* z nižjimi povprečnimi vrednostmi MKG vratu stegenice v primerjavi s preiskovanci brez obeh polimorfizmov, je potrdil LSD Post Hoc test ($p = 0,009$), kar prikazuje tudi **Graf 21** (kombinacija genov tipa 1). Test je potrdil še povezavo z biokemičnim kazalcem kostne remodelacije RANKL ($p = 0,022$; $N = 16$), katerega vrednosti so pri isti skupini preiskovancev (z zgolj *GSTM1*0*) v povprečju višje napram preiskovancem brez prisotnih obeh polimorfizmov. Vezava RANKL spodbuja diferenciacijo osteoklastov v zrele celice in posredno vpliva na povečano razgradnjo kosti. Manjša aktivnost osteoblastov (nižje povprečne vrednosti BALP prikazuje **Graf 16**) in večje izražanje RANKL prispevajo k nižjim povprečnim vrednostim MKG vratu stegenice, celotnega kolka in ledvenih vretenc pri preiskovancih z *GSTM1*0*.

Preglednica XII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk testa ANCOVA (povprečne vrednosti – srednja vrednost \pm SD) za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* pri preiskovancih, starejših od 65 let. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 – prisotnost polimorfizma)

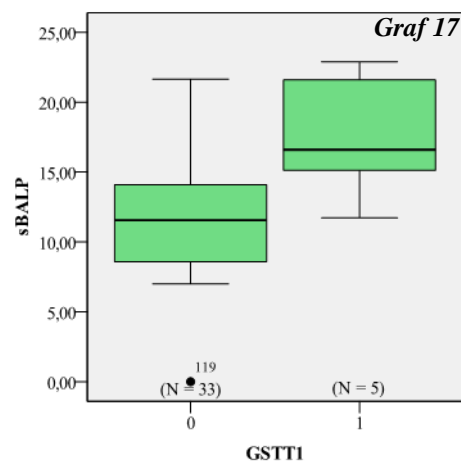
Spremenljivka (kovariabla: starost + ITM)	X \pm SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>			
	0	1	0	1	<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
lnBMDfn	-0,371 \pm 0,191 (N = 105)	-0,432 \pm 0,186 (N = 106)	-0,402 \pm 0,193 (N = 168)	-0,401 \pm 0,180 (N = 43)	0,005	0,747
BMDtot	0,855 \pm 0,156 (N = 105)	0,820 \pm 0,161 (N = 107)	0,837 \pm 0,160 (N = 168)	0,839 \pm 0,158 (N = 44)	0,047	0,641
lnBMDls	-0,125 \pm 0,214 (N = 112)	-0,164 \pm 0,193 (N = 111)	-0,145 \pm 0,196 (N = 178)	-0,143 \pm 0,238 (N = 45)	0,104	0,837

Preglednica XIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk testa ANCOVA (povprečne vrednosti – srednja vrednost \pm SD) za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* pri preiskovancih starejših od 65 let. (0 - odsotnost obeh polimorfizmov, 1 – prisotnost *GSTM1*0* in odsotnost *GSTT1*0*, 2 - odsotnost *GSTM1*0* in prisotnost *GSTT1*0*, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)

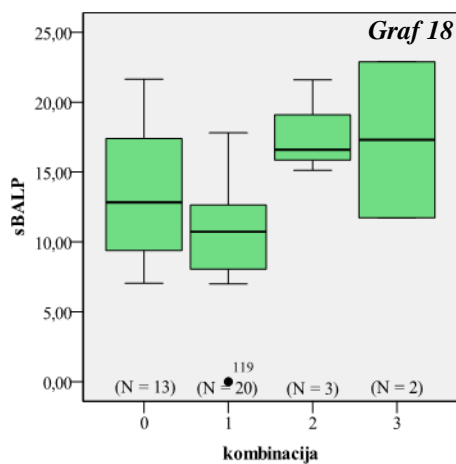
Spremenljivka (kovariabla: starost + ITM)	X \pm SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,361 \pm 0,187 (N = 78)	-0,438 \pm 0,192 (N = 89)	-0,401 \pm 0,201 (N = 26)	-0,402 \pm 0,148 (N = 17)	0,016
BMDtot	0,858 \pm 0,160 (N = 79)	0,818 \pm 0,159 (N = 89)	0,844 \pm 0,146 (N = 26)	0,831 \pm 0,177 (N = 18)	0,166
lnBMDls	-0,120 \pm 0,201 (N = 86)	-0,168 \pm 0,189 (N = 92)	-0,143 \pm 0,256 (N = 26)	-0,143 \pm 0,218 (N = 19)	0,260



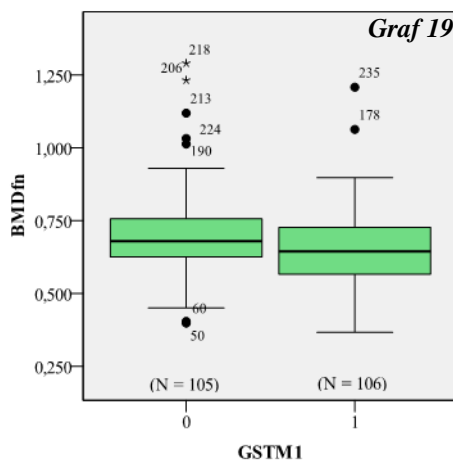
Graf 16: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za gen GSTM1 pri preiskovancih, starejših od 65 let. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 – prisotnost polimorfizma)



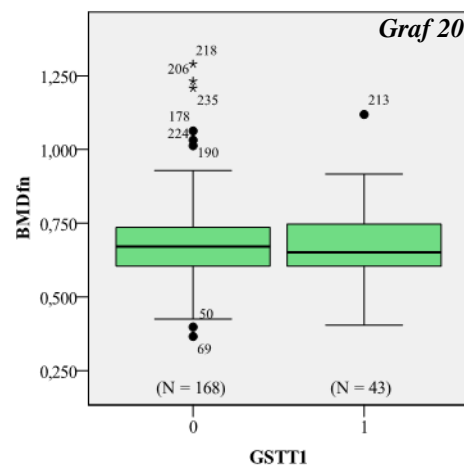
Graf 17: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za gen GSTT1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.



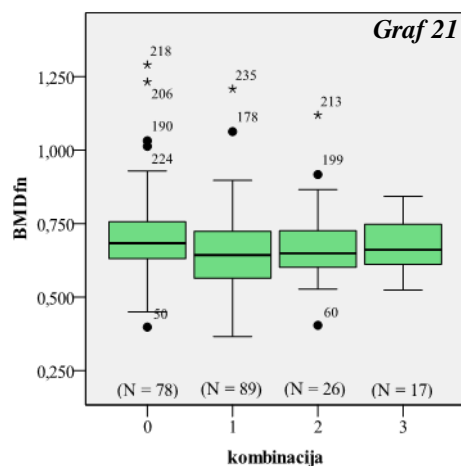
Graf 18: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BALP za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri preiskovancih, starejših od 65 let. (0 - odsotnost obeh polimorfizmov, 1 – prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0, 2 - odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)



Graf 19: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za gen GSTM1 pri preiskovancih, starejših od 65 let. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 - prisotnost polimorfizma)



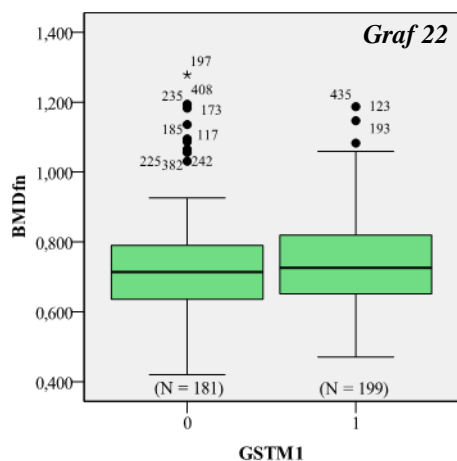
Graf 20: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za gen GSTT1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.



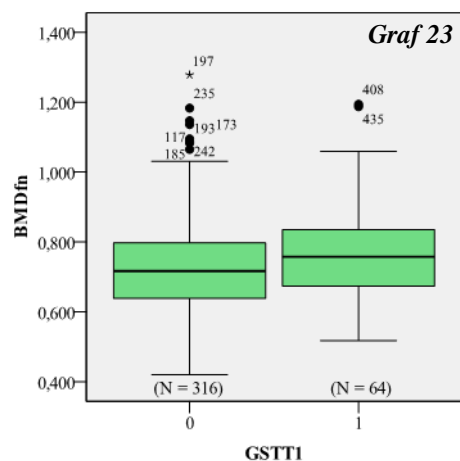
Graf 21: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri preiskovancih, starejših od 65 let.. (0 – odsotnost obeh polimorfizmov, 1 – prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0, 2 – odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0, 3 – prisotnost obeh polimorfizmov)

4.2.2.9 Preiskovanci, stari 65 let ali manj

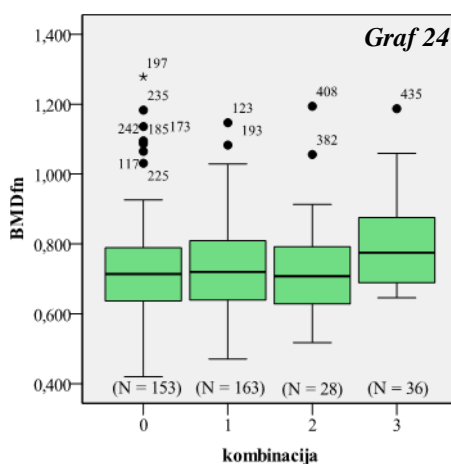
Rezultati statistične obdelave podatkov ANCOVA so pri preiskovancih, starih 65 let ali manj, potrdili povezavo *GSTT1*0* z zvišanimi povprečnimi vrednostmi MKG vratu stegenice ($p = 0,032$; $N = 64$, **Graf 23**), MKG celotnega kolka ($p = 0,041$; $N = 61$) in MKG ledvenih vretenc ($p = 0,043$; $N = 63$). Rezultati LSD Post Hoc testa so potrdili, da so vrednosti MKG vratu stegenice ($p = 0,003$) in MKG celotnega kolka ($p = 0,012$) pri preiskovancih s prisotnima polimorfizmoma v povprečju višje napram preiskovancev brez prisotnih polimorfizmov. Poleg tega je test potrdil, da je vrednosti MKG vratu stegenice pri tistih z zgolj *GSTMI*0* statistično značilno manjša v primerjavi s preiskovanci z obema polimorfizmoma ($p = 0,021$). Za razliko od ostalih dveh spremenljivk, je MKG ledvenih vretenc pri preiskovancih z zgolj *GSTMI*0* nižja v primerjavi s preiskovanci z zgolj *GSTT1*0* ($p = 0,037$) in v primerjavi s preiskovanci z obema polimorfizmoma ($p = 0,044$), kar je potrdil LSD Post Hoc test. V obravnavani skupini so vključeni tudi preiskovanci in preiskovanke, ki še ne čutijo učinkov odsotnosti oziroma zmanjšanih ravni spolnih hormonov. V primerjavi s skupino preiskovancev, starejših od 65 let, je opazna razlika zlasti v smislu, kateri polimorfizem nosi poglobljen vpliv v posamezni skupini preiskovancev. Razlika med njima je predvsem, da je vpliv *GSTMI*0* v skupini preiskovancev, starejših od 65 let, povezan z nižjo MKG vratu stegenice in celotnega kolka, medtem ko je v skupini preiskovancev, starih 65 let ali manj, povezan z višjima MKG, vendar razliki nista statistično značilni. Izjema v skupini preiskovancev, starih 65 let ali manj, s prisotnim *GSTMI*0*, so nižje povprečne vrednosti MKG ledvenih vretenc. Hitrost rasti MKG ledvenih vretenc je pri ženskah največja v starostnem obdobju med 10. in 14. letom starosti oziroma do enega leta po prvi menstruaciji. Do 17. leta starosti se MKG ledvenih vretenc še vedno povečuje, a z manjšo hitrostjo (63). Ker je dosežena največja kostna masa eden izmed dejavnikov, ki odločajo o vrednostih MKG v poznejši starosti, je možno sklepati na vključenost *GSTMI*0* v obdobje razvoja kosti (**Slika 2**).



Graf 22: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za gen GSTM1 pri preiskovancih, starih 65 let ali manj. (0 - odsotnost polimorfizma, 1 - prisotnost polimorfizma)



Graf 23: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za gen GSTT1 pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.



Graf 24: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) BMDfn za kombinacijo genov GSTM1 in GSTT1 pri preiskovancih, starih 65 let ali manj. (0 – odsotnost obeh polimorfizmov, 1 – prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0, 2 – odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0, 3 - prisotnost obeh polimorfizmov)

5 SKLEP

V našem raziskovalnem delu smo želeli ugotoviti ali delecijška polimorfizma *GSTM1*0* in *GSTT1*0* vplivata na mineralno kostno gostoto in na biokemične kazalce kostne remodelacije. V raziskavo smo vključili 721 preiskovancev, katerim so bile izmerjene vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne remodelacije. Skupino vseh preiskovancev smo razdelili glede na spol v skupino moških preiskovancev in v skupino vseh preiskovank ter glede na starost v skupino preiskovancev, starejših od 65 let in v skupino preiskovancev, starih 65 let ali manj. Skupino vseh preiskovank smo razdelili še glede na status mene v skupino premenopavzalnih in skupino pomenopavzalnih preiskovank. Iz podatkov o preiskovancih smo sestavili še skupino zdravih preiskovancev in skupino preiskovancev, obolenih za osteoporozo. Optimizirali smo metodo večkratnega sočasnega pomnoževanja z DNA polimerazo, ki nam je omogočila sočasno pomnoževanje dveh tarčnih odsekov DNA. En odsek je vseboval preiskovani delecijški polimorfizem *GSTM1*0*, drugi odsek DNA pa je vseboval preiskovani delecijški polimorfizem *GSTT1*0*.

S pomočjo statistične analize smo ocenili klinični pomen delecijških polimorfizmov *GSTM1*0* in *GSTT1*0* in ugotovili, da:

- je pogostnost *GSTM1*0* pri Slovencih 51,1 %, medtem ko je pogostnost *GSTT1*0* 19,0 %. Pogostnost *GSTM1*0* (55,4 %) in *GSTT1*0* (25 %) je največja v skupini premenopavzalnih preiskovank. Najmanjša pogostnost *GSTM1*0* je v skupini moških preiskovancev (44,8 %), najmanjša pogostnost *GSTT1*0* pa v skupini preiskovancev, obolenih za osteoporozo (14,3 %).
- je v skupini vseh preiskovancev *GSTT1*0* statistično značilno povezan z višjima vrednostima MKG vratu stegenice ($p = 0,020$) in celotnega kolka ($p = 0,025$). MKG vratu stegenice je pri preiskovancih z obema polimorfizmoma višja v primerjavi s preiskovanci brez prisotnih polimorfizmov ($p = 0,023$) in v primerjavi s preiskovanci z zgolj *GSTM1*0* ($p = 0,006$). Vrednost BALP je statistično značilno višja pri preiskovancih z zgolj *GSTT1*0* v primerjavi s preiskovanci z zgolj *GSTM1*0* ($0,027$);
- je v skupini vseh preiskovank vrednost MKG vratu stegenice pri tistih z obema polimorfizmoma statistično značilno višja glede na preiskovanke z odsotnima

- polimorfizmoma ($p = 0,041$), glede na preiskovanke s prisotnim zgolj *GSTMI*0* ($p = 0,015$) in glede na preiskovanke s prisotnim zgolj *GSTTI*0* ($p = 0,015$). Prisotnost *GSTTI*0* pri ženskah je statistično značilno povezana z višjo vrednostjo MKG ledvenih vretenc ($p = 0,043$);
- je v skupini pomenopavzalnih preiskovank *GSTMI*0* statistično značilno povezan z manjšo vrednostjo BALP ($p = 0,020$). Ob tem je bila razlika med preiskovankami s prisotnim zgolj *GSTMI*0* in preiskovankami s prisotnim zgolj *GSTTI*0* prav tako statistično značilna ($p = 0,009$). Prisotnost zgolj *GSTTI*0* pri pomenopavzalnih preiskovankah je statistično značilno povezana z manjšo vrednostjo MKG vratu stegenice v primerjavi s preiskovankami s prisotnima obema polimorfizmoma ($p = 0,021$);
 - je v skupini moških preiskovancev *GSTTI*0* statistično značilno povezan z višjo vrednostjo biokemičnega kazalca OPG ($p = 0,031$);
 - je v skupini preiskovancev, obolelih za osteoporozo, *GSTMI*0* statistično značilno povezan z nižjo vrednostjo BALP ($p = 0,030$). Pri preiskovancih s prisotnim zgolj *GSTMI*0* se vrednost BALP statistično značilno razlikuje od vrednosti BALP preiskovancev s prisotnim zgolj *GSTTI*0* ($p = 0,009$). Pri preiskovancih z zgolj *GSTTI*0* je vrednost MKG vratu stegenice statistično značilno nižja v primerjavi s preiskovanci s prisotnima obema polimorfizmoma ($p = 0,029$);
 - je pri zdravih preiskovancih *GSTMI*0* statistično značilno povezan z nižjo MKG ledvenih vretenc ($p = 0,032$);
 - je v skupini preiskovancev, starejših od 65 let, *GSTTI*0* statistično značilno povezan z višjo vrednostjo BALP ($p = 0,016$), medtem ko je *GSTMI*0* statistično značilno povezan z nižjo vrednostjo MKG vratu stegenice ($p = 0,005$) in MKG celotnega kolka ($p = 0,047$). Pri preiskovancih z zgolj *GSTMI*0* je vrednost BALP nižja v primerjavi s tistimi z zgolj *GSTTI*0* ($p = 0,011$) in tistimi s prisotnima obema polimorfizmoma ($p = 0,043$). Prisotnost zgolj *GSTMI*0* je statistično značilno povezana tudi z višjo vrednostjo RANKL ($p = 0,022$) in nižjo vrednostjo MKG vratu stegenice ($p = 0,009$) v primerjavi s preiskovanci brez prisotnih obeh polimorfizmov;
 - je v skupini preiskovancev, mlajših od 65 let, *GSTTI*0* statistično značilno vpliva na zvišanje vrednosti MKG vratu stegenice ($p = 0,032$), MKG celotnega kolka ($p = 0,041$) in MKG ledvenih vretenc ($p = 0,043$). Prisotnost obeh polimorfizmov

je statistično značilno povezana z višjo vrednostjo MKG vratu stegenice ($p = 0,003$) in MKG celotnega kolka ($p = 0,012$) v primerjavi s preiskovanci brez prisotnih polimorfizmov. Prisotnost zgolj *GSTM1*0* je statistično značilno povezana z nižjo vrednostjo MKG vratu stegenice v primerjavi s preiskovanci s prisotnima obema polimorfizmoma ($p = 0,021$). Prisotnost zgolj *GSTM1*0* je povezana tudi z nižjo vrednostjo MKG ledvenih vretenc tako v primerjavi s tistimi z zgolj *GSTT1*0* ($p = 0,037$) in tistimi z obema polimorfizmoma ($p = 0,044$);

- je pogostnost *GSTT1*0* v skupini obolelih za osteoporozo statistično značilno manjša v primerjavi s skupino zdravih preiskovancev ($p = 0,0005$).

Na podlagi rezultatov raziskave sklepamo, da imata oba polimorfizma vpliv na mineralno kostno gostoto, vendar večji vpliv pripisujemo delecijskemu polimorfizmu *GSTT1*0*. Ta je v vseh skupinah, z izjemo skupine pomenopavzalnih preiskovank, premenopavzalnih preiskovank in skupine preiskovancev, obolelih za osteoporozo, statistično značilno povezan z višjimi vrednostmi MKG oziroma biokemičnimi kazalci kostne remodelacije. Nasprotno temu, je delecijski polimorfizem *GSTT1*0* v skupini preiskovancev, obolelih za osteoporozo in skupini pomenopavzalnih preiskovank, povezan z nižjo vrednostjo MKG, ampak le v primerjavi s tistimi preiskovanci (iz iste skupine) s prisotnima obema polimorfizmoma. Delecijski polimorfizem *GSTM1*0* je pokazal vpliv na vrednost BALP, ki je nižja v skupini pomenopavzalnih preiskovank in skupini obolelih za osteoporozo. Pokazal je tudi vpliv na manjšo vrednost MKG ledvenih vretenc pri skupini zdravih preiskovancev, na podlagi česar je možno sklepati na njegovo vključenost v obdobje razvoja in rasti kosti. V naši raziskavi smo dokazali vpliv delecije genov *GSTM1* in *GSTT1* na mineralno kostno gostoto. Delecijski polimorfizem *GSTT1*0* je povezan z višjimi vrednostmi MKG, kar je v nasprotju z našo hipotezo. Glede na naše rezultate sklepamo, da odsotnost funkcionalnih encimov *GSTM1* in *GSTT1* vpliva na kostno tkivo, zato bi bilo smiselno preučiti tudi genetske značilnosti ostalih encimov v družini glutation S-transferaz, njihove medsebojne vplive in mehanizme vpletenosti v boleznih kosti.

6 LITERATURA

1. Porth CM: Essentials of pathophysiology: Concepts of altered health states, 2nd Edition, 2004: 779-787.
2. WHO Scientific Group: Prevention and Management of Osteoporosis: Report of a WHO scientific group, Geneva, 2000; 1-176.
3. Manolagas S C, Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. Endocrine Reviews, 2000; 21(2): 115-137.
4. Hernández-Gil F-T I, Gracia A M A, Pingarrón del C M, Jerez L B: Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2006; 11: E47-51.
5. Weinstein R S, Manolagas S C: Apoptosis and Osteoporosis. Am J Med, 2000; 108: 153-164.
6. Kocijančič A: Presnovne bolezni. V: Kocijančič A, Mrevlje F: Interna medicina, EWO d.o.o. in DZS d.d., Ljubljana, 1998: 711-736.
7. Rang H, Dale M, Ritter J, Moor P: Bone metabolism. V: Pharmacology, Churchill Livingstone, London, 2003: 446-61.
8. <http://www.york.ac.uk/res/btr/imagelibrary.html>
9. Zhang L, Hong LK: 101 Questions & Answers about Osteoporosis. Aromour Publishing Pte Ltd, Singapore, 2003, 10-11.
10. Kocijančič A: Osteoporoza. Farm Vestn, 2000; 51: 351-352.
11. <http://www.iofbonehealth.org/>
12. ICSI Working group: Health Care Guideline: Diagnosis and Treatment of Osteoporosis, 6th Ed, Institute for Clinical Systems Improvement, 2008; 19-20.
13. Lang P, Steiger P, Faulkner K, Glüer C, Genant H K: Osteoporosis: current techniques and recent developments in quantitative bone densitometry. Radiol Clin North Am, 1991; 29(1): 49-76.

14. Baert AL, Knauth M, Sartor K: Medical Radiology: Diagnostic imaging – Radiology of Osteoporosis, 2nd Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, 137-139.
15. Geusens P, Sambrook P, Lindsay R: Osteoporosis in Clinical Practice: a Practical Guide for Diagnosis and Treatment, 2nd Ed., Springer-Verlag London, 2004; 81-82.
16. Legan M: Histološke značilnosti kosti pri nekaterih presnovnih kostnih boleznih. Med Razgl, 2004; 43: 245-253.
17. ICSI Working group: Technology Assessment: Biochemical Markers for Bone Turnover in Osteoporosis, Institute for Clinical Systems Improvement, 2001; 3-7.
18. Rukavina S A: Osteoporoza. Biochemia Medica, 1996; 6(1): 3-11.
19. <http://www.shef.ac.uk/FRAX/>
20. Kocijančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. Zdrav Vestn, 2002; 71: 571-573.
21. Hren R, Salobir B, Breznik M, Kocijančič A za Raziskovalno skupino Osteo-max: Predlog racionalnega presejanja osteoporoze v osnovnem zdravstvu. Zdrav Vestn, 2002; 71:I-45-8.
22. Žorž G: Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. J ISIS, 2006; 15(3): 34-6.
23. Franić D: Novi vidiki diagnostike in zdravljenja osteoporoze. Zdrav Vestn, 2009; 78: I-143-50.
24. Srivastava R: Apoptosis, cell signaling, and human diseases: molecular mechanisms, Volume 2. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2007; 366-368.
25. Özben T: Free radicals, Oxidative stress, and Antioxidants: Pathological and Physiological Significance, NATO ASI Series A, Life Sciences Vol. 296. Plenum Press, New York, 1998; 51-61.
26. Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature, 2000; 408: 239-247.
27. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J: Redox regulation of cellular activation. Annu Rev Immunol, 1997; 15:351-369.

28. Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002; 82: 47-95.
29. Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, Maellaro E, Pompella A: Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol*, 2002; 64: 1027-1035.
30. Bai X, Lu D, Liu A, Zhang Z, iu L, Zou Z, Zeng W, Cheng B, Luo S: Reactive Oxygen Species Stimulates Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Expression in Osteoblast. *J Biol Chem*, 2005; 280(17): 17497-17506.
31. Almeida M, Han L, Martin-Millar M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, Kousteni S, O'Brien C, Bellido T, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC: Skeletal Involution by Age-associated Oxidative stress and Its Acceleration by Loss of Sex Steroids. *J Biol Chem*, 2007; 282 (37): 27285-27297.
32. Manolagas SC, Almeida M: Gone with the Wnts: β -Catenin, T-Cell Factor, Forkhead Box O, and Oxidative Stress in Age-Dependent Diseases of Bone, Lipid, and Glucose Metabolism. *Mol Endocrinol*, 2007; 21(11): 2605-2614.
33. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC: Oxidative Stress Antagonizes Wnt Signaling in Osteoblast Precursors by Diverting β -Catenin from T-Cell Factor to Forkhead Box O-mediated Transcription. *J Biol Chem*, 2007; 282 (37): 27298-305.
34. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC: Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis and bone mass by androgens: the role of the androgen receptor. *J Clin Invest*, 1995; 95: 2886-2895.
35. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC: Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 1992; 257: 88-91.
36. Manolagas SC: The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Ann NY Acad Sci*, 1998; 840: 194-204.
37. Black K, Garret IR, Mundy GR: Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukine-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and trombocytosis in tumor-bearing nude mice. *Endocrinology*, 1992; 128: 2657-9.

38. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ: Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrin Rev*, 2002; 23: 279-302.
39. Pfeilschiffer K, Koditz R, Pfohl M, Schatz H: Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine Rev*, 2002; 23: 90-119.
40. Jagger CJ, Lean JM, Davies JT, Chambers TJ: Tumor Necrosis Factor-alpha Mediates Osteopenia Caused by Depletion of Antioxidants. *Endocrinology*, 2005; 146(1): 113-118.
41. Smith CM, Marks AD, Liebermann MA: Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, 2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005; 439-457.
42. Steinbeck MJ, Appel WH, Verhoeven AJ, Karnovsky MJ: NADPH-oxidase expression and in situ production of superoxide by osteoclasts actively resorbing bone. *J Cell Biol*, 1994; 126: 765-772.
43. Bax BE, Alam AS, Banerji B, Bax CM, Bevis PJ, Stevens CR, Moonga BS, Blake DR, Zaidi M: Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Comm*, 1992; 183: 1153-1158.
44. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR: Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 1990; 85: 632-639.
45. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA: Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, 2001; 360: 1-16.
46. Dušinská M, Ficek A, Horská A, Rašlová K, Petrovská H, Vallová B, Drlicková M, Wood SG, Štupáková A, Gašparovič J, Bobek P, Nagyová A, Kováčiková Z, Blažíček P, Liegebel U, Collins AR: Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutation Research*, 2001; 47-55.
47. Mustacich D, Powis G: Thioredoxin reductase. *Biochem J*, 2000, 346: 1-8.
48. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA: Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutat Res*, 2001; 482: 21-26.

49. Dirr HW, Reinemer P, Huber R: X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur J Biochem*, 1994; 220: 645-661.
50. Mannervik B, Joseph PD: *Molecular Toxicology*, 2nd Ed. Oxford University Press, Inc., New York, 2006; 349-351.
51. Board P, Coggan M, Johnston P, Ross V, Suzuki T, Webb G.: Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharm Ther*, 1990; 48: 357-369.
52. <http://www.genecards.org>
53. Eaton DL, Bammler TK: Concise Review of the Glutathione S-Transferases and their Significance to Toxicology. *Toxicol Sci*, 1999; 49: 156-164.
54. Board P, Coggan M, Wilce MCJ, Parker MW: Evidence for an essential serine residue in the active site of the theta class glutathione transferases. *Biochem J*, 1995; 311: 247-250.
55. Strachan T, Read A: *Human Molecular Genetics*, 3rd Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2004; 316-17.
56. Stearns SC, Koella JC: *Evolution in Health and Disease*, 2nd Ed. Oxford University Press, New York, 2008. 42-43.
57. Mannervik Bengt, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Murumatsu M, Pearson WR, Pickett CB, Sato K, Widersten M, Wolf CR: Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J*, 1992; 282: 305-308.
58. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, et al.: Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001. 10: 1239-48.
59. Hayes JD, Strange RC: Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 2000; 61: 154-66.
60. <http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/reviews/index.htm>

61. Fuchs J, Podda M: Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics. Marcel Dekker, New York, 2005; 907-909.
62. Lo YMD, Chiu RWK, Chan KCA: Methods in Molecular Biology: Clinical applications of PCR, 2nd Ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006; 1-10.
63. Bonnick SL: Bone Densitometry in Clinical Practice: Application and Interpretation, 3rd Ed. Humana Press, Denton ,USA. 2010; 342-344.

7 PRILOGE

7.1 Priloga 1: Rezultati genotipizacije

*Preglednica XIV: Zbrani podatki genotipizacije za GSTM1 in GSTT1. Rezultati v stolpcu z imenom GSTM1 ter GSTT1 so označeni z 0 in 1, kjer 0 pomeni odsotnost polimorfizma, 1 pomeni prisotnost polimorfizma. Rezultati v koloni z imenom kombinacija: 0 pomeni odsotnost GSTM1*0 in GSTT1*0; 1 pomeni prisotnost GSTM1*0 in odsotnost GSTT1*0; 2 pomeni odsotnost GSTM1*0 in prisotnost GSTT1*0; 3 pomeni prisotnost obeh GSTM1*0 in GSTT1*0.*

zap. št.	oznaka	GSTM1	GSTT1	kombinacija	62	opg	1	0	1
1	opg	1	1	3	63	opg	1	0	1
2	opg	1	1	3	64	opg	0	0	0
3	opg	0	0	0	65	opg	1	0	1
4	opg	0	0	0	66	opg	1	0	1
5	opg	1	0	1	67	opg	0	0	0
6	opg	1	0	1	68	opg	0	0	0
7	opg	0	1	2	69	opg	1	1	3
8	opg	0	0	0	70	opg	1	0	1
9	opg	0	0	0	71	opg	1	0	1
10	opg	1	0	1	72	opg	1	1	3
11	opg	1	0	1	73	opg	0	0	0
12	opg	1	0	1	74	opg	1	0	1
13	opg	1	0	1	75	opg	1	1	3
14	opg	0	0	0	76	opg	0	0	0
15	opg	1	0	1	77	opg	1	0	1
16	opg	1	0	1	78	opg	0	0	0
17	opg	0	0	0	79	opg	1	0	1
18	opg	0	0	0	80	opg	0	0	0
19	opg	1	0	1	81	opg	1	1	3
20	opg	0	0	0	82	opg	1	1	3
21	opg	0	1	2	83	opg			
22	opg	1	1	3	84	opg	0	0	0
23	opg	1	0	1	85	opg	1	0	1
24	opg	1	1	3	86	opg	0	0	0
25	opg	0	1	2	87	opg	1	0	1
26	opg	0	1	2	88	opg	0	1	2
27	opg	0	1	2	89	opg	0	0	0
28	opg	1	1	3	90	opg	1	0	1
29	opg	1	1	3	91	opg	0	1	2
30	opg	0	1	2	92	opg	0	0	0
31	opg	1	0	1	93	opg	1	1	3
32	opg	0	0	0	94	opg	0	0	0
33	opg	1	1	3	95	opg	0	0	0
34	opg	1	1	3	96	opg	0	0	0
35	opg				97	opg	1	0	1
36	opg	1	1	3	98	opg	1	1	3
37	opg	1	1	3	99	opg	1	0	1
38	opg	1	0	1	100	opg	1	0	1
39	opg	1	0	1	101	opg	1	0	1

40	opg	1	0	1	102	opg	1	0	1
41	opg	0	0	0	103	opg	0	1	2
42	opg	0	0	0	104	opg	0	0	0
43	opg	0	1	2	105	opg	0	0	0
44	opg	0	0	0	106	opg	0	0	0
45	opg	1	0	1	107	opg	0	0	0
46	opg	1	0	1	108	opg	1	0	1
47	opg	0	1	2	109	opg			
48	opg	0	0	0	110	opg	0	0	0
49	opg	0	0	0	111	opg	1	0	1
50	opg	1	0	1	112	opg	0	0	0
51	opg	1	1	3	113	opg	0	0	0
52	opg	1	0	1	114	opg	0	0	0
53	opg	1	1	3	115	opg	0	0	0
54	opg	1	0	1	116	opg	0	0	0
55	opg	1	0	1	117	opg	1	0	1
56	opg	1	0	1	587	ralo	1	0	1
57	opg	1	0	1	588	ralo	0	0	0
58	opg	1	0	1	589	ralo	0	0	0
59	opg	0	0	0	590	ralo	0	1	2
60	opg	1	0	1	591	ralo	0	0	0
61	opg	0	1	2	592	ralo	1	0	1
593	ralo	1	0	1	671	6Y	1	1	3
594	ralo	1	0	1	672	7Y	1	0	1
595	ralo	1	0	1	673	8Y	1	0	1
596	ralo	1	0	1	674	9Y	0	0	0
597	ralo	1	0	1	675	10Y	1	0	1
598	ralo	0	0	0	676	11Y	1	0	1
599	ralo	0	1	2	677	12Y	0	0	0
600	ralo	1	0	1	678	13Y	0	0	0
601	ralo	0	0	0	679	14Y	0	1	2
602	ralo	1	0	1	680	15Y	0	0	0
603	ralo	1	0	1	681	16Y	1	0	1
604	ralo	1	0	1	682	17Y	0	0	0
605	ralo	0	0	0	683	18Y	1	0	1
606	ralo	1	0	1	684	19Y	1	1	3
607	ralo	0	1	2	685	20Y	1	1	3
608	ralo	0	0	0	686	21Y	1	1	3
609	ralo	1	0	1	687	22Y	1	0	1
610	ralo	0	0	0	688	23Y	1	0	1
611	ralo	0	0	0	689	24Y	1	0	1
612	ralo	0	0	0	690	25Y	1	0	1
613	ralo	1	0	1	691	26Y	0	1	2
614	ralo	1	0	1	692	27Y	0	0	0
615	ralo	1	0	1	693	28Y	0	0	0
616	ralo	0	1	2	694	29Y	0	0	0
617	ralo	0	0	0	695	30Y	1	0	1
618	ralo	0	0	0	696	31Y	1	1	3
619	ralo	1	0	1	697	32Y	0	0	0
620	ralo	0	0	0	698	33Y	0	0	0
621	ralo	0	0	0	699	34Y	0	0	0

622	ralo	0	0	0	700	35Y	1	0	1
623	ralo	1	0	1	701	36Y	1	0	1
624	ralo	1	0	1	702	37Y	0	1	2
625	ralo	0	0	0	703	38Y	1	1	3
626	ralo	1	0	1	704	39Y	0	0	0
627	ralo	1	0	1	705	40Y	0	0	0
628	ralo	1	0	1	706	41Y	0	0	0
629	ralo	1	0	1	707	42Y	1	0	1
630	ralo	0	0	0	708	43Y	0	0	0
631	ralo	0	0	0	709	44Y	1	1	3
632	ralo	1	0	1	710	45Y	1	0	1
633	ralo	1	1	3	711	46Y	1	0	1
634	ralo	1	0	1	712	47Y	1	0	1
635	ralo	0	0	0	713	48Y	1	0	1
636	ralo	1	0	1	714	49Y	1	0	1
637	ralo	1	0	1	715	50Y	1	1	3
638	ralo	1	0	1	716	51Y	0	0	0
639	ralo	1	0	1	717	52Y	0	0	0
640	ralo	0	1	2	718	53Y	1	0	1
659	ralo	0	0	0	719	54Y	1	0	1
660	ralo	0	0	0	720	55Y	1	0	1
661	ralo	1	1	3	721	56Y	0	0	0
662	ralo	0	0	0	722	57Y	1	0	1
663	ralo	1	0	1	723	58Y	1	0	1
664	ralo	0	0	0	724	59Y	0	0	0
665	ralo	0	0	0	725	60Y	0	0	0
666	ralo	0	1	2	726	61Y	1	1	3
667	ralo	0	0	0	727	62Y	0	0	0
666	1Y	1	0	1	728	63Y	1	0	1
667	2Y	0	0	0	729	64Y	1	0	1
668	3Y	0	0	0	730	65Y	1	0	1
669	4Y	0	0	0	731	66Y	1	0	1
670	5Y	0	0	0	732	67Y	1	0	1
733	68Y	1	0	1	795	205Y	0	1	2
734	69Y	1	1	3	796	206Y	0	0	0
735	70Y	0	0	0	797	207Y	0	0	0
736	71Y	1	1	3	798	208Y	1	0	1
737	72Y	0	0	0	799	209Y	0	0	0
738	73Y	1	0	1	800	210Y	1	0	1
739	74Y	0	1	2	801	211Y	0	0	0
740	75Y	0	0	0	802	212Y	1	1	3
741	76Y	0	0	0	803	213Y	1	0	1
742	77Y	1	0	1	804	214Y	1	1	3
743	78Y	1	0	1	805	215Y	0	1	2
744	79Y	1	0	1	806	216Y	1	0	1
745	80Y	1	1	3	807	217Y	1	1	3
746	81Y	0	0	0	808	219Y	1	0	1
747	82Y	0	0	0	809	220Y	0	1	2
748	83Y	0	1	2	810	218Y	0	0	0
749	84Y	1	1	3	811	221Y	0	0	0
750	85Y	1	1	3	812	222Y	1	0	1

751	86Y	0	0	0	813	223Y	0	0	0
752	87Y	1	1	3	814	224Y	0	0	0
753	89Y	1	0	1	815	225Y	0	0	0
754	90Y	0	0	0	816	226Y	0	0	0
755	91Y				817	227Y	0	0	0
756	92Y	1	0	1	818	228Y	1	0	1
757	93Y	0	0	0	819	229Y	0	1	2
758	94Y	0	1	2	820	230Y	1	0	1
759	95Y	1	1	3	821	231Y	1	1	3
760	96Y	0	0	0	822	232Y	0	0	0
761	97Y	1	0	1	823	233Y	1	0	1
762	98Y	0	0	0	824	234Y	0	0	0
763	99Y	1	0	1	825	168Y	0	0	0
764	100Y	0	0	0	826	169Y	0	0	0
765	101Y	0	0	0	827	170Y	1	0	1
766	102Y	0	0	0	913	115Y	0	0	0
767	103Y	0	0	0	914	116Y	0	0	0
768	104Y	0	1	2	915	117Y	0	0	0
769	105Y	1	0	1	916	118Y	1	0	1
770	106Y	1	0	1	917	119Y	1	0	1
771	107Y	1	0	1	918	120Y	0	0	0
772	108Y	0	0	0	919	121Y	1	1	3
773	109Y	0	0	0	920	122Y	0	0	0
774	110Y	0	0	0	921	123Y	0	0	0
775	111Y	1	0	1	922	124Y	0	0	0
776	112Y	0	0	0	923	125Y	0	0	0
777	113Y	1	0	1	924	126Y	0	0	0
778	114Y	0	0	0	925	127Y	1	0	1
779	189Y	1	0	1	926	128Y	0	0	0
780	190Y	0	0	0	927	129Y	0	0	0
781	191Y	0	0	0	928	130Y	1	0	1
782	192Y	1	0	1	929	131Y	1	0	1
783	193Y	1	0	1	930	132Y	1	0	1
784	194Y	0	0	0	931	88Y	0	1	2
785	195Y	0	0	0	932	133Y	0	0	0
786	196Y	1	1	3	933	134Y	1	0	1
787	197Y	0	1	2	934	135Y	1	0	1
788	198Y	1	0	1	935	136Y	1	0	1
789	199Y	0	0	0	936	137Y	1	0	1
790	200Y	0	0	0	937	138Y	1	1	3
791	201Y	1	1	3	938	139Y	0	0	0
792	202Y	0	0	0	939	140Y	0	0	0
793	203Y	1	0	1	940	141Y	1	0	1
794	204Y	0	0	0	941	142Y	0	0	0
942	143Y	1	0	1	1004	248Y	0	0	0
943	144Y	0	0	0	1005	249Y	0	1	2
944	145Y	1	0	1	1006	250Y	0	0	0
945	146Y	1	0	1	1007	251Y	0	0	0
946	147Y	0	0	0	1008	252Y	1	0	1
947	148Y	1	0	1	1009	253Y	0	0	0
948	149Y	0	0	0	1010	254Y	0	0	0

949	150Y	1	1	3	1011	255Y	1	0	1
950	151Y	0	1	2	1012	256Y	1	0	1
951	152Y	1	0	1	1013	257Y	0	0	0
952	153Y	0	1	2	1014	258Y	1	0	1
953	154Y	0	0	0	1015	259Y	1	0	1
954	155Y	1	0	1	1016	260Y	0	0	0
955	156Y	0	0	0	1017	261Y	0	0	0
956	157Y	1	0	1	1018	262Y	1	0	1
957	158Y	0	0	0	1019	263Y	0	0	0
958	159Y	1	0	1	1020	264Y	0	0	0
959	160Y	0	0	0	1021	265Y	1	0	1
960	161Y	0	0	0	1022	266Y	0	0	0
961	162Y	0	0	0	1023	267Y	0	0	0
962	163Y	1	0	1	1024	268y	0	0	0
963	164Y	1	0	1	1025	269y	1	0	1
964	165Y	1	1	3	1026	270Y	0	0	0
965	166Y	1	0	1	1027	271Y	0	1	2
966	167Y	0	0	0	1028	272Y	1	0	1
967	171Y	1	0	1	1029	273Y	0	0	0
968	172Y	1	1	3	1030	274Y	0	0	0
969	173Y	1	0	1	1031	275Y	1	1	3
970	174Y	1	0	1	1032	276Y	0	0	0
971	175Y	1	0	1	1033	277Y	0	0	0
972	176Y	1	0	1	1034	278Y	0	0	0
973	177Y	1	0	1	1035	279Y	1	0	1
974	178Y	0	0	0	1036	280Y	0	1	2
975	179Y	1	0	1	1037	281Y	0	0	0
976	180Y	1	0	1	1038	282Y	1	0	1
977	181Y	1	0	1	1039	283Y	1	1	3
978	182Y	1	0	1	1040	284Y	0	0	0
979	183Y	1	0	1	1041	285Y	1	0	1
980	184Y	0	0	0	1042	286Y	0	1	2
981	185Y	0	0	0	1043	287Y	1	0	1
982	186Y	1	0	1	1044	288Y	1	0	1
983	187Y	0	0	0	1045	289Y	1	0	1
984	188Y	0	0	0	1046	290Y	0	0	0
985	229Y	0	1	2	1047	291Y	1	0	1
986	230Y	0	0	0	1048	292Y			
987	231Y	1	0	1	1049	293Y	1	0	1
988	232Y	1	0	1	1050	294Y	1	0	1
989	233Y	0	0	0	1051	295Y	0	1	2
990	234Y	1	0	1	1052	296Y	1	0	1
991	235Y	1	0	1	1053	297Y	0	0	0
992	236Y	0	0	0	1054	298Y	0	0	0
993	237Y	1	0	1	1055	299Y	1	0	1
994	238Y	1	0	1	1056	300Y	0	1	2
995	239Y	0	0	0	1057	301Y	0	0	0
996	240Y	0	0	0	1058	302Y	1	0	1
997	241Y	0	1	2	1059	303Y	0	1	2
998	242Y	0	1	2	1060	304Y	1	0	1
999	243Y				1061	305Y	1	0	1

1000	244Y	1	0	1	1062	306Y	1	0	1
1001	245Y	1	0	1	1063	307Y	1	0	1
1002	246Y	1	0	1	1064	308Y	1	0	1
1003	247Y	1	0	1	1065	309Y	1	0	1
1066	310Y	1	0	1	1128	373Y	1	0	1
1067	311Y	1	0	1	1129	374Y	0	0	0
1068	312Y	1	0	1	1130	375Y	0	1	2
1069	313Y	1	0	1	1131	376Y	1	0	1
1070	314Y	1	0	1	1132	377Y	1	0	1
1071	315Y	1	0	1	1133	378Y	1	0	1
1072	316Y	0	1	2	1134	379Y	1	0	1
1073	317Y	1	0	1	1135	380Y	1	0	1
1074	318Y	1	0	1	1136	381Y	0	0	0
1075	320Y	1	1	3	1137	382Y	1	1	3
1076	321Y	1	0	1	1138	383Y	1	0	1
1077	322Y	1	1	3	1139	384Y	1	0	1
1078	323Y	1	0	1	1140	385Y	1	1	3
1079	324Y	0	1	2	1141	386Y	1	0	1
1080	325Y	1	0	1	1142	387Y	1	0	1
1081	326Y	0	1	2	1143	388Y	0	0	0
1082	327Y	0	1	2	1144	389Y	1	0	1
1083	328Y	1	0	1	1145	390Y	0	0	0
1084	329Y	0	0	0	1146	391Y	1	0	1
1085	330Y	0	0	0	1147	118	1	0	1
1086	331Y	0	0	0	1148	319Y	0	0	0
1087	332Y	0	0	0	1149	392Y	0	0	0
1088	333Y				1150	393Y	0	0	0
1089	334Y	0	0	0	100f	Fosamax	0	0	0
1090	335Y	1	0	1	101f	Fosamax	1	0	1
1091	336Y	1	1	3	102f	Fosamax	1	0	1
1092	337Y	0	0	0	103f	Fosamax	0	1	2
1093	338Y	0	0	0	106f	Fosamax	1	0	1
1094	339Y	0	1	2	108f	Fosamax	1	0	1
1095	340Y	1	1	3	109f	Fosamax	0	1	2
1096	341Y	0	0	0	110f	Fosamax	0	0	0
1097	342Y	0	0	0	111f	Fosamax	0	1	2
1098	343Y	0	0	0	112f	Fosamax	0	0	0
1099	344Y	0	0	0	113f	Fosamax	1	0	1
1100	345Y	0	0	0	114f	Fosamax	1	0	1
1101	346Y	1	0	1	115f	Fosamax	0	0	0
1102	347Y	0	0	0	117f	Fosamax	0	0	0
1103	348Y	1	1	3	118f	Fosamax	0	0	0
1104	349Y	0	0	0	119f	Fosamax	1	0	1
1105	350Y	0	0	0	120f	Fosamax	0	0	0
1106	351Y	0	0	0	121f	Fosamax	1	0	1
1107	352Y	1	0	1	122f	Fosamax	0	1	2
1108	353Y	0	0	0	123f	Fosamax	0	0	0
1109	354Y	1	0	1	124f	Fosamax	0	0	0
1110	355Y	1	0	1	125f	Fosamax	0	0	0
1111	356Y	0	0	0	126f	Fosamax	1	0	1
1112	357Y	1	0	1	129f	Fosamax	0	0	0

1113	358Y	1	0	1	130f	Fosamax	0	0	0
1114	359Y	1	0	1	131f	Fosamax	1	1	3
1115	360Y	1	1	3	134f	Fosamax	1	0	1
1116	361Y	0	0	0	135f	Fosamax	1	0	1
1117	362Y	0	1	2	136f	Fosamax	0	1	2
1118	363Y	0	0	0	137f	Fosamax	0	1	2
1119	364Y	0	1	2	138f	Fosamax	0	0	0
1120	365Y	1	0	1	139f	Fosamax	1	0	1
1121	366Y	1	0	1	140f	Fosamax	0	0	0
1122	367Y	0	1	2	141f	Fosamax	1	0	1
1123	368Y	0	0	0	142f	Fosamax	1	0	1
1124	369Y	0	0	0	146f	Fosamax	1	0	1
1125	370Y	1	0	1	148f	Fosamax	0	0	0
1126	371Y	0	0	0	149f	Fosamax	1	0	1
1127	372Y	0	1	2	155f	Fosamax	1	0	1
156f	Fosamax	0	0	0	1052Z	ZIT	1	0	1
158f	Fosamax	0	0	0	1053Z	ZIT	0	0	0
159f	Fosamax	0	0	0	1054Z	ZIT	1	0	1
160f	Fosamax	0	0	0	1055Z	ZIT	0	0	0
161f	Fosamax	0	0	0	1056Z	ZIT	1	0	1
163f	Fosamax	1	0	1	1057Z	ZIT	1	0	1
167f	Fosamax	1	0	1	1058Z	ZIT	0	0	0
168f	Fosamax	1	0	1	1059Z	ZIT	1	0	1
169f	Fosamax	0	0	0	1060Z	ZIT	1	0	1
170f	Fosamax	0	0	0	1061Z	ZIT	1	0	1
171f	Fosamax				1062Z	ZIT	0	0	0
174f	Fosamax	1	0	1	1064Z	ZIT	0	0	0
175f	Fosamax	1	0	1	1065Z	ZIT	1	1	3
176f	Fosamax	1	0	1	1066Z	ZIT	1	1	3
93f	Fosamax	0	0	0	1067Z	ZIT	1	0	1
94f	Fosamax	1	0	1	1068Z	ZIT	1	0	1
95f	Fosamax	0	0	0	1069Z	ZIT	0	0	0
96f	Fosamax	1	0	1	1070Z	ZIT	0	1	2
97f	Fosamax	0	0	0	1071Z	ZIT	0	0	0
98f	Fosamax	1	0	1	1072Z	ZIT	0	0	0
99f	Fosamax	0	0	0	1074Z	ZIT	0	0	0
1002Z	ZIT	0	1	2	1075Z	ZIT	1	0	1
1003Z	ZIT	0	0	0	1076Z	ZIT	1	0	1
1004Z	ZIT	1	0	1	1077Z	ZIT	1	0	1
1005Z	ZIT	1	0	1	1078Z	ZIT	0	0	0
1006Z	ZIT	0	0	0	1079Z	ZIT	1	1	3
1007Z	ZIT	0	0	0	1081Z	ZIT	1	0	1
1008Z	ZIT	0	0	0	1082Z	ZIT	0	0	0
1009Z	ZIT	1	1	3	1083Z	ZIT	1	1	3
1010Z	ZIT	0	0	0	1085Z	ZIT	0	1	2
1011Z	ZIT	1	0	1	1087Z	ZIT	0	0	0
1012Z	ZIT	1	1	3	1088Z	ZIT	0	0	0
1021Z	ZIT	0	0	0	1089Z	ZIT	0	1	2
1028Z	ZIT	1	0	1	1090Z	ZIT	1	0	1
1030Z	ZIT	0	0	0	1091Z	ZIT	0	0	0
1031Z	ZIT	0	1	2	1092Z	ZIT	0	0	0

1032Z	ZIT	0	0	0	1093Z	ZIT	0	0	0
1033Z	ZIT	0	0	0	1094Z	ZIT	0	0	0
1034Z	ZIT	1	1	3	1095Z	ZIT	0	0	0
1035Z	ZIT	0	1	2	1097Z	ZIT			
1036Z	ZIT	1	1	3	1098Z	ZIT	0	0	0
1037Z	ZIT	1	1	3	1100Z	ZIT	1	0	1
1038Z	ZIT	0	0	0	1101Z	ZIT	1	0	1
1039Z	ZIT	0	0	0	1102Z	ZIT	1	0	1
1040Z	ZIT	1	0	1	1103Z	ZIT	0	0	0
1041Z	ZIT	1	0	1	1104Z	ZIT	1	0	1
1042Z	ZIT	1	0	1	1105Z	ZIT	1	0	1
1043Z	ZIT	0	0	0	1106Z	ZIT	0	0	0
1045Z	ZIT	1	0	1	1107Z	ZIT	1	0	1
1049Z	ZIT	0	1	2	1108Z	ZIT	1	0	1
1051Z	ZIT	1	0	1	1110Z	ZIT	0	1	2

7.2 Priloga 2: Rezultati statistične analize

7.2.1 Vsi preiskovanci

Preglednica XV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri vseh preiskovancih.

Spremenljivka	N	X±SD	minimum	maksimum
starost	673	62,23 ± 9,534	38,00	99,00
višina	694	162,3 ± 7,390	137,0	188,0
masa	695	71,33 ± 13,13	46,00	130,0
ITM	616	27,09 ± 4,452	18,70	44,90
BMDfn	657	0,723 ± 0,135	0,366	1,290
BMDtot	654	0,875 ± 0,160	0,472	1,673
BMDls	694	0,903 ± 0,180	0,457	1,567
pOC	291	18,76 ± 11,43	1,200	60,30
sCTX	243	3561 ± 2011	77,00	10800
sBALP	216	11,23 ± 5,070	0,00	31,80
RANKL	256	0,370 ± 0,462	0,00	3,670
OPG	235	4,958 ± 1,674	0,100	10,50

*Preglednica XVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTMI*0/GSTMI*0 in GSTTI*0/GSTTI*0 ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih. (0 označuje odsotnost genotipa, 1 označuje prisotnost genotipa; BMDfn – MKG vratu stegenice, BMDtot – MKG kolka, t_tot – t-vrednost izračunana na podlagi BMDtot, OC – osteokalcin, CTX – C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, BMDls – MKG ledvenih vretenc, t_ls – t-vrednost izračunana na podlagi BMDls)*

Spremenljivka	X±SD				p	
	GSTMI*0/GSTMI*0		GSTTI*0/GSTTI*0		GSTMI*0	GSTTI*0
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,341 ± 0,184	0,342 ± 0,181	-0,348 ± 0,181	-0,310 ± 0,185	0,967	0,035
lnBMDtot	-0,151 ± 0,177	-0,148 ± 0,180	-0,156 ± 0,178	-0,123 ± 0,182	0,803	0,065
t_tot	-0,615 ± 1,129	-0,570 ± 1,095	-0,626 ± 1,106	-0,455 ± 1,123	0,644	0,151
lnpOC	2,754 ± 0,658	2,733 ± 0,634	2,766 ± 0,667	2,648 ± 0,537	0,073	0,218
sCTX	3723 ± 2035	3417 ± 1986	3486 ± 1993	3802 ± 2066	0,236	0,302
sBALP	11,80 ± 5,237	10,71 ± 4,895	11,07 ± 5,04	11,96 ± 5,234	0,114	0,324
lnBMDls	-0,116 ± 0,200	-0,110 ± 0,194	-0,113 ± 0,195	-0,112 ± 0,206	0,668	0,951

t_ls	-1,078 ± 1,597	-1,320 ± 1,370	-1,229 ± 1,453	-1,099 ± 1,624	0,050	0,397
------	----------------	----------------	----------------	----------------	-------	-------

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih.

Spremenljivka	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,342 ± 0,180	-0,354 ± 0,182	-0,336 ± 0,202	-0,283 ± 0,163	0,054
lnBMDtot	-0,156 ± 0,176	-0,156 ± 0,179	-0,134 ± 0,183	-0,111 ± 0,183	0,274
t_tot	-0,631 ± 1,131	-0,622 ± 1,084	-0,548 ± 1,129	-0,367 ± 1,122	0,424
lnpOC	2,763 ± 0,694	2,769 ± 0,646	2,725 ± 0,533	2,537 ± 0,534	0,446
sCTX	3667 ± 2092	3335 ± 1905	3889 ± 1886	3711 ± 2269	0,489
sBALP	11,38 ± 5,049	10,79 ± 5,032	13,56 ± 5,772	10,29 ± 4,106	0,130
lnBMDls	-0,119 ± 0,195	-0,108 ± 0,196	-0,105 ± 0,225	-0,119 ± 0,184	0,892
t_ls	-1,096 ± 1,531	-1,357 ± 1,365	-1,001 ± 1,866	-1,181 ± 1,393	0,194

Preglednica XVIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* pri vseh preiskovancih.

Spremenljivka	test	kombinacija I ↔ kombinacija II	p
lnBMDfn	LSD	0 ↔ 3	0,023
		1 ↔ 3	0,006
	Bonferroni	1 ↔ 3	0,035
sBALP	LSD	1 ↔ 2	0,027
		2 ↔ 3	0,044

Preglednica XIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,328 ± 0,181	-0,333 ± 0,181	-0,339 ± 0,181	-0,293 ± 0,178	0,260	0,020
lnBMDtot	-0,142 ± 0,175	-0,141 ± 0,183	-0,148 ± 0,178	-0,110 ± 0,182	0,634	0,025
t_tot	-0,574 ± 1,105	-0,516 ± 1,092	-0,581 ± 1,090	-0,398 ± 1,124	0,811	0,068
lnpOC	2,765 ± 0,659	2,724 ± 0,634	2,766 ± 0,669	2,650 ± 0,529	0,817	0,283
sCTX	3581 ± 2009	3088 ± 1880	3212 ± 1909	3627 ± 2066	0,114	0,239
sBALP	11,89 ± 5,284	10,71 ± 4,880	11,14 ± 5,067	11,85 ± 5,263	0,085	0,191
lnBMDls	-0,092 ± 0,193	-0,088 ± 0,186	0,092 ± 0,187	-0,079 ± 0,199	0,915	0,526
t_ls	-0,901 ± 1,521	-1,127 ± 1,312	-1,069 ± 1,390	-0,821 ± 1,518	0,021	0,117

Preglednica XX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,332 ± 0,179	-0,346 ± 0,183	-0,313 ± 0,191	-0,273 ± 0,165	0,067
lnBMDtot	0,148 ± 0,176	-0,148 ± 0,180	-0,112 ± 0,172	-0,107 ± 0,193	0,154
t_tot	-0,601 ± 1,115	-0,562 ± 1,068	-0,464 ± 1,071	-0,337 ± 1,178	0,331
lnpOC	2,774 ± 0,698	0,2760 ± 0,647	2,737 ± 0,518	2,537 ± 0,534	0,689
sCTX	3507 ± 2024	2982 ± 1795	3778 ± 2006	3468 ± 2166	0,298
sBALP	11,52 ± 5,096	10,80 ± 5,046	13,43 ± 5,902	10,28 ± 4,106	0,145

lnBMDls	-0,097 ± 0,184	-0,088 ± 0,190	-0,068 ± 0,228	-0,089 ± 0,167	0,768
t_ls	-0,958 ± 1,466	-1,174 ± 1,310	-0,662 ± 1,730	-0,954 ± 1,317	0,044

Preglednica XXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovancih (*t_fn* – *t*-vrednost izračunana na podlagi MKG vratu stegenice; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, OPG – osteoprotegerin)

Spremenljivka	X±SD	p
	kombinacija	
t_fn	-1,310 ± 1,147	0,060
RANKL	0,370 ± 0,462	0,060
sOPG	4,958 ± 1,674	0,259

7.2.2 Vse preiskovanke

Preglednica XXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri vseh preiskovankah.

Spremenljivka	N	X±SD	minimum	maksimum
starost	546	61,23 ± 9,877	38	99
višina	551	160,4 ± 6,265	137	181
masa	552	69,35 ± 12,17	46	115
ITM	551	26,99 ± 4,632	18,34	44,92
BMDfn	535	0,703 ± 0,124	0,366	1,278
BMDtot	531	0,844 ± 0,141	0,472	1,610
BMDls	532	0,873 ± 0,166	0,457	1,567
pOC	211	18,72 ± 11,90	1,200	60,30
sCTX	220	3731 ± 2021	77	10800
sBALP	216	11,26 ± 5,005	0,00	31,80
RANKL	227	0,398 ± 0,490	0,000	3,670
OPG	266	149,3 ± 186,5	0,100	1386

Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah. (BMDls – MKG ledvenih vretenc, *t_fn* – *t*-vrednost izračunana na podlagi BMDfn, *t_ls* – *t*-vrednost izračunana na podlagi BMDls)

Spremenljivka	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
BMDfn	0,701 ± 0,124	0,706 ± 0,123	0,701 ± 0,124	0,715 ± 0,119	0,657	0,321
t_fn	-1,394 ± 1,121	-1,295 ± 1,146	-1,372 ± 1,142	-1,222 ± 1,102	0,730	0,278
BMDtot	0,838 ± 0,135	0,849 ± 0,146	0,841 ± 0,142	0,854 ± 0,137	0,385	0,425
t_tot	-0,764 ± 1,073	-0,632 ± 1,090	-0,699 ± 1,085	-0,674 ± 1,080	0,215	0,850
lnBMDls	-0,147 ± 0,191	-0,160 ± 0,182	-0,161 ± 0,185	-0,121 ± 0,193	0,421	0,062
t_ls	-1,316 ± 1,516	-1,416 ± 1,351	-1,398 ± 1,410	-1,247 ± 1,515	0,476	0,389
lnpOC	2,730 ± 0,677	2,751 ± 0,625	2,764 ± 0,684	2,646 ± 0,465	0,822	0,305
CTX	3879 ± 2034	3592 ± 2016	3643 ± 2001	4037 ± 2100	0,298	0,236

Preglednica XXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.

Spremenljivka	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	

BMDfn	0,705 ± 0,126	0,697 ± 0,122	0,684 ± 0,113	0,745 ± 0,119	0,064
t_fn	-1,367 ± 1,130	-1,376 ± 1,155	-1,503 ± 1,094	-0,984 ± 1,063	0,132
BMDtot	0,839 ± 0,137	0,843 ± 0,145	0,834 ± 0,123	0,874 ± 0,147	0,448
t_tot	-0,750 ± 1,086	-0,653 ± 1,086	-0,822 ± 1,030	-0,548 ± 1,117	0,571
lnBMDls	-0,149 ± 0,187	-0,171 ± 0,182	-0,136 ± 0,212	-0,106 ± 0,174	0,133
t_ls	-1,321 ± 1,460	-1,469 ± 1,364	-1,294 ± 1,750	-1,205 ± 1,290	0,636
lnpOC	2,715 ± 0,738	2,804 ± 0,638	2,788 ± 0,380	2,505 ± 0,507	0,291
CTX	3754 ± 2075	3540 ± 1936	4323 ± 1859	3774 ± 2306	0,433

Preglednica XXV: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* pri vseh preiskovankah.

Spremenljivka	test	kombinacija I ↔ kombinacija II	p
BMDfn	LSD	0 ↔ 3	0,041
		1 ↔ 3	0,015
		2 ↔ 3	0,015
t_fn	Bonferroni	0 ↔ 3	0,044
		1 ↔ 3	0,037
		2 ↔ 3	0,035

Preglednica XXVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
BMDfn	0,702 ± 0,124	0,706 ± 0,123	0,701 ± 0,125	0,717 ± 0,118	0,608	0,217
t_fn	-1,394 ± 1,121	-1,294 ± 1,148	-1,372 ± 1,143	-1,222 ± 1,102	0,920	0,123
BMDtot	0,840 ± 0,134	0,849 ± 0,146	0,842 ± 0,142	0,857 ± 0,132	0,927	0,115
t_tot	-0,764 ± 1,074	-0,631 ± 1,093	-0,699 ± 1,087	-0,674 ± 1,080	0,691	0,442
lnBMDls	-0,145 ± 0,193	-0,159 ± 0,183	-0,160 ± 0,185	-0,120 ± 0,194	0,132	0,043
t_ls	-1,316 ± 1,516	-1,410 ± 1,351	-1,394 ± 1,410	-1,247 ± 1,515	0,146	0,305
lnpOC	2,720 ± 0,684	2,745 ± 0,625	2,759 ± 0,689	2,625 ± 0,451	0,424	0,325
CTX	3879 ± 2034	3604 ± 2020	3651 ± 2003	4036 ± 2100	0,487	0,237

Preglednica XXVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,706 ± 0,127	0,700 ± 0,123	0,687 ± 0,111	0,745 ± 0,119	0,142
t_fn	-1,367 ± 1,130	-1,376 ± 1,159	-1,503 ± 1,094	-0,984 ± 1,063	0,170
BMDtot	0,840 ± 0,138	0,844 ± 0,146	0,838 ± 0,120	0,874 ± 0,147	0,382
t_tot	-0,750 ± 1,086	-0,653 ± 1,089	-0,822 ± 1,030	-0,548 ± 1,117	0,847
lnBMDls	-0,148 ± 0,188	-0,170 ± 0,183	-0,135 ± 0,214	-0,106 ± 0,174	0,080
t_ls	-1,231 ± 1,460	-1,462 ± 1,365	-1,294 ± 1,750	-1,206 ± 1,290	0,358
lnpOC	2,711 ± 0,750	2,798 ± 0,638	2,752 ± 0,354	2,505 ± 0,506	0,539
CTX	3753 ± 2074	3555 ± 1941	4322 ± 1859	4322 ± 1859	0,572

Preglednica XXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri vseh preiskovankah.

Spremenljivka	X±SD	p
---------------	------	---

	<i>kombinacija</i>	
RANKL	0,398 ± 0,489	0,218
sBALP	11,26 ± 5,005	0,229
sOPG	149,3 ± 186,4	0,167

7.2.3 Pomenopavzalne preiskovanke

Preglednica XXIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri pomenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	N	X±SD	minimum	maksimum
starost	471	63,12 ± 8,533	42	99
višina	475	159,9 ± 6,136	137	181
masa	476	69,72 ± 12,18	46	115
ITM	475	27,29 ± 4,608	18,34	44,92
BMDfn	474	0,693 ± 0,125	0,366	1,278
BMDtot	474	0,834 ± 0,143	0,472	1,610
BMDls	472	0,857 ± 0,164	0,457	1,567
pOC	152	21,84 ± 12,41	1,200	60,30
sCTX	163	4096 ± 2090	77,00	10800
sBALP	158	12,36 ± 5,134	0,00	31,80
RANKL	166	0,367 ± 0,508	0,00	3,67
OPG	209	104,0 ± 183,8	0,100	1386

Preglednica XXX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,384 ± 0,173	-0,379 ± 0,176	-0,382 ± 0,177	-0,379 ± 0,164	0,750	0,893
t_fn	-1,493 ± 1,143	-1,400 ± 1,173	-1,451 ± 1,173	-1,413 ± 1,101	0,445	0,803
lnBMDtot	-0,200 ± 0,159	-0,189 ± 0,176	-0,196 ± 0,168	-0,188 ± 0,167	0,477	0,700
ln_t_tot	-0,432 ± 0,961	-0,470 ± 0,897	-0,478 ± 0,919	-0,336 ± 0,937	0,863	0,627
lnBMDls	-0,164 ± 0,193	-0,179 ± 0,180	-0,177 ± 0,184	-0,149 ± 0,195	0,375	0,222
t_ls	-1,418 ± 1,572	-1,555 ± 1,347	-1,502 ± 1,436	-1,437 ± 1,560	0,377	0,739
lnpOC	2,886 ± 0,692	2,942 ± 0,596	2,934 ± 0,673	2,828 ± 0,443	0,601	0,452
CTX	4238 ± 2048	3945 ± 2147	3978 ± 2054	4506 ± 2235	0,379	0,193
sBALP	13,304 ± 5,195	11,50 ± 5,011	12,09 ± 5,073	13,783 ± 5,514	0,029	0,139

Preglednica XXXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	X±SD				p
	<i>kombinacija</i>				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,375 ± 0,176	-0,388 ± 0,178	-0,423 ± 0,155	-0,332 ± 0,162	0,120
t_fn	-1,446 ± 1,167	-1,457 ± 1,182	-1,692 ± 1,030	-1,157 ± 1,117	0,292
lnBMDtot	-0,198 ± 0,163	-0,194 ± 0,174	-0,211 ± 0,146	-0,164 ± 0,185	0,625
ln_t_tot	-0,377 ± 0,971	-0,546 ± 0,889	-0,707 ± 0,962	-0,071 ± 0,891	0,551
lnBMDls	-0,166 ± 0,187	-0,187 ± 0,181	-0,156 ± 0,219	-0,141 ± 0,168	0,425
t_ls	-1,421 ± 1,501	-1,576 ± 1,375	-1,407 ± 1,865	-1,465 ± 1,233	0,815
lnpOC	2,875 ± 0,760	2,980 ± 0,597	2,929 ± 0,316	2,699 ± 0,555	0,538

CTX	4095 ± 2100	3867 ± 2018	4723 ± 1832	4263 ± 2658	0,483
sBALP	12,82 ± 4,981	11,47 ± 5,100	15,520 ± 5,788	11,73 ± 4,600	0,052

Preglednica XXXII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* pri pomenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	test	kombinacija I ↔ kombinacija II	p
lnBMDfn	LSD	2 ↔ 3	0,021
sBALP	LSD	1 ↔ 2	0,009

Preglednica XXXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,382 ± 0,173	-0,379 ± 0,177	-0,382 ± 0,178	-0,375 ± 0,162	0,635	0,377
t_fn	-1,493 ± 0,143	-1,399 ± 1,176	-1,451 ± 1,175	-1,413 ± 1,101	0,895	0,275
lnBMDtot	-0,199 ± 0,159	-0,189 ± 0,176	-0,1955 ± 0,169	-0,185 ± 0,165	0,995	0,163
Int_tot	-0,432 ± 0,961	-0,470 ± 0,897	-0,478 ± 0,919	-0,336 ± 0,937	0,745	0,970
lnBMDls	-0,163 ± 0,195	-0,179 ± 0,180	-0,176 ± 0,185	-0,148 ± 0,196	0,145	0,096
t_ls	-1,418 ± 1,572	-1,549 ± 1,348	-1,498 ± 1,437	-1,437 ± 1,560	0,129	0,458
lnpOC	2,881 ± 0,705	2,938 ± 0,596	2,935 ± 0,680	2,801 ± 0,431	0,336	0,247
CTX	4238 ± 2049	3968 ± 2151	3992 ± 2055	4507 ± 2235	0,515	0,260
sBALP	13,39 ± 5,182	11,55 ± 5,053	12,16 ± 5,097	13,78 ± 5,514	0,020	0,124

Preglednica XXXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,375 ± 0,177	-0,388 ± 0,179	-0,417 ± 0,153	-0,332 ± 0,162	0,137
t_fn	-1,446 ± 1,167	-1,456 ± 1,186	-1,692 ± 1,030	-1,157 ± 1,117	0,261
lnBMDtot	-0,197 ± 0,163	-0,194 ± 0,175	-0,205 ± 0,142	-0,164 ± 0,185	0,439
Int_tot	-0,377 ± 0,971	-0,546 ± 0,889	-0,707 ± 0,962	-0,071 ± 0,891	0,588
lnBMDls	-0,165 ± 0,189	-0,186 ± 0,182	-0,155 ± 0,221	-0,141 ± 0,168	0,169
t_ls	-1,421 ± 1,501	-1,568 ± 1,376	-1,407 ± 1,865	-1,465 ± 1,232	0,415
lnpOC	2,880 ± 0,777	2,978 ± 0,597	2,887 ± 0,286	2,699 ± 0,555	0,337
CTX	4096 ± 2101	3894 ± 2023	4723 ± 1832	4263 ± 2659	0,546
sBALP	12,92 ± 4,970	11,51 ± 5,150	15,52 ± 5,788	11,73 ± 4,600	0,040

Preglednica XXXV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	X±SD	p
	kombinacija	
RANKL	0,367 ± 0,508	0,467
sOPG	104,0 ± 183,8	0,347

7.2.4 Premenopavzalne preiskovanke

Preglednica XXXVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri premenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	N	X \pm SD	minimum	maksimum
starost	57	45,35 \pm 4,646	38	54
višina	57	163,8 \pm 6,192	150	177
masa	57	65,37 \pm 11,79	48	103
ITM	57	24,34 \pm 4,094	18,91	41,23
BMDfn	57	0,782 \pm 0,078	0,604	1,001
BMDtot	56	0,921 \pm 0,092	0,681	1,168
BMDls	57	1,006 \pm 0,115	0,781	1,321
pOC	57	10,63 \pm 4,636	4,500	29,20
sCTX	56	2679 \pm 1366	496,0	7909
sBALP	57	8,188 \pm 3,034	3,450	15,80
RANKL	57	0,491 \pm 0,440	0,200	2,900
OPG	57	315,7 \pm 56,14	190,5	498,0

Preglednica XXXVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	X \pm SD				P	
	GSTM1*0/GSTM1*0		GSTT1*0/GSTT1*0		GSTM1*0	GSTT1*0
	0	1	0	1		
BMDfn	0,773 \pm 0,072	0,785 \pm 0,081	0,767 \pm 0,077	0,816 \pm 0,064	0,581	0,037
t_fn	-0,820 \pm 0,661	-0,719 \pm 0,754	-0,855 \pm 0,727	-0,493 \pm 0,598	0,602	0,099
BMDtot	0,919 \pm 0,092	0,914 \pm 0,083	0,909 \pm 0,090	0,942 \pm 0,069	0,846	0,231
t_tot	-0,280 \pm 0,704	-0,320 \pm 0,687	-0,352 \pm 0,728	-0,138 \pm 0,530	0,832	0,332
BMDls	1,006 \pm 0,087	0,995 \pm 0,124	0,991 \pm 0,109	1,027 \pm 0,104	0,711	0,290
t_ls	-0,625 \pm 0,829	-0,622 \pm 1,082	-0,693 \pm 0,980	-0,414 \pm 0,938	0,992	0,356
pOC	10,98 \pm 5,211	10,45 \pm 4,237	10,65 \pm 5,057	10,786 \pm 3,349	0,671	0,927
CTX	2746 \pm 1534	2652 \pm 1250	2625 \pm 1454	2895 \pm 1129	0,804	0,531
sBALP	7,818 \pm 2,805	8,529 \pm 3,260	8,174 \pm 3,291	8,324 \pm 2,324	0,392	0,876
sOPG	313,7 \pm 49,20	318,0 \pm 62,62	316,8 \pm 57,46	314,0 \pm 55,86	0,777	0,870

Preglednica XXXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	X \pm SD				P
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,766 \pm 0,072	0,769 \pm 0,082	0,803 \pm 0,067	0,823 \pm 0,065	0,209
t_fn	-0,845 \pm 0,666	-0,864 \pm 0,794	-0,720 \pm 0,709	-0,367 \pm 0,529	0,322
BMDtot	0,909 \pm 0,096	0,909 \pm 0,087	0,961 \pm 0,065	0,930 \pm 0,073	0,616
t_tot	-0,345 \pm 0,738	-0,359 \pm 0,737	-0,020 \pm 0,526	-0,213 \pm 0,554	0,762
BMDls	1,011 \pm 0,092	0,973 \pm 0,122	0,984 \pm 0,070	1,050 \pm 0,116	0,304
t_ls	-0,580 \pm 0,873	-0,796 \pm 1,078	-0,804 \pm 0,673	-0,198 \pm 1,028	0,459
pOC	10,730 \pm 5,547	10,582 \pm 4,698	12,00 \pm 3,895	10,11 \pm 3,035	0,913
CTX	2712 \pm 1633	2544 \pm 1297	2881 \pm 1193	2904 \pm 1166	0,912
sBALP	7,705 \pm 2,851	8,600 \pm 3,660	8,270 \pm 2,874	8,353 \pm 2,155	0,827
sOPG	309,8 \pm 43,61	323,3 \pm 68,07	329,4 \pm 71,45	305,3 \pm 47,80	0,762

Preglednica XXXIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p	
	GSTM1*0/GSTM1*0		GSTT1*0/GSTT1*0		GSTM1*0	GSTT1*0
	0	1	0	1		
BMDfn	0,7732±0,072	0,785 ± 0,081	0,767 ± 0,077	0,816 ± 0,064	0,629	0,048
t_fn	-0,820 ± 0,661	-0,719 ± 0,754	-0,855 ± 0,727	-0,429 ± 0,598	0,672	0,126
BMDtot	0,9190±0,092	0,914 ± 0,083	0,909 ± 0,090	0,942 ± 0,069	0,738	0,272
t_tot	-0,280 ± 0,704	-0,322 ± 0,687	-0,352 ± 0,728	-0,139 ± 0,530	0,718	0,386
BMDls	1,006 ± 0,870	0,995 ± 0,124	0,991 ± 0,109	1,027 ± 0,104	0,592	0,332
t_ls	-0,625 ± 0,830	-0,622 ± 1,082	-0,693 ± 0,98	-0,414 ± 0,938	0,849	0,404
pOC	10,98 ± 5,211	10,45 ± 4,237	10,65 ± 5,057	10,79 ± 3,349	0,737	0,890
CTX	2746 ± 1534	2652 ± 1250	2626 ± 1454	2896 ± 1129	0,767	0,554
sBALP	7,818 ± 2,805	8,529 ± 3,260	8,174 ± 3,291	8,323 ± 2,324	0,324	0,877
sOPG	313,7 ± 49,20	318,0 ± 62,62	316,8 ± 57,46	313,9 ± 55,86	0,795	0,925

Preglednica XL: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,766 ± 0,072	0,769 ± 0,082	0,803 ± 0,067	0,823 ± 0,064	0,248
t_fn	-0,845 ± 0,666	-0,834 ± 0,794	-0,720 ± 0,709	-0,367 ± 0,529	0,374
BMDtot	0,907 ± 0,096	0,909 ± 0,086	0,961 ± 0,065	0,929 ± 0,073	0,643
t_tot	-0,345 ± 0,738	-0,359 ± 0,737	-0,020 ± 0,526	-0,213 ± 0,554	0,780
BMDls	1,011 ± 0,091	0,973 ± 0,122	0,984 ± 0,070	1,050 ± 0,116	0,361
t_ls	-0,580 ± 0,873	-0,796 ± 1,078	-0,804 ± 0,673	-0,198 ± 1,028	0,559
pOC	10,73 ± 5,547	10,58 ± 4,698	12,00 ± 3,895	10,11 ± 3,034	0,941
CTX	2712 ± 1633	2544 ± 1297	2880 ± 1193	2904 ± 1166	0,920
sBALP	7,705 ± 2,851	8,600 ± 3,660	8,270 ± 2,874	8,353 ± 2,155	0,802
sOPG	309,8 ± 43,61	323,3 ± 68,07	329,4 ± 71,45	305,3 ± 47,80	0,703

Preglednica XLI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov GSTM1*0/GSTM1*0 in GSTT1*0/GSTT1*0 ter rezultati statistične obdelave pri premenopavzalnih preiskovankah.

Spremenljivka	X±SD	p
	kombinacija	
RANKL	0,491 ± 0,440	0,346

7.2.5 Moški preiskovanci

Preglednica XLII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri moških preiskovancih.

Spremenljivka	N	X±SD	minimum	maksimum
starost	117	67,58 ± 6,075	55	84
višina	117	171,1 ± 5,914	159	188
masa	117	81,70 ± 12,77	55	130
ITM	117	27,85 ± 3,767	19,6	43,4
BMDfn	90	0,813 ± 0,159	0,517	1,290
BMDtot	90	1,025 ± 0,165	0,637	1,673
BMDls	116	1,057 ± 0,176	0,666	1,525
pOC	25	9,548 ± 5,171	2,100	24,3
sCTX	20	2004 ± 1087	581	4571
RANKL	25	0,180 ± 0,112	0,00	0,400

OPG	25	5,464 ± 1,539	3,480	9,24
-----	----	---------------	-------	------

Preglednica XLIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri moških preiskovancih.

Spremenljivka	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
BMDfn	0,821 ± 0,161	0,802 ± 0,159	0,795 ± 0,156	0,873 ± 0,160	0,569	0,053
t_fn	-1,113 ± 1,180	-1,307 ± 1,172	-1,318 ± 1,160	-0,796 ± 1,159	0,440	0,080
BMDtot	1,021 ± 0,159	1,030 ± 0,176	1,010 ± 0,174	1,077 ± 0,125	0,803	0,115
t_tot	-0,174 ± 1,076	-0,333 ± 1,076	-0,365 ± 1,107	0,167 ± 0,846	0,489	0,051
BMDls	1,075 ± 0,194	1,035 ± 0,153	1,048 ± 0,167	1,092 ± 0,214	0,234	0,293
t_ls	-0,238 ± 1,661	-0,683 ± 1,251	-0,501 ± 1,410	-0,182 ± 1,840	0,113	0,364
RANKL	0,144 ± 0,113	0,207 ± 0,110	0,182 ± 0,101	0,186 ± 0,146	0,198	0,949
pOC	9,067 ± 3,861	10,07 ± 6,002	9,971 ± 5,409	9,014 ± 5,110	0,660	0,693
sCTX	2315 ± 1319	1870 ± 996,7	2036 ± 1211	1929 ± 816,0	0,417	0,848
sOPG	5,707 ± 2,050	5,374 ± 1,250	5,145 ± 1,052	6,359 ± 2,277	0,624	0,083

Preglednica XLIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri moških preiskovancih.

Spremenljivka	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,802 ± 0,156	0,786 ± 0,159	0,880 ± 0,170	0,863 ± 0,153	0,270
t_fn	-1,216 ± 1,149	-1,435 ± 1,180	-0,795 ± 1,268	-0,796 ± 1,058	0,303
BMDtot	1,005 ± 0,166	1,016 ± 0,186	1,071 ± 0,130	1,085 ± 0,126	0,463
t_tot	-0,263 ± 1,131	-0,482 ± 1,083	0,102 ± 0,867	0,264 ± 0,861	0,202
BMDls	1,063 ± 0,187	1,030 ± 0,138	1,119 ± 0,220	1,056 ± 0,212	0,457
t_ls	-0,297 ± 1,583	-0,749 ± 1,135	-0,007 ± 1,990	-0,410 ± 1,700	0,348
RANKL	0,150 ± 0,100	0,192 ± 0,104	0,140 ± 0,134	0,300 ± 0,141	0,366
pOC	9,225 ± 2,496	10,20 ± 6,099	8,940 ± 5,010	9,200 ± 7,495	0,970
sCTX	2889 ± 2379	1893 ± 1031	2028 ± 825,9	1732 ± 1080	0,699
sOPG	4,918 ± 1,023	5,215 ± 1,091	6,338 ± 2,549	6,410 ± 2,263	0,396

Preglednica XLV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri moških preiskovancih.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
BMDfn	0,8211 ± 0,161	0,802 ± 0,159	0,795 ± 0,156	0,873 ± 0,160	0,526	0,199
t_fn	-1,113 ± 1,180	-1,307 ± 1,172	-1,318 ± 1,160	-0,796 ± 1,159	0,410	0,246
BMDtot	1,021 ± 0,159	1,030 ± 0,176	1,010 ± 0,174	1,077 ± 0,125	0,784	0,322
t_tot	-0,174 ± 1,076	-0,333 ± 1,076	-0,365 ± 1,017	0,167 ± 0,846	0,478	0,194
BMDls	1,075 ± 0,194	1,035 ± 0,153	1,048 ± 0,167	1,092 ± 0,214	0,300	0,496
t_ls	-0,238 ± 1,661	-0,684 ± 1,251	-0,501 ± 1,410	-0,182 ± 1,840	0,153	0,549
RANKL	0,144 ± 0,113	0,207 ± 0,110	0,182 ± 0,101	0,186 ± 0,146	0,286	0,984
pOC	9,067 ± 3,861	10,07 ± 6,002	9,971 ± 5,409	9,014 ± 5,110	0,823	0,519
sCTX	2315 ± 1319	1870 ± 996,7	2036 ± 1211	1929 ± 816,0	0,437	0,850
sOPG	5,707 ± 2,050	5,374 ± 1,250	5,145 ± 1,051	6,359 ± 2,277	0,828	0,031

Preglednica XLVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri moških preiskovancih.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X \pm SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,802 \pm 0,156	0,786 \pm 0,159	0,880 \pm 0,170	0,863 \pm 0,153	0,544
t_fn	-1,216 \pm 1,149	-1,435 \pm 1,180	-0,795 \pm 1,268	-0,796 \pm 1,058	0,586
BMDtot	1,005 \pm 0,166	1,016 \pm 0,186	1,071 \pm 0,130	1,085 \pm 0,126	0,764
t_tot	-0,263 \pm 1,131	-0,482 \pm 1,083	0,102 \pm 0,867	0,264 \pm 0,861	0,518
BMDls	1,063 \pm 0,187	1,030 \pm 0,138	1,119 \pm 0,220	1,056 \pm 0,212	0,642
t_ls	-0,297 \pm 1,583	-0,749 \pm 1,135	-0,007 \pm 1,990	-0,410 \pm 1,700	0,495
RANKL	0,150 \pm 0,100	0,192 \pm 0,104	0,140 \pm 0,134	0,300 \pm 0,141	0,553
pOC	9,225 \pm 2,496	10,20 \pm 6,100	8,940 \pm 5,010	9,200 \pm 7,495	0,866
sCTX	2888 \pm 2379	1893 \pm 1031	2028 \pm 825,9	1732 \pm 1080	0,699
sOPG	4,918 \pm 1,023	5,215 \pm 1,091	6,338 \pm 2,549	6,410 \pm 2,623	0,083

7.2.6 Preiskovanci, oboleli za osteoporozo

Preglednica XLVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.

Spremenljivka	N	X \pm SD	minimum	maksimum
starost	249	64,79 \pm 8,128	47	91
višina	253	159,3 \pm 6,772	137	186
masa	254	66,49 \pm 10,21	46	105
ITM	253	26,22 \pm 3,785	18,34	40,51
BMDfn	250	0,624 \pm 0,081	0,366	0,884
BMDtot	249	0,762 \pm 0,115	0,472	1,673
BMDls	252	0,748 \pm 0,092	0,457	1,107
pOC	79	27,90 \pm 13,83	1,200	60,30
sCTX	64	4304 \pm 2335	77	10800
sBALP	115	12,56 \pm 5,515	0,000	31,80
RANKL	63	0,338 \pm 0,561	0,000	3,670
OPG	106	63,74 \pm 187,8	1,600	1386

Preglednica XLVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.

Spremenljivka	X \pm SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
BMDfn	0,623 \pm 0,076	0,627 \pm 0,086	0,627 \pm 0,083	0,617 \pm 0,073	0,713	0,517
t_fn	-2,430 \pm 0,668	-2,303 \pm 0,887	-2,365 \pm 0,803	-2,321 \pm 0,800	0,356	0,806
BMDtot	0,757 \pm 0,092	0,768 \pm 0,132	0,762 \pm 0,117	0,767 \pm 0,107	0,472	0,804
t_tot	-1,627 \pm 0,608	-1,466 \pm 0,865	-1,557 \pm 0,762	-1,438 \pm 0,791	0,222	0,491
BMDls	0,752 \pm 0,094	0,745 \pm 0,090	0,750 \pm 0,092	0,739 \pm 0,094	0,551	0,536
lnRANKL	-1,515 \pm 1,322	-1,247 \pm 0,756	-1,396 \pm 1,114	-1,241 \pm 0,686	0,401	0,725
pOC	26,88 \pm 13,84	28,75 \pm 13,93	28,60 \pm 14,15	22,41 \pm 10,04	0,554	0,208
CTX	4482 \pm 2346	4167 \pm 2351	4196 \pm 2352	4828 \pm 2288	0,596	0,418
sBALP	13,75 \pm 5,457	11,54 \pm 5,400	12,21 \pm 5,405	15,59 \pm 5,755	0,032	0,044

Preglednica XLIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.

Spremenljivka	X \pm SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,630 \pm 0,077	0,624 \pm 0,087	0,591 \pm 0,063	0,652 \pm 0,072	0,137
t_fn	-2,377 \pm 0,658	-2,357 \pm 0,897	-2,642 \pm 0,695	-2,000 \pm 0,793	0,270
BMDtot	0,758 \pm 0,092	0,766 \pm 0,133	0,755 \pm 0,093	0,784 \pm 0,124	0,831
t_tot	-1,626 \pm 0,558	-1,506 \pm 0,882	-1,631 \pm 0,809	-1,245 \pm 0,758	0,447
BMDIs	0,755 \pm 0,092	0,745 \pm 0,091	0,738 \pm 0,107	0,742 \pm 0,077	0,807
lnRANKL	-1,533 \pm 1,416	-1,273 \pm 0,768	-1,407 \pm 0,643	-1,116 \pm 0,786	0,851
pOC	27,62 \pm 14,49	29,39 \pm 14,01	22,32 \pm 8,386	22,53 \pm 13,22	0,606
CTX	4286 \pm 2524	4126 \pm 2253	5381 \pm 946,4	4367 \pm 3032	0,752
sBALP	13,25 \pm 5,281	11,37 \pm 5,404	17,08 \pm 5,839	13,50 \pm 5,534	0,040

Preglednica L: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.

Spremenljivka	test	kombinacija I \leftrightarrow kombinacija II	p
BMDfn	LSD	2 \leftrightarrow 3	0,029
sBALP	LSD	1 \leftrightarrow 2	0,009

Preglednica LI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X \pm SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
BMDfn	0,623 \pm 0,075	0,626 \pm 0,086	0,626 \pm 0,083	0,620 \pm 0,071	0,943	0,872
t_fn	-2,430 \pm 0,668	-2,313 \pm 0,888	-2,373 \pm 0,802	-2,321 \pm 0,800	0,685	0,314
BMDtot	0,758 \pm 0,091	0,767 \pm 0,132	0,761 \pm 0,117	0,771 \pm 0,106	0,666	0,441
t_tot	-1,627 \pm 0,608	-1,475 \pm 0,867	-1,564 \pm 0,762	-1,438 \pm 0,791	0,596	0,150
BMDIs	-0,307 \pm 0,122	-0,306 \pm 0,121	-0,304 \pm 0,119	-0,321 \pm 0,137	0,930	0,574
lnRANKL	-1,515 \pm 1,322	-1,231 \pm 0,768	-1,390 \pm 1,129	-1,241 \pm 0,686	0,516	0,897
pOC	27,60 \pm 14,26	28,92 \pm 13,94	29,22 \pm 14,23	21,19 \pm 9,986	0,454	0,119
CTX	4482 \pm 2346	4223 \pm 2360	4235 \pm 2357	4828 \pm 2288	0,701	0,344
sBALP	13,88 \pm 5,434	11,60 \pm 5,464	12,31 \pm 5,441	12,59 \pm 5,755	0,030	0,055

Preglednica LII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost \pm SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X \pm SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,629 \pm 0,076	0,622 \pm 0,088	0,595 \pm 0,063	0,652 \pm 0,072	0,345
t_fn	-2,377 \pm 0,658	-2,370 \pm 0,898	-2,642 \pm 0,695	-2,000 \pm 0,793	0,477
BMDtot	0,757 \pm 0,091	0,765 \pm 0,134	0,761 \pm 0,090	0,784 \pm 0,124	0,837
t_tot	-1,626 \pm 0,558	-1,517 \pm 0,885	-1,631 \pm 0,809	-1,245 \pm 0,758	0,490
BMDIs	0,754 \pm 0,093	0,745 \pm 0,092	0,734 \pm 0,109	0,742 \pm 0,077	0,776
lnRANKL	-1,533 \pm 1,416	-1,255 \pm 0,784	-1,408 \pm 0,642	-1,116 \pm 0,786	0,870
pOC	28,71 \pm 14,75	29,61 \pm 14,01	19,85 \pm 7,287	22,52 \pm 13,22	0,389
CTX	4286 \pm 2524	4194 \pm 2261	5381 \pm 946	4367 \pm 3032	0,587

sBALP	13,38 ± 5,262	11,43 ± 5,476	17,08 ± 5,839	13,50 ± 5,534	0,044
-------	---------------	---------------	---------------	---------------	-------

Preglednica LIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, obolelih za osteoporozo.

Spremenljivka	X±SD	p
	kombinacija	
t_ls	-2,727 ± 0,885	0,819
sOPG	63,74 ± 187,8	0,865

7.2.7 Zdravi preiskovanci

Preglednica LIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri zdravih preiskovancih.

Spremenljivka	N	X±SD	minimum	maksimum
starost	179	59,99 ± 10,24	39	84
višina	179	164,0 ± 6,898	148	183
masa	179	76,29 ± 14,52	47	130
ITM	179	28,37 ± 5,226	19,15	44,92
BMDfn	179	0,830 ± 0,139	0,550	1,290
BMDtot	177	0,999 ± 0,150	0,585	1,610
BMDls	178	1,080 ± 0,143	0,771	1,567
pOC	60	10,95 ± 5,245	2,400	31,70
sCTX	82	3149 ± 1748	496	9988
sBALP	42	8,291 ± 3,384	3,45	19,50
RANKL	90	0,386 ± 0,416	0,000	2,900
OPG	88	153,3 ± 163,6	3,030	498,0

Preglednica LV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.

Spremenljivka	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,227 ± 0,175	-0,211 ± 0,150	-0,212 ± 0,165	-0,240 ± 0,152	0,602	0,461
t_fn	-0,456 ± 1,118	-0,396 ± 0,998	-0,451 ± 1,083	-0,345 ± 0,981	0,704	0,574
BMDtot	0,995 ± 0,151	1,000 ± 0,151	0,996 ± 0,150	1,004 ± 0,155	0,812	0,777
Int_tot	-0,175 ± 0,898	-0,285 ± 0,921	-0,272 ± 0,930	-0,082 ± 0,800	0,656	0,552
BMDls	1,100 ± 0,161	1,057 ± 0,118	1,074 ± 0,137	1,093 ± 0,158	0,044	0,475
Int_ls	-0,353 ± 1,173	-0,516 ± 1,040	-0,551 ± 1,132	0,061 ± 0,931	0,536	0,051
pOC	11,33 ± 4,496	10,90 ± 5,901	10,79 ± 4,873	12,06 ± 6,499	0,762	0,438
CTX	3217 ± 1384	3116 ± 2066	3064 ± 1682	3496 ± 1976	0,797	0,350
sBALP	8,123 ± 3,440	8,482 ± 3,471	8,061 ± 3,683	9,045 ± 2,576	0,743	0,421

Preglednica LVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.

Spremenljivka	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,217 ± 0,184	-0,208 ± 0,145	-0,269 ± 0,120	-0,219 ± 0,172	0,765
t_fn	-0,479 ± 1,149	-0,420 ± 1,013	-0,367 ± 1,015	-0,329 ± 0,977	0,934
BMDtot	0,993 ± 0,154	0,999 ± 0,146	1,004 ± 0,144	1,003 ± 0,166	0,986

Int_tot	-0,184 ± 0,937	-0,345 ± 0,937	-0,106 ± 0,703	-0,071 ± 0,891	0,874
BMDIs	1,092 ± 0,154	1,054 ± 0,114	1,131 ± 0,187	1,064 ± 0,130	0,159
Int_Is	-0,476 ± 1,175	-0,660 ± 1,083	0,127 ± 1,096	-0,024 ± 0,740	0,239
pOC	11,12 ± 4,854	10,49 ± 4,980	12,22 ± 2,703	11,97 ± 8,060	0,862
CTX	3165 ± 1442	2949 ± 1940	3460 ± 1135	3518 ± 2385	0,777
sBALP	7,837 ± 3,651	8,284 ± 3,829	9,553 ± 1,900	8,854 ± 2,880	0,840

Preglednica LVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,227 ± 0,175	-0,211 ± 0,150	-0,213 ± 0,165	-0,240 ± 0,152	0,952	0,607
t_fn	-0,456 ± 1,118	-0,396 ± 0,998	-0,451 ± 1,083	-0,346 ± 0,981	0,483	0,602
BMDtot	0,995 ± 0,151	1,000 ± 0,151	0,996 ± 0,150	1,004 ± 0,155	0,596	0,724
Int_tot	-0,175 ± 0,898	-0,285 ± 0,921	-0,272 ± 0,930	-0,082 ± 0,800	0,264	0,727
BMDIs	1,100 ± 0,161	1,057 ± 0,118	1,075 ± 0,137	1,093 ± 0,158	0,032	0,455
Int_Is	-0,353 ± 1,173	-0,516 ± 1,040	-0,551 ± 1,132	0,061 ± 0,931	0,734	0,091
pOC	11,33 ± 4,496	10,90 ± 5,900	10,79 ± 4,873	12,06 ± 6,500	0,931	0,363
CTX	3217 ± 1384	3116 ± 2066	3064 ± 1682	3497 ± 1976	0,908	0,258
sBALP	8,123 ± 3,440	8,482 ± 3,471	8,061 ± 3,683	8,045 ± 2,576	0,441	0,399

Preglednica LVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,217 ± 0,184	-0,208 ± 0,145	-0,269 ± 0,120	-0,219 ± 0,172	0,690
t_fn	-0,479 ± 1,149	-0,420 ± 1,013	-0,367 ± 1,015	-0,329 ± 0,977	0,842
BMDtot	0,993 ± 0,154	0,999 ± 0,146	1,004 ± 0,144	1,003 ± 0,166	0,931
Int_tot	-0,184 ± 0,937	-0,345 ± 0,937	-0,106 ± 0,703	-0,071 ± 0,891	0,692
BMDIs	1,092 ± 0,154	1,054 ± 0,114	1,131 ± 0,187	1,064 ± 0,130	0,126
Int_Is	-0,476 ± 1,175	-0,660 ± 1,083	0,127 ± 1,096	-0,024 ± 0,740	0,383
pOC	11,12 ± 4,853	10,49 ± 4,980	12,22 ± 2,703	11,97 ± 8,060	0,717
CTX	3165 ± 1442	2949 ± 1940	3460 ± 1135	3518 ± 2385	0,682
sBALP	7,837 ± 3,651	8,284 ± 3,829	9,553 ± 1,900	8,854 ± 2,880	0,784

Preglednica LIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri zdravih preiskovancih.

Spremenljivka	X±SD	p
	kombinacija	
RANKL	0,386 ± 0,416	0,459
sOPG	153,3 ± 163,6	0,637

7.2.8 Preiskovanci, starejši od 65 let

Preglednica LX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri preiskovancih, starejših od 65 let.

Spremenljivka	N	X±SD	minimum	maksimum
---------------	---	------	---------	----------

starost	235	72,35 ± 5,280	66	99
višina	235	160,9 ± 8,236	137	188
masa	235	71,72 ± 12,667	46	108
ITM	235	27,62 ± 4,051	19,38	44,12
BMDfn	212	0,680 ± 0,137	0,366	1,290
BMDtot	213	0,863 ± 0,160	0,472	1,478
BMDls	224	0,883 ± 0,185	0,457	1,527
pOC	38	18,44 ± 13,28	1,200	58,10
sCTX	46	3212 ± 1980	77	6806
sBALP	38	12,49 ± 4,891	0,010	22,89
RANKL	45	0,241 ± 0,367	0,000	1,800
OPG	53	6,555 ± 1,658	3,030	10,50

Preglednica LXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starejših od 65 let.

Spremenljivka	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,371 ± 0,191	-0,432 ± 0,186	-0,402 ± 0,193	-0,401 ± 0,180	0,019	0,990
t_fn	-1,618 ± 1,121	-1,894 ± 1,093	-1,733 ± 1,129	-1,821 ± 1,066	0,102	0,662
BMDtot	0,855 ± 0,156	0,820 ± 0,161	0,837 ± 0,160	0,839 ± 0,158	0,118	0,937
t_tot	-0,917 ± 1,060	-1,025 ± 1,161	-0,953 ± 1,134	-1,028 ± 1,025	0,524	0,709
lnBMDls	-0,125 ± 0,214	-0,164 ± 0,193	-0,145 ± 0,196	-0,143 ± 0,238	0,157	0,966
t_ls	-1,274 ± 1,706	-1,507 ± 1,366	-1,383 ± 1,455	-1,397 ± 1,890	0,310	0,960
lnRANKL	-1,871 ± 1,034	-1,370 ± 0,849	-1,597 ± 1,002	-1,529 ± 0,790	0,136	0,869
pOC	13,69 ± 8,205	21,54 ± 15,10	19,74 ± 13,92	14,26 ± 10,53	0,074	0,285
CTX	3772 ± 2045	2781 ± 1852	3065 ± 1927	3627 ± 2152	0,093	0,404
sBALP	14,42 ± 4,805	11,09 ± 4,556	11,72 ± 4,508	17,58 ± 4,627	0,036	0,010
sOPG	6,783 ± 1,490	6,352 ± 1,797	6,505 ± 1,759	6,711 ± 1,352	0,350	0,701

Preglednica LXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starejših od 65 let.

Spremenljivka	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,361 ± 0,187	-0,438 ± 0,192	-0,401 ± 0,201	-0,402 ± 0,148	0,077
t_fn	-1,530 ± 1,090	-1,927 ± 1,140	-1,870 ± 1,194	-1,751 ± 0,883	0,205
BMDtot	0,858 ± 0,160	0,818 ± 0,159	0,844 ± 0,146	0,832 ± 0,177	0,440
t_tot	-0,865 ± 1,080	-1,037 ± 1,186	-1,067 ± 1,006	-0,973 ± 1,084	0,799
lnBMDls	-0,120 ± 0,201	-0,168 ± 0,189	-0,143 ± 0,256	-0,143 ± 0,218	0,477
t_ls	-1,228 ± 1,578	-1,542 ± 1,309	-1,425 ± 2,102	-1,358 ± 1,622	0,683
lnRANKL	-2,135 ± 1,009	-1,262 ± 0,866	-1,213 ± 0,878	-1,950 ± 0,501	0,093
pOC	14,75 ± 9,914	21,64 ± 14,94	12,471 ± 6,260	20,50 ± 23,48	0,358
CTX	3451 ± 2033	2855 ± 1882	4253 ± 2100	2375 ± 1883	0,288
sBALP	13,65 ± 4,848	10,47 ± 3,897	17,76 ± 3,392	17,31 ± 7,898	0,016
sOPG	6,653 ± 1,547	6,395 ± 1,927	7,059 ± 1,420	6,154 ± 1,151	0,739

Preglednica LXIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* pri preiskovancih, starejših od 65 let.

Spremenljivka	test	kombinacija I ⇔ kombinacija II	p
---------------	------	--------------------------------	---

lnBMDfn	LSD	0 ⇔ 1	0,009
t_fn	LSD	0 ⇔ 1	0,039
lnRANKL	LSD	0 ⇔ 1	0,022
sBALP	LSD	0 ⇔ 1	0,050
		1 ⇔ 2	0,011
		1 ⇔ 3	0,043

Preglednica LXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starejših od 65 let.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
lnBMDfn	-0,371 ± 0,191	-0,432 ± 0,186	-0,402 ± 0,193	-0,401 ± 0,180	0,005	0,747
t_fn	-1,618 ± 1,121	-1,894 ± 1,093	-1,733 ± 1,129	-1,821 ± 1,066	0,030	0,973
BMDtot	0,855 ± 0,156	0,820 ± 0,161	0,837 ± 0,160	0,839 ± 0,158	0,047	0,641
t_tot	-0,917 ± 1,060	-1,025 ± 1,161	-0,953 ± 1,134	-1,029 ± 1,025	0,208	0,827
lnBMDls	-0,125 ± 0,214	-0,164 ± 0,193	-0,145 ± 0,196	-0,143 ± 0,238	0,104	0,837
t_ls	-1,274 ± 1,706	-1,507 ± 1,366	-1,383 ± 1,455	-1,397 ± 1,890	0,159	0,823
lnRANKL	-1,871 ± 1,034	-1,370 ± 0,849	-1,597 ± 1,002	-1,529 ± 0,790	0,217	0,534
pOC	13,69 ± 8,205	21,54 ± 15,10	19,74 ± 13,92	14,26 ± 10,53	0,175	0,440
CTX	3772 ± 2045	2781 ± 1853	3065 ± 1927	3627 ± 2152	0,108	0,592
sBALP	14,42 ± 4,805	11,09 ± 4,556	11,72 ± 4,508	17,58 ± 4,627	0,068	0,016
sOPG	6,783 ± 1,490	6,352 ± 1,797	6,505 ± 1,759	6,711 ± 1,352	0,513	0,718

Preglednica LXV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starejših od 65 let.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
lnBMDfn	-0,361 ± 0,187	-0,438 ± 0,192	-0,401 ± 0,201	-0,402 ± 0,148	0,016
t_fn	-1,530 ± 1,090	-1,927 ± 1,140	-1,870 ± 1,194	-1,751 ± 0,883	0,048
BMDtot	0,858 ± 0,160	0,818 ± 0,159	0,844 ± 0,146	0,831 ± 0,177	0,166
t_tot	-0,865 ± 1,080	-1,037 ± 1,186	-1,067 ± 1,006	-0,973 ± 1,084	0,369
lnBMDls	-0,120 ± 0,201	-0,168 ± 0,189	-0,143 ± 0,256	-0,143 ± 0,218	0,260
t_ls	-1,228 ± 1,578	-1,542 ± 1,309	-1,425 ± 2,101	-1,358 ± 1,622	0,364
lnRANKL	-2,135 ± 1,009	-1,262 ± 0,867	-1,213 ± 0,501	-1,950 ± 0,501	0,082
pOC	14,75 ± 9,915	21,64 ± 14,94	12,47 ± 6,260	20,50 ± 23,48	0,578
CTX	3451 ± 2033	2855 ± 1882	4253 ± 2101	2375 ± 1883	0,267
sBALP	13,65 ± 4,848	10,47 ± 3,897	17,77 ± 3,392	17,31 ± 7,898	0,035
sOPG	6,653 ± 1,547	6,395 ± 1,927	7,059 ± 1,420	6,154 ± 1,151	0,895

7.2.9 Preiskovanci, stari 65 let ali manj

Preglednica LXVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.

Spremenljivka	N	X±SD	minimum	maksimum
starost	429	56,89 ± 6,579	38	65
višina	433	163,0 ± 6,863	146	184
masa	434	71,40 ± 13,39	47	130

ITM	433	26,88 ± 4,712	18,34	44,92
BMDfn	413	0,739 ± 0,129	0,420	1,278
BMDtot	408	0,888 ± 0,155	0,495	1,673
BMDls	424	0,919 ± 0,179	0,476	1,567
pOC	198	17,62 ± 11,43	2,100	60,30
sCTX	194	3676 ± 2020	172	10800
sBALP	178	11,00 ± 5,003	0,000	31,80
RANKL	207	0,405 ± 0,486	0,00	3,670
OPG	238	166,0 ± 190,3	0,100	1386

Preglednica LXVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.

Spremenljivka	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
BMDfn	0,725 ± 0,136	0,745 ± 0,128	0,727 ± 0,129	0,772 ± 0,141	0,142	0,014
t_fn	-1,242 ± 1,130	-1,026 ± 1,092	-1,201 ± 1,131	-0,801 ± 0,977	0,089	0,014
BMDtot	0,871 ± 0,156	0,898 ± 0,160	0,877 ± 0,157	0,924 ± 0,158	0,103	0,033
t_tot	-0,523 ± 1,115	-0,371 ± 1,017	-0,491 ± 1,062	-0,228 ± 1,059	0,213	0,092
BMDls	0,922 ± 0,194	0,905 ± 0,171	0,903 ± 0,180	0,965 ± 0,187	0,352	0,013
t_ls	-0,944 ± 1,603	-1,170 ± 1,368	-1,121 ± 1,475	-0,806 ± 1,516	0,173	0,145
lnpOC	2,792 ± 0,666	2,685 ± 0,650	2,746 ± 0,700	2,681 ± 0,426	0,295	0,623
CTX	4005 ± 2112	3632 ± 2103	3727 ± 2084	4099 ± 2205	0,258	0,356
sBALP	11,979 ± 5,445	10,76 ± 4,961	11,21 ± 5,285	11,84 ± 4,883	0,152	0,574

Preglednica LXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.

Spremenljivka	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,722 ± 0,134	0,733 ± 0,125	0,739 ± 0,151	0,798 ± 0,128	0,021
t_fn	-1,279 ± 1,162	-1,129 ± 1,101	-1,046 ± 0,943	-0,641 ± 0,979	0,028
BMDtot	0,865 ± 0,153	0,889 ± 0,161	0,905 ± 0,169	0,940 ± 0,149	0,068
t_tot	-0,572 ± 1,130	-0,416 ± 0,993	-0,269 ± 1,017	-0,200 ± 1,101	0,239
BMDls	0,914 ± 0,190	0,893 ± 0,171	0,970 ± 0,215	0,962 ± 0,163	0,064
t_ls	-1,002 ± 1,568	-1,231 ± 1,379	-0,636 ± 1,780	-0,927 ± 1,313	0,238
lnpOC	2,779 ± 0,716	2,719 ± 0,690	2,854 ± 0,384	2,539 ± 0,416	0,519
CTX	3952 ± 2166	3521 ± 2000	4222 ± 1927	4006 ± 2439	0,516
sBALP	11,57 ± 5,200	10,89 ± 5,379	14,14 ± 6,431	10,16 ± 2,415	0,208

Preglednica LXIX: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk s Post Hoc testi za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.

Spremenljivka	test	kombinacija I ↔ kombinacija II	p
BMDfn	Scheffe	0 ↔ 3	0,030
	LSD	0 ↔ 3	0,003
		1 ↔ 3	0,021
	Bonferroni	0 ↔ 3	0,017
t_fn	Scheffe	0 ↔ 3	0,022
	LSD	0 ↔ 3	0,002
		1 ↔ 3	0,008

	Bonferroni	0 ⇔ 3	0,012
		1 ⇔ 3	0,046
BMDtot	LSD	0 ⇔ 3	0,012
BMDls	LSD	1 ⇔ 2	0,037
		1 ⇔ 3	0,044

Preglednica LXX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za genotipa *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p	
	<i>GSTM1*0/GSTM1*0</i>		<i>GSTT1*0/GSTT1*0</i>		<i>GSTM1*0</i>	<i>GSTT1*0</i>
	0	1	0	1		
BMDfn	0,727 ± 0,136	0,745 ± 0,128	0,728 ± 0,130	0,776 ± 0,138	0,480	0,032
t_fn	-1,242 ± 1,130	-1,023 ± 1,095	-1,900 ± 1,133	-0,801 ± 0,977	0,249	0,046
BMDtot	0,874 ± 0,155	0,898 ± 0,160	0,878 ± 0,158	0,929 ± 0,155	0,273	0,041
t_tot	-0,523 ± 1,114	-0,369 ± 1,019	-0,489 ± 1,064	-0,228 ± 1,059	0,418	0,204
BMDls	0,925 ± 0,196	0,907 ± 0,171	0,905 ± 0,181	0,968 ± 0,187	0,116	0,043
t_ls	-0,944 ± 1,603	-1,161 ± 1,367	-1,115 ± 1,475	-0,806 ± 1,516	0,080	0,313
lnpOC	2,783 ± 0,676	2,677 ± 0,649	2,740 ± 0,706	2,655 ± 0,407	0,646	0,778
CTX	4005 ± 2122	3648 ± 2109	3739 ± 2088	4099 ± 2205	0,448	0,237
sBALP	12,05 ± 5,456	10,78 ± 5,008	11,27 ± 5,327	11,84 ± 4,883	0,181	0,313

Preglednica LXXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa ANCOVA za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	X±SD				p
	kombinacija				
	0	1	2	3	
BMDfn	0,723 ± 0,134	0,733 ± 0,126	0,748 ± 0,147	0,798 ± 0,128	0,143
t_fn	-1,279 ± 1,162	-1,126 ± 1,105	-1,046 ± 0,943	-0,641 ± 0,979	0,164
BMDtot	0,866 ± 0,153	0,890 ± 0,161	0,915 ± 0,163	0,940 ± 0,149	0,147
t_tot	-0,572 ± 1,130	-0,413 ± 0,996	-0,269 ± 1,017	-0,200 ± 1,100	0,418
BMDls	0,916 ± 0,191	0,895 ± 0,171	0,976 ± 0,216	0,962 ± 0,163	0,079
t_ls	-1,002 ± 1,568	-1,220 ± 1,378	-0,636 ± 1,780	-0,927 ± 1,313	0,208
lnpOC	2,778 ± 0,730	2,709 ± 0,690	2,806 ± 0,354	2,539 ± 0,416	0,962
CTX	3952 ± 2166	3541 ± 2008	4222 ± 1927	4006 ± 2439	0,506
sBALP	11,64 ± 5,214	10,93 ± 5,444	14,14 ± 6,432	10,16 ± 2,415	0,275

Preglednica LXXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk testa Kruskal-Wallis za kombinacijo genotipov *GSTM1*0/GSTM1*0* in *GSTT1*0/GSTT1*0* ter rezultati statistične obdelave pri preiskovancih, starih 65 let ali manj.

Spremenljivka	X±SD	p
	kombinacija	
RANKL	0,405 ± 0,486	0,152
sOPG	166,0 ± 190,3	0,129