

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA ŠOHAR

**POVEZANOST POLIMORFIZMA His477His V GENU *PPARG* Z
MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE
PREMENE**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISM His477His IN THE *PPARG* GENE
WITH BONE MINERAL DENSITY AND BIOCHEMICAL MARKERS OF
BONE TURNOVER**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm.. Meritve mineralne kostne gostote in biokemičnih kazalcev kostne premene so opravili na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, v Splošni bolnišnici Celje in v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. se zahvaljujem, da mi je omogočila opravljanje diplome na tem področju. Zahvalila bi se ji za vse koristne nasvete, pomoč in vzpodbudo pri nastajanju diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi somentorici asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, mag. farm., ki me je skrbno vodila skozi laboratorijsko delo, mi pomagala pri nastalih težavah in me s svojimi nasveti usmerila do točke, ko sem rezultate lahko ubesedila v diplomu.

Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo, da so me sprejeli medse in mi nudili pomoč.

Iz srca se zahvaljujem moji družini, brez katere me tu kjer sem sedaj, ne bi bilo. Zahvalila bi se jim za vso podporo in spodbudne besede pri nastajanju diplome. Hvala vam, ker mi vedno stojite ob strani.

Zahvala gre tudi prijateljici Tini Žuran, ki je z menoj preživljala vse vesele, pa tudi težke trenutke in me je ves čas spodbujala. Hvala ji tudi za pomoč pri pisanju diplomske naloge.

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

Ljubljana, junij 2010

Monika Šohar

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

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK	i
SEZNAM OKRAJŠAV	ii
SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC	iv
1. UVOD	1
1.1 KOSTNINA	1
1.1.1 Zgradba kostnine	1
1.1.2 Mikroskopska in histološka razdelitev kostnine	2
1.1.3 Kostna premena	3
1.1.4 Biokemični kazalci kostne premene	4
1.2 OSTEOPOROZA	8
1.2.1 Klinična slika	8
1.2.2 Dejavniki tveganja	10
1.2.3 Genetski dejavniki tveganja za osteoporozo	10
1.3 PPARγ	12
1.3.1 Zgradba gena za PPAR γ	12
1.3.2 Vloga PPAR γ	14
1.3.3 Delovanje PPAR γ	14
1.3.4 Znani polimorfizmi v genu PPARG	16
2. NAMEN DELA	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 SPLOŠNA OPOZORILA	18
3.2 OPIS PREISKOVANCEV	18
3.3 MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE	19
3.4 MERJENJE KONCENTRACIJ BIOKEMIČNIH KAZALCEV KOSTNE PREMENE	19
3.5 IZOLACIJA DNA	20
3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	20
3.6.1 Priprava reakcijske zmesi	23
3.6.2 Optimizacija reakcijskih pogojev	23
3.6.3 Materiali in oprema	24
3.7 STATISTIČNE METODE	25
3.7.1 Hardy – Weinbergovo načelo	25
3.7.2 Kolomogorov – Smirnov test normalnosti porazdelitve	25
3.7.3 Statistična analiza razlik v parametrih med genotipskimi podskupinami	26
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1 IZVEDBA GENOTIPIZACIJE	27
4.2 UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMA HIS477HIS	28
4.3 OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA HIS477HIS V GENU PPARG Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE	30
4.3.1 Skupina moških	32
4.3.2 Skupina premenopavznih žensk	33
4.3.3 Skupina pomenopavznih žensk	34
4.3.4 Farmakogenetska analiza	37
4.3.5 Zlomi	39
4.3.6 Primerjava rezultatov z objavljenimi študijami	40
5. SKLEP	41
LITERATURA	42
PRILOGA	46

POVZETEK

Kostnina se neprestano obnavlja v procesu kostne premene, ki vključuje razgradnjo kostnine z osteoklasti in tvorbo kostnine z osteoblasti. Porušeno ravnotežje med tema dvema procesoma lahko vodi do različnih bolezni, kot je na primer osteoporoza, za katero sta značilni znižana mineralna kostna gostota (MKG) in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva, kar poveča tveganje za zlom.

Protein PPAR γ je jedrni receptor, ki se veže na specifične odzivne elemente v DNA in na ta način spodbuja izražanje mnogih genov, povezanih predvsem z adipogenezo in lipidno presnovo. V kostnem mozgu PPAR γ aktivira diferenciacijo preadipocitov in zavira diferenciacijo preosteoblastov. PPAR γ je povezan tudi z izgubo kostne mase s starostjo, zato je gen *PPARG* kandidatni gen, ki bi lahko vplival na razvoj osteoporoze. Namen naše raziskave je bilo preučevanje povezanosti polimorfizma His477His v 6. eksonu gena *PPARG* z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene.

V raziskavo smo vključili 814 preiskovancev (117 moških in 697 žensk), ki smo jim izmerili MKG na področju kolka in ledvene hrbtenice ter biokemične kazalce kostne premene. Prisotnost polimorfizma His477His v vzorcih DNA smo določili z metodo alelne diskriminacije in uporabo sond Taqman.

Frekvence genotipov polimorfizma His477His so bile naslednje: 71,74% : 25,43% : 2,83% za genotipe CC : CT : TT. Polimorfizem His477His je v skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk, zdravljenih z alendronatom, vplival na spremembo MKG ledvenega predela hrbtenice ($p=0,048$). V skupini premenopavznih žensk, pomenopavznih žensk (zdravih in osteoporoznih), osteoporoznih pomenopavznih žensk, zdravljenih z raloksifenom, ter pri preiskovancih z zlomi pa nismo dokazali povezanosti polimorfizma His477His z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene.

Na osnovi naših rezultatov sklepamo, da bi polimorfizem His477His lahko imel vlogo v razvoju osteoporoze ter bil predvsem povezan z odzivnostjo na zdravljenje z alendronatom. Za potrditev naših rezultatov bi bile potrebne študije na večjem številu preiskovancev.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALP	serumska alkalna fosfataza
ALT	encim alanin-aminotransferaza
AST	encim aspartat-aminotransferaza
BALP	kostno specifična alkalna fosfataza
bp	bazni par
CTX	C-terminalni telopeptid kolagena I
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPYR	deoksipiridolin
ELISA	encimsko imunski test na trdem nosilcu
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IL	interlevkin
INF	interferon
ITM	indeks telesne mase
LXR	jetrni X receptor
MKG	mineralna kostna gostota
NTX	N-terminalni telopeptid kolagena I
OC	osteokalcin
OPG	osteoprotegerin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PICP	C-terminalni propeptid kolagena I
PINP	N-terminalni propeptid kolagena I
PPARγ	receptor, aktiviran s proliferatorji peroksisoma γ
PPRE	odsek DNA na promotorju regulatornega gena, kamor se pripenja PPAR γ (angl. peroxisome proliferator response element)
PTH	parathormon
PYR	piridinolin
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RIA	radioimunski test
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času

RXR	retinoidni X-receptor
SD	standardna deviacija
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. SNP-single nucleotide polymorphism)
TGF	transformirajoči rastni faktor
TNF	tumorje nekrotizirajoči dejavnik (angl. tumor necrosis factor)
TRAF	z dejavnikom tumorske nekroze povezan faktor
TRAP	tartrat rezistentna kislina fosfataza

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1:	Zgradba kosti
Slika 2:	Faze kostne premene
Slika 3:	Zdrava vretenca in vretenca z osteoporoznim zlomom
Slika 4:	Primerjava med normalno in osteoporozno kostjo
Slika 5:	Struktura gena PPAR γ
Slika 6:	Struktura PPAR γ in način regulacije genov
Slika 7:	Stopnje ciklov RT-PCR
Slika 8:	Shematski prikaz RT-PCR v realnem času z uporabo sond TaqMan
Slika 9:	Prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan [®]

Preglednica I:	Biokemični kazalci tvorbe in razgradnje kostnine
Preglednica II:	Dejavniki tveganja za osteoporozo
Preglednica III:	Najpogosteje preučevani kandidatni geni za osteoporozo
Preglednica IV:	Sestava reakcijske zmesi za pomnožitev enega vzorca DNA
Preglednica V:	Reakcijski pogoji za pomnoževanje odseka <i>PPARG</i>
Preglednica VI:	Povezava med fluorescenčnim signalom in genotipom
Preglednica VII:	Frekvence (%) genotipov za preiskovani polimorfizem v posamezni skupini preiskovancev
Preglednica VIII:	Frekvence genotipov polimorfizma His477His pri evropejcih, azijcih in afroameričanih
Preglednica IX:	Testiranje razporeditev glede na število posameznih genotipov preiskovancev v Hardy-Weinbergovem ravnovesju
Preglednica X:	Klinične značilnosti preiskovancev posamezne podskupine
Preglednica XI:	Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD), MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri moških

-
- Preglednica XII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD), MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih ženskah
- Preglednica XIII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD), MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih ženskah
- Preglednica XIV:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD), MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih ženskah
- Preglednica XV:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD), MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah
- Preglednica XVI:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD), MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah, zdravljenih z raloksifenom
- Preglednica XVII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD), MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah zdravljenih z alendronatom
- Preglednica XVIII:** Rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih ženskah z zlomi

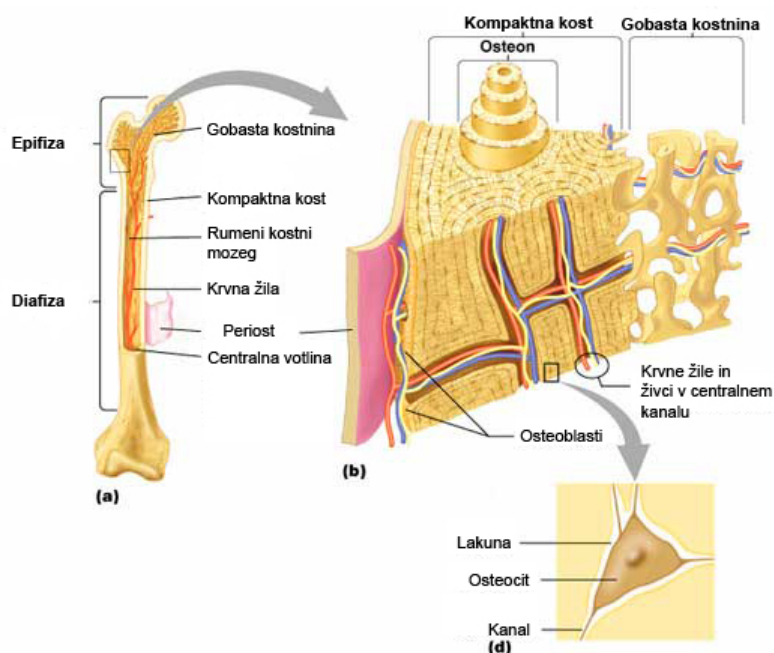
1. UVOD

1.1 KOSTNINA

Človeški skelet sestavlja 206 kosti, ki so zgrajene iz različnih vrst tkiv: kostnine, hrustančevine, veziva, maščobnega tkiva, hemopoetskega kostnega mozga, živcev in žil (1). Kostnina podpira mehka tkiva, ščiti vitalne organe v prsnem košu in lobanji. Kosti predstavljajo rezervoar za kalcijeve, fosfatne in druge ione. V kosteh je kostni mozeg, kjer nastajajo krvne celice (2).

1.1.1 Zgradba kostnine

Kostnina je specializirana oblika veziva, zgrajena iz celic in medceličnine (slika 1). Medceličnino sestavlja vlaknata medceličnina in osnovna snov. V kostnini ločimo organsko in anorgansko medceličnino. Poleg kolagena sestavljajo organsko medceličnino še specifični glikoproteini, sialoproteini in osteokalcin. Polovica suhe teže kostnine je anorganski del medceličnine. Najpogostejši so kalcijevi in fosfatni ioni, vendar pa najdemo v kostnini tudi bikarbonatne, citratne, magnezijeve, kalijeve in natrijeve ione. Povezava kristalov hidroksiapatita in kolagenskih vlaken zagotavlja trdnost in odpornost kostnine. Če kost dekalciniramo, sicer ohrani obliko, vendar postane mehka in upogljiva. Če pa odstranimo organsko medceličnino, kost ohrani obliko, vendar je krhka in lomljiva (1).



Slika 1: Zgradba kostnine.

Poleg medceličnine gradijo kostnino še štiri vrste celic (1):

- **Osteoprogenitorne celice** so nediferencirane, nepravilno oblikovane celice, podobne fibroblastom, z ovalnimi jedri in svetlo citoplazmo. Imajo veliko mitotsko aktivnost in se preoblikujejo v osteoblaste.
- **Osteoblasti** nastanejo iz osteoprogenitornih celic. So celice, ki tvorijo kostni matriks, vendar samo njen organski, nemineraliziran del, ki se imenuje osteoid. Osteoblasti ležijo na površini kostnine in med seboj komunicirajo s podaljški. Neaktivni osteoblasti so sploščene celice, ki pokrivajo mirujočo kostnino. Ko se aktivni osteoblasti obdajo z medceličnino, postanejo manj aktivni in se preoblikujejo v osteocite.
- **Osteocit** je celica, popolnoma obdana bodisi z osteoidom ali z mineralizirano kostno medceličnino. Osteociti vzdržujejo medceličnino, nekateri pa jim pripisujejo tudi vlogo pri hitrem sproščanju kalcijevih in fosfatnih ionov iz mineralizirane kostnine – osteocitna osteoliza.
- **Osteoklasti** so velike celice s številnimi jedri, katerih funkcija je razgrajevanje kostne medceličnine. Nastanejo iz hematopoetske matične celice. Citoplazma osteoklastov je acidofilna, vsebuje številne lizosome in mitohondrije. Nagubanost površine osteoklastov je nujna za njihovo delovanje. Po opravljeni funkciji se osteoklasti odlepijo od kosti in propadejo v procesu apoptoze.

1.1.2 Mikroskopska in histološka razdelitev kostnine

Makroskopsko razlikujemo gosto, neporozno, kompaktno kostnino ter kostnino s številnimi razvejanimi in med seboj povezanimi kostnimi trabekulami ali spongiozno kostnino. Kompaktna kostnina tvori 80 % kostne mase, spongiozna pa samo 20 %. Razmerje med površino in prostornino je v kompaktni kostnini majhno, saj samo ena tretjina kostne površine pripada kompaktni kostnini (1).

Histološko ločimo dve obliki kostnine: prepletено kostnino (nezrelo ali primarno) in lamelarno kostnino (zrelo ali sekundarno). Obe obliki sta sestavljeni iz enakih elementov,

le da se pri prepleteni kostnini kolagenska vlakna prepletajo v različnih smereh, pri lamelarni kostnini pa potekajo kolagenska vlakna v vsaki lameli vzporedno. Ko se kostnina tvori, se najprej pojavi prepletена kostnina šele kasneje lamelarna kostnina (1).

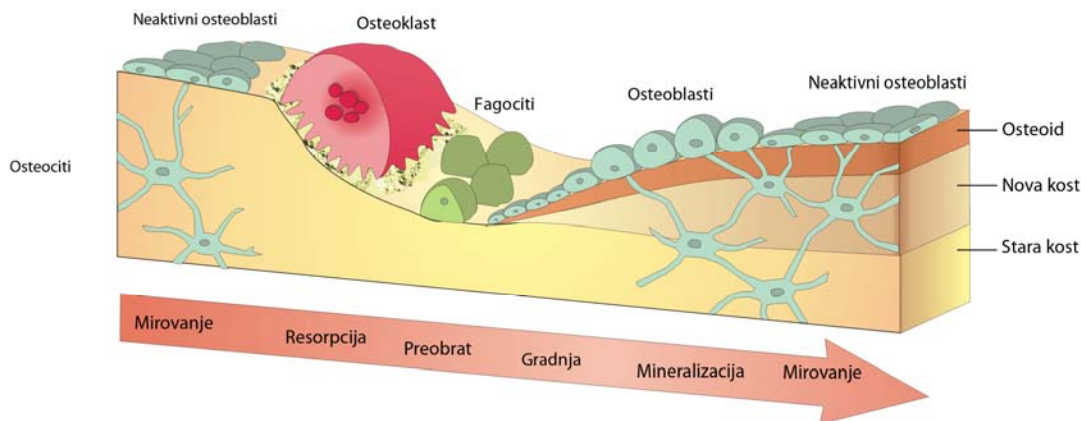
1.1.3 Kostna premena

Razgradnja in tvorba kosti sta procesa, ki potekata vse življenje. Kost se v življenju stalno razgrajuje in ponovno gradi, kar poteka hkrati na različnih delih okostja. Proces stalnega obnavljanja kosti je odvisen od mehanskih in drugih dejavnikov (genskih, hormonskih, lokalnih). Kostna premena poteka skoraj brez izjeme na zunanjih slojih kosti (kortikalne, trabekularne) in intrakortikalno v Haversovem sistemu (3).

Proces kostne premene traja približno 4 mesece in poteka v obliki ciklov, v katerih se delovanje posameznih vrst kostnih celic ciklično spreminja. Kostna premena je sestavljena iz več faz (slika 2):

- **mirujoča faza**, v kateri je kostnina večji del časa. Kostno površino pokrivajo sploščeni osteoblasti.
- **faza razgaljenja**, v kateri se sploščeni osteoblasti skrčijo in razgalijo kostno površino.
- **faza aktivacije**, v kateri na mesto razgradnje pridejo večjedrni osteoklasti.
- **faza kostne razgradnje**, v kateri osteoklasti izdolbejo Howshipove lakune.
- **faza obrata**, v kateri se osteoklasti odstranijo, enojedrni fagociti pa zgladijo nastalo lakuno.
- **faza tvorbe novega osteoida**, v kateri aktivni osteoblasti zapolnijo Howshipovo lakuno z osteoidom, ki nato mineralizira (1).

Letno se na ta način zamenja 5 – 10 % okostja. Za popolno obnovitev okostja odraslega je potrebnih vsaj 10 let (4).



Slika 2: Faze kostne premene (5).

1.1.4 Biokemični kazalci kostne premene

Stopnjo tvorbe in razgradnje kosti lahko opredelimo z neinvazivnimi metodami merjenja biokemičnih kazalcev kostne premene. Hitrost presnove opredelimo biokemično z merjenjem nekaterih presnovkov kostnega matriksa, ki se sproščajo v krvni obtok med tvorbo ali razgradnjo kosti, oz. z določanjem aktivnosti encimov, ki so specifični za osteoblaste in osteoklaste. Biokemične kazalce kostne premene delimo v dve skupini: biokemični kazalci tvorbe kostnine in biokemični kazalci razgradnje kostnine (3).

Določitev biokemičnih označevalcev omogoča spremljanje morebitnih sprememb v procesih tvorbe oz. razgradnje kostnine ter prognostično oceno tveganja za osteoporozo ali zlom. Omogočajo tudi spremljanje uspešnosti zdravljenja osteoporoze in so v pomoč pri nadaljnjem sprejemanju odločitev glede zdravljenja. Določamo jih pred začetkom zdravljenja ali pa med zdravljenjem, če želimo preveriti učinek zdravil v času, ko spremembe v MKG še niso zaznavne. Prednosti biokemičnih kazalcev so neinvazivne in poceni metode, ki jih lahko pogosto ponovimo (6). Slabost biokemičnih kazalcev kostne premene je predvsem ta, da njihova koncentracija tudi pri nekaterih fizioloških stanjih, kot je na primer padec estrogena, naraste. Klinična koristnost biokemičnih kazalcev je še vedno negotova, saj kratkoročne spremembe le-teh ne napovedujejo prihodnjih zlomov pri ženskah (7).

Preglednica I: Biokemični kazalci tvorbe in razgradnje kostnine.

BIOKEMIČNI KAZALCI TVORBE KOSTNINE	BIOKEMIČNI KAZALCI RAZGRADNJE KOSTNINE
Kostno specifična alkalna fosfataza	Tartrat rezistentna kislja fosfataza
Osteokalcin	Presnovki kolagen tipa I <ul style="list-style-type: none"> • Hidroksiprolin • Piridinolin in deoksipiridinolin • Karboksi- in aminotelopektidi
Propeptidi kolagena tipa I:	RANKL
<ul style="list-style-type: none"> • Prokolagen I C-terminalni propeptid • Prokolagen I N-terminalni propeptid 	OPG
	Katepsin K

1.1.4.1 Biokemični kazalci tvorbe kostnine

Kostno specifična alkalna fosfataza

Serumska alkalna fosfataza (ALP) je sestavljena iz najmanj dveh izoencimov in sicer jetrne in kostne ALP. Rastoča kost je zelo bogata z ALP, ki ima vlogo pri mineralizaciji kosti in kaže na aktivnost osteoblastov. V patoloških stanjih se v organizmu tvorijo tudi drugi izoencimi ALP. Aktivnost celotne ALP ni specifičen biokemični kazalec kostne premene. Specifičnost dosežemo, če določimo le kostno specifično ALP (BALP, angl. Bone ALkaline Phosphatase). Kostno specifični izoencim ločimo z imunokemijskimi metodami z vezavo na monoklonska protitelesa, specifična proti BALP. Aktivnost BALP določimo spektrofotometrično (8).

Osteokalcin

Osteokalcin (OC), imenovan tudi kostni GLA-protein, sestavlja 15 do 20 % nekolagenega kostnega matriksa. Tvorba osteokalcina poteka ob prisotnosti vitamina K. Koncentracija osteokalcina v serumu s starostjo linearno narašča in je v negativni korelaciji z kostno

gostoto. Osteokalcin izmerimo z kemiluminiscenčnim encimskoimunokemijskim testom v plazmi po dodatku heparina (8).

Propeptidi kolagena tipa I

Kolagen tipa I nastaja iz prokolagena I. Dodatne aminokisliline se nahajajo na N- in C-terminalnem delu molekule. Njihova vloga je, da preprečijo prehitro vključevanje molekul kolagena v fibrile. Dodatne domene ali propeptidi se po vezavi kolagena odcepijo in izločijo v zunajcelični prostor (PINP - N-terminalni propeptid kolagena I in PICP – C-terminalni propeptid kolagena I). V serumu odražata intenziteto sinteze kolagena in posledično intenziteto tvorbe kostnine. Določamo ju imunokemično z ELISA ali RIA testom (9).

1.1.4.2 Biokemični kazalci razgradnje kostnine

Hidroksiprolin

Hidroksiprolin je aminokislina, ki se nahaja v kolagenu. Zastopan je v različnih tipih kolagena in je zato nespecifičen kazalec kostne premene in se v praksi ne uporablja. Določamo ga v urinu s HPLC (8).

Piridinolin in deokspiridinolin

Piridinolin (PYR) in deokspiridinolin (DPYR) tvorita prečne povezave in od njihovega števila je odvisna trdnost kolagenske strukture. Ob razgradnji kolagena se sproščata v krvni obtok in urin ter odražata intenziteto razgradnje kolagena. Danes se za določanje PYR in DPYR v urinu in serumu uporabljajo imunokemijske metode, ki so točne in hitre (8).

C-terminalni in N-terminalni telopeptid

Telopeptida kolagena tipa I sta C-terminalni in N-terminalni telopeptid (CTX in NTX), ki še imata vezane prečne povezovalce. Sta zelo dobra biokemijska kazalce razgradnje kostnine, ki se trenutno široko uporabljata. Določamo ju v serumu ali urinu z imunokemičnimi testi ELISA ali RIA ter elektrokemiluminiscenco (8).

Tartrat rezistentna kislina fosfataza

Tartrat rezistentna kislina fosfataza (TRAP) je lizosomalni encim, ki ga izločajo osteoklasti in deluje v močnem kislem območju. Izoencim TRAP5b razgrajuje minerale v kostnini in omogoča nastanek resorpcijske lakune ter je kazalec aktivnosti osteoklastov. Določamo jo v serumu z elektroforezo ali pa imunokemijsko, koncentracija pa je sorazmerna z aktivnostjo osteoklastov. Njena koncentracija je povišana ob povečani aktivnosti osteoklastov in povečani razgradnji kostnine (8, 9, 10).

Katepsin K

Je lizosomalni encim, ki sodeluje v razgradnji kostnine. Koncentracija katepsina K v serumu naraste ob povečani razgradnji kostnine in je tako sorazmerna z aktivnostjo osteoklastov. Koncentracijo v serumu določimo imunokemijsko z ELISA testom (10).

Ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANKL)

RANKL (angl. receptor activator of nuclear factor κ B ligand) nastaja v osteoblastih in z vezavo na RANK (receptor za aktivacijo jedrnega κ B) povzroči diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov. Povišane koncentracije RANKL ob hkratnih znižanih vrednostih osteoprotegerina kažejo na povečano osteoklastogenezo. RANKL določamo v serumu ali plazmi z encimsko-immunskim testom ELISA (11).

Osteoprotegerin (OPG)

OPG z vezavo na RANKL prepreči vezavo le-tega na RANK in tako posledično prepreči aktivacijo in diferenciacijo osteoklastov. Znižane vrednosti OPG kažejo na povečano osteoklastogenezo. OPG lahko določimo v serumu ali plazmi z encimsko-immunskim testom ELISA (11).

1.2 OSTEOPOROZA

Osteoporozo je sistemska skeletna bolezen, ki jo označujeta zmanjšana količina kostne mase in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva. Je stanje, ko se količina kostnega tkiva zmanjša do te mere, da se poveča možnost zlomov že ob normalnih obremenitvah (3). Svetovna zdravstvena organizacija je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne kostne gostote (MKG). Po tej definiciji je osteoporozo zmanjšanje mineralne kostne gostote za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, z upoštevanjem spola in rase. Kadar je zmanjšanje kostne gostote med 1 in 2,5 SD, govorimo o osteopeniji (12).

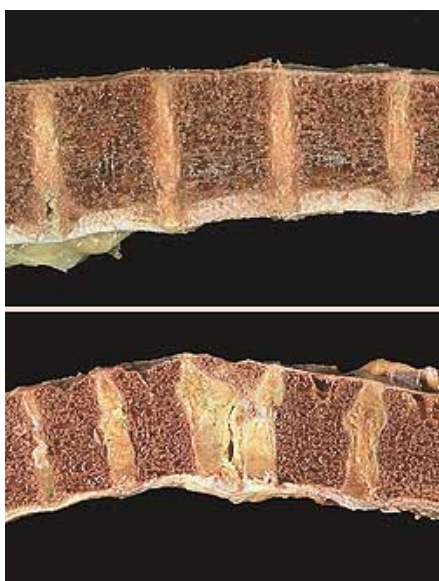
Pomenopavzalna osteoporozo nastane pri ženskah med 50. in 70. letom starosti. Zanja je značilno izgubljanje predvsem trabekularne kosti. Masa kosti se v obdobju po 30. letu starosti počasi zmanjšuje. Posebej hitro se to dogaja pri ženskah, ki so v menopavzi, ko preneha zaščitni učinek estrogenov na ohranjanje kostne mase. V povprečju izgubijo ženske v obdobju od 5 - 7 let po prenehanju reprodukcijskega obdobja tudi do 20 % kostnine. Ocenjujejo, da osteoporozo prizadene 1/3 žensk v menopavzi. Še posebej so izpostavljene ženske, ki so jim operativno odstranili jajčnike. Do 80. leta starosti naj bi tako imela osteoporozo vsaka tretja ženska in vsak šesti moški (12).

1.2.1 Klinična slika

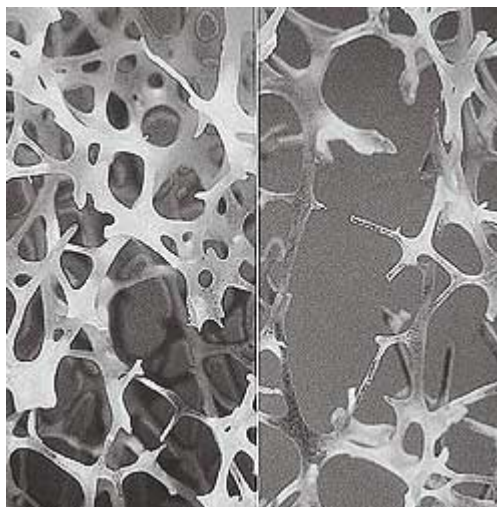
Osteoporozo je do zloma kosti klinično neizrazita. Občasno bolniki tožijo o bolečinah v križu in dolgih kosteh. Ob kompresijskem zlomu vretenc se pojavi močna bolečina, ki se med gibanjem stopnjuje. Običajno pride do zlomov med osmim prsnim in drugim ledvenim vretencem (slika 3). Značilno zanje je, da jih povzročijo že majhne telesne obremenitve, npr. dvigovanje lažjih bremen, vstajanje iz sedečega položaja ali celo kašelj. Zaradi kompresijskih zlomov prsnih in ledvenih vretenc se zmanjša telesna višina tudi do 20cm, nastane značilna torakalna kifoza. Če so zlomi vretenc številni, je hrbtenica tako močno ukrivljena, da rebra slonijo na zgornjem robu medenice. Najhujši zaplet

osteoporoze je zlom kolka, ki nastane zaradi zmanjšanja kortikalnega in trabekularnega dela kosti. Nikoli ne nastane spontano, lahko pa že ob manjši poškodbi.

Zlomi kosti pri osteoporozi ne nastanejo samo zaradi količinskega zmanjšanja kostnine, ampak tudi zaradi strukturnih kostnih sprememb: trabekule se tanjšajo, fenestrirajo in nato izginejo, prostori med trabekulami pa se večajo (slika 4). Mikrofrakture se zaradi upočasnjenih remodelacijskih procesov v starosti ne popravljajo več pravočasno in popolno. Tako pride do zloma že ob majhnem padcu ali neprimerni obremenitvi (13).



Slika 3: Zdrava vretenca (zgoraj) in vretenca z osteoporoznim zlomom (spodaj) (14).



Slika 4: Primerjava med normalno (levo) in osteoporozno (desno) kostjo (15).

1.2.2 Dejavniki tveganja

Tveganje za osteoporozo je v veliki meri odvisno od največje kostne mase, dosežene v mladosti, in od hitrosti izgube kosti med staranjem. Predvsem so osteoporozi izpostavljene ženske bele in azijske rase, z zgodnjo menopavzo (pred 45. letom starosti), katerih najbližji sorodniki so imeli zlome ob manjših poškodbah, ki kadijo in imajo nizko telesno maso (12).

Preglednica II: Dejavniki tveganja za osteoporozo (16).

ENDOGENI DEJAVNIKI TVEGANJA	EKSOGENI DEJAVNIKI TVEGANJA
<ul style="list-style-type: none"> • Bela ali azijska rasa • Ženski spol • Zgodnja menopavza (naravna ali zaradi odstranitve jajčnikov) • Drobnost konstitucija • Bolezni prebavil, žlez z notranjim izločanjem, kronična bolezen ledvic, jeter, presaditev organov • Zaprta puberteta • Genetski dejavniki 	<ul style="list-style-type: none"> • Telesna neaktivnost • Nezadostna izpostavljenost soncu • Kajenje • Malo kalcija in beljakovin v prehrani • Prekomerno uživanje kave • Dolgotrajno jemanje nekaterih zdravil (glukokortikoidi, heparin, antiepileptiki,...)

1.2.3 Genetski dejavniki tveganja za osteoporozo

Genetski dejavniki imajo pomembno vlogo pri uravnavanju MKG, kostne premene, kvalitete kostnine in drugih fenotipskih lastnosti pri osteoporozi, kar so dokazale študije na dvojčkih. Osteoporozo je večfaktorska in poligenska bolezen, pri kateri je fenotip posameznika odvisen od vpliva genov in okolja (17, 18). Na razvoj osteoporoze vplivajo številni geni, od teh pa ima posamezen gen na kostno maso le majhen vpliv. Do danes so preučevali številne kandidatne gene za razvoj osteoporoze, vendar zaradi kompleksnosti bolezni še niso identificirali vseh genov, ki so povezani z razvojem osteoporoze (17). Eden od prvih raziskanih genov v povezavi z osteoporozo je bil gen

za vitamin D receptor (17), do danes pa se je temu genu pridružilo še mnogo kandidatnih genov, ki naj bi bili povezani z MKG. Najpomembnejši kandidatni geni, povezani z razvojem osteoporoze, so navedeni v preglednici III.

Preglednica III: Najpogosteje preučevani kandidatni geni za osteoporozo (17).

SKUPINA	KANDIDATNI GEN
KALCIOTROPNI HORMONI IN RECEPTORJI	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor za vitamin D • Estrogenski receptor • Receptor za kalcitonin • Kalcitonin • Paratiroidni hormon • Glukokortikoidni receptor • Androgenski receptor
KOMPONENTE KOSTNEGA MATRIKSA	<ul style="list-style-type: none"> • Kolagen tipa I αI • Kolagen tipa I αII • Osteokalcin • Osteonektin • Osteopontin
LOKALNI REGULATORJI	<ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1 • IGF-1 • IL-1 • IL-6 • RANKL/RANK/OPG sistem
DRUGO	<ul style="list-style-type: none"> • Kolagenaza • Vitamin D vezujoči protein • PPARG

1.3 PPAR γ

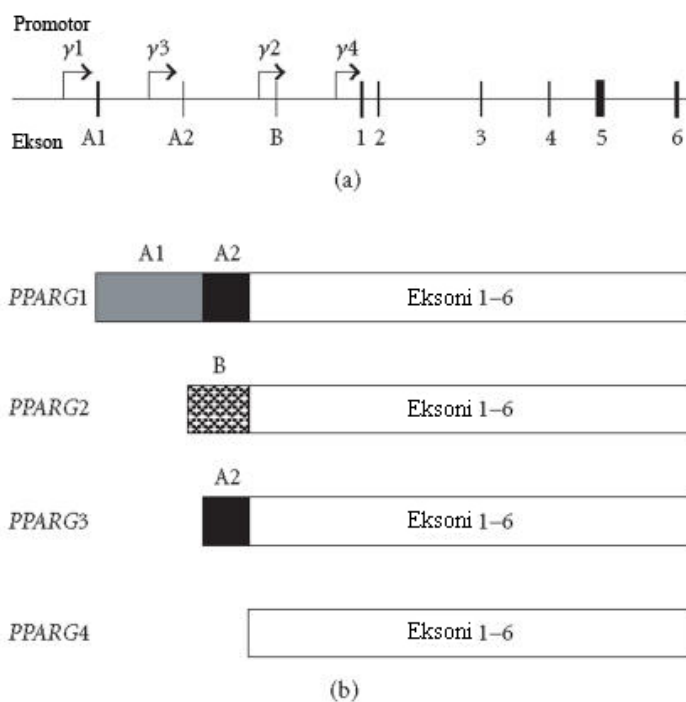
Protein PPAR γ je dobil ime po prvih raziskavah, kjer so ugotovili, da spodbuja peroksisomsko proliferacijo in tumorogenezo v jetrih pri miših, vendar tega pojava pri ljudeh niso opazili (19). PPAR γ je glavni koordinator transkripcijske kaskade za adipocitno diferenciacijo, v kateri se prekurzorska fibroblastna celica s pomočjo aktivacije PPAR γ in ostalih regulatornih proteinov diferencira preko nalaganja maščobnih kapljic v veliko maščobno vakuolo, kar je značilnost adipocitov (19). PPAR γ v kostnem mozgu aktivira diferenciacijo preadipocitov in zavira diferenciacijo preosteoblastov. J. Tamaki in sodelavci so pokazali, da je PPAR γ povezan z tudi izgubo kostne mase s starostjo (20).

1.3.1 Zgradba gena za PPAR γ

Gen *PPARG*, ki kodira za protein PPAR γ , se nahaja na kromosomu 3 (3p25). Gen kodira dve različni izoformi receptorjev, PPAR γ 1 in PPAR γ 2, in štiri različne mRNA (*PPARG1*, *PPARG2*, *PPARG3*, *PPARG4*), ki nastanejo kot posledica uporabe različnih promotorjev in različnega izrezovanja mRNA in ne kot posledica izražanja različnih genov (slika 5). Izoformi se razlikujeta v aminokislinskem zaporedju na N-terminalnem delu proteina. Skupno obema izoformama je šest eksonov, in sicer 1 ekson za N-terminalno regijo (A/B domena), 2 eksona za DNA-vezavno domeno (C regijo), 1 ekson za D regijo, 2 eksona za E/F regijo (21).

Protein PPAR γ 1 kodirajo 3 različni transkripti: *PPARG1*, *PPARG3* in *PPARG4*. mRNA *PPARG1* in *PPARG3* se med seboj razlikujeta v promotorjih. Tako je mRNA *PPARG1* sestavljena iz šestih skupnih eksonov in iz dodatnih dveh (A1 in A2), medtem ko ima mRNA *PPARG3* poleg skupnih šestih eksonov pripet le ekson A2. Ker eksona A1 in A2, nimata začetnega translacijskega kodona (AUG) se translacija pri mRNA *PPARG1* in mRNA *PPARG3* prične na začetku prvega skupnega eksona (ekson 1). Posledica tega so proteini, ki imajo enako aminokislinsko zaporedje (21, 22). mRNA *PPARG4* ne vsebuje nobenega od začetnih eksonov, ampak se neposredno prepiše v izoformo PPAR γ 1 (22).

Protein PPAR γ 2 najdemo samo v maščobnem tkivu in se sintetizira iz mRNA *PPARG2*. Izoforma PPAR γ 2 je na N-terminalnem delu za 30 aminokislin daljša kot izoforma PPAR γ 1. mRNA *PPARG2* vsebuje 6 kodirajočih eksonov ter dodaten ekson B, ki za razliko od eksonov A1 in A2 vsebuje tudi začetni translacijski kodon (AUG). Ekson B po zaključeni translaciji prispeva dodatnih 30 aminokislin na N-terminalnem delu proteina.



Slika 5: Struktura gena *PPARG*. Dve različni izoobliki PPAR γ 1 in PPAR γ 2 nastaneta z uporabo različnih promotorjev in različnega izrezovanja mRNA. Skupno obema izooblikama pa je 6 eksonov (obarvani belo). Izooblika PPAR γ 2 ima na N-terminalnem koncu dodan ekson B (črno bel vzorec), posledica tega pa je za 30 aminokislin daljši protein. mRNA *PPARG1* je sestavljena poleg šestih skupnih eksonov še iz dodatnih A1 (sivo obarvan) in A2 (črno obarvan), medtem ko ima mRNA *PPARG3* na N-terminalnem delu dodan le ekson A2. Ker eksona A1 in A2 nimata začetnega translacijskega kodona (AUG), se translacija prične na začetku prvega skupnega eksona (ekson 1). mRNA *PPARG4* je sestavljena samo iz šestih eksonov (22).

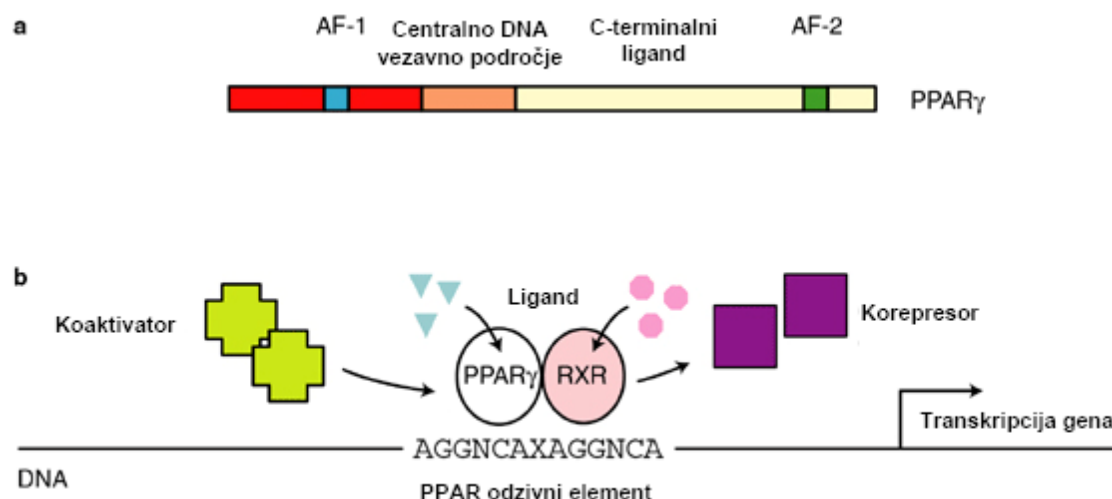
1.3.2 Vloga PPAR γ

PPAR γ je eden od treh jedrnih receptorjev PPAR. Primarno ga najdemo v belem maščobnem tkivu (22). Jedrni receptor, aktiviran s peroksisomskimi proliferatorji gama (PPAR γ), spada v družino transkripcijskih jedrnih dejavnikov (22), ki regulira številne fiziološke procese, kot so npr. homeostaza, celična diferenciacija in embriološke procese (24).

PPAR spadajo v isto družino kot steroidni in tiroidni hormoni, zato so jih povezali z metabolizmom ogljikovih hidratov, maščob in proteinov, celično rastjo in diferenciacijo, adipogenezo in imunskim odzivom (21). Tako PPAR γ vpliva na raven glukoze in inzulinsko rezistenco, zmanjša vnetni odgovor, zmanjša sintezo vnetnih presnovkov, kot so TNF, interlevkin-1, interlevkin-6 (25). Poleg tega PPAR γ vpliva tudi na kopičenje adipocitov pri ženskah z osteoporozo. Pokazali so, da delež adipocitov v votlinah kostnega mozga s starostjo pri moških in ženskah narašča, kar je povezano tudi z zmanjšanjem volumna trabekularne kostnine. Večji volumen adipocitov je pri bolnikih z osteoporozo obratno sorazmeren s hitrostjo kostne tvorbe (22).

1.3.3 Delovanje PPAR γ

PPAR γ je jedrni receptor, ki se veže na specifične odzivne elemente v DNA kot heterodimer z retinoidnimi X-receptorji (RXR) (slika 6). Na ta način PPAR γ spodbuja izražanje mnogih genov, povezanih z adipogenezo in lipidno presnovo. PPAR γ v kostnem mozgu aktivira diferenciacijo preadipocitov in zavira diferenciacijo preosteoblastov ter tako uravnava ravnotežje med osteoblastogenezo in adipogenezo. Vrsta liganda opredeljuje, kateri koaktivatorski proteini se bodo še vezali v kompleks ob vezavi na DNA. Tako je od ligandov, koaktivatorjev in vrste odzivnih elementov v promotorjih genov odvisno, kateri geni bodo aktivirani ob delovanju PPAR (19).



Slika 6: Struktura PPAR γ in način regulacije genov. (a) PPAR γ (receptor, aktiviran s proliferatorji peroksisomov γ) je tipičen jedrni protein, ki se veže na specifične odzivne elemente v DNA. Vključuje centralno DNA vezavno področje, C-terminalni ligand in dve področji za aktivacijo genov (AF-1 neodvisen ligand, AF-2 odvisen ligand za vezavo genov v komplekse). (b) PPAR γ veže ligand na receptor. Od vrste liganda je odvisno, kateri geni bodo aktivirani ob delovanju PPAR γ . Na heterodimer PPAR-RXR so vezani korepresorji. V splošnem so odzivni elementi za PPAR (PPRE) sestavljeni iz dveh ponovitev zaporedja AGGTCA, ki sta med seboj ločena z enim ali dvema nukleotidoma. Drugi način delovanja je transpresija, kjer PPAR izpodrivajo druge transkripcijske faktorje in tako zavirajo izražanje genov (26).

Aktivacija receptorja PPAR γ v človeškem organizmu se prične z vezavo liganda na receptor. Receptor PPAR γ je v jedru ves čas heterodimeriziran z retinoidnimi X-receptorji (RXR). RXR receptor namreč heterodimerizira s steroidnimi in tiroidnimi receptorji, kamor spadajo receptorji PPAR, receptor vitamina D in LXR (jetrni X receptor). Nanju sta na C konec proteina pripeta proteina (korepresorja), ki inaktivirata takšen kompleks. Za izoformo PPAR γ 2 so to najpogosteje molekule N-CoR (angl. nuclear receptor corepresor) in SMRT (angl. silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor). Ko se na AF-2 regijo receptorja pripne ligand, pride najprej do spremembe konformacijskega stanja, kar ima za posledico odcepitev inhibitornega proteina (korepresorja). Nato se heterodimer z vezanim ligandom preko DNA vezavne regije pripne na promotorsko regijo tarčnega gena. Del promotorske DNA, na katerega se pripne heterodimer, imenujemo PPRE (angl. peroxisome – proliferator response element), ki vsebuje heksamerne ponovitve 5' (AGGTCA) $_n$ 3', pri čemer X pomeni poljuben nukleotid. Ob vezavi kompleksa na PPRE

se nanj pripne koaktivator. Če je koaktivator acetil transferazni kompleks, le-ta najprej acilira histonska repa, kar spremeni obliko zavite DNA, čemur sledi pripenjanje polimeraze, ki prične s prepisovanjem reguliranega gena (22, 27, 28).

1.3.4 Znani polimorfizmi v genu *PPARG*

V genu *PPARG* so bile odkrite nekatere mutacije, povezane z monogenскими boleznimi. Mutacije Val290Met, Phe388Leu, Arg425Cys, Pro467Leu se nahajajo v vezavni domeni za ligand in so vzrok za t.i. sindrom rezistence na ligande PPAR γ . Poleg omenjenih mutacij, ki se pojavljajo pri redkih posameznikih, so v populacijah bolj pogosti nekateri polimorfizmi, od katerih sta najbolj preučevani mutaciji Pro12Ala in His477His v kodirajočih regijah ter polimorfizma -681C>G in -689C>T v promotorju (29).

Protein PPAR je vpleten v patologijo številnih bolezni, kot so debelost, sladkorna bolezen, ateroskleroza in rak. Do sedaj je bil najbolj preučevan polimorfizem Pro12Ala v povezavi z diabetesom tipa II (30). Prav tako so preučevali odnos polimorfizma Pro12Ala v genu *PPARG* pri sindromu policističnih jajčnikov, ki pa je pogost pri ženskah v rodni dobi in je povezan z velikim tveganjem za razvoj sladkorne bolezni tipa II (31). Študije so pokazale tudi povezanost polimorfizma Pro12Ala v genu *PPARG* v povezavi s prekomerno telesno maso pri ženskah (32).

Tiha mutacija His477His je bila odkrita pri ljudeh na 161. baznem paru (bp) šestega eksona gena *PPARG* in je navedena v literaturi tudi kot C161T ali C1431T. Dosedanje študije povezujejo tiho mutacijo His477His z zmanjšanim tveganjem za srčno-žilne bolezni, druge z zvišanim ITM (22). V štirih študijah so preučili polimorfizem His477His tudi pri boleznih kosti (20, 33, 34, 35). Dve študiji sta v azijski populaciji pokazali povezavo polimorfizma His477His s skupno MKG (20, 34).

2. NAMEN DELA

Protein PPAR γ (receptor, aktiviran s proliferatorji preoksisomov γ) je jedrni receptor, ki se veže na specifične odzivne elemente v DNA in na ta način spodbuja izražanje mnogih genov, povezanih predvsem z adipogenezo in lipidno presnovo. V kostnem mozgu PPAR γ aktivira diferenciacijo preadipocitov in zavira diferenciacijo preosteoblastov. Pokazali so, da je PPAR γ povezan tudi z izgubo kostne mase s starostjo. Nekateri genetski polimorfizmi v genu *PPARG*, ki kodira za PPAR γ , so pokazali povezanost z mineralno kostno gostoto.

Namen našega dela je določiti pogostnost polimorfizma His477His v promotorski regiji gena *PPARG* ter ugotoviti njegovo povezavo z mineralno kostno gostoto in biokemičnimi kazalci kostne premene v slovenski populaciji, ter tako oceniti njegov klinični pomen pri razvoju osteoporoze.

V ta namen bomo:

- v raziskavo vključili 814 preiskovancev, ki jim je bila odvzeta kri in izmerjena mineralna kostna gostota ter nekateri biokemični kazalci kostne premene;
- s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. RT-PCR – real time polymerase chain reaction) preiskovancem določili genotip za preiskovani polimorfizem;
- s statističnimi metodami poiskali povezavo med genotipi preiskovancev in mineralno kostno gostoto in biokemičnimi kazalci kostne premene ter tako določili njihov klinični pomen pri razvoju osteoporoze.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 SPLOŠNA OPOZORILA

Pri delu v laboratoriju smo uporabljali sterilen pribor za enkratno uporabo. Preden smo začeli z delom, smo potreben pribor (epruvete in nastavke za pipete) avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C ter nadtlakom 1 bar. Pri delu smo uporabljali avtoklavirano ultračisto vodo. Med delom smo pazili na čistočo, da smo se izognili kontaminaciji vzorcev in reagentov. Pred delom smo delovno površino in delovni pribor razkužili s 3 % natrijevim hipokloritom. Pred pripravo raztopin za reakcijo PCR smo pribor in delovno komoro za 25 minut osvetlili z UV-lučjo. Pri delu smo uporabljali zaščitno haljo in lateksne rokavice za enkratno uporabo.

3.2 OPIS PREISKOVANCEV

V raziskavo smo vključili 814 preiskovancev, ki smo jih razdelili v podskupine:

- Moški
- Premenopavzne ženske
- Pomenopavzne ženske
 - Zdrave pomenopavzne ženske
 - Osteoporozne pomenopavzne ženske
- Osteoporozne bolnice zdravljene z:
 - Raloksifenom
 - Alendronatom
- Preiskovanci po operaciji kolka (bolniki z osteoartrozo ali bolniki z nizkoenergijskim zlomom kolka)

Nekatere osteoporozne bolnice so po začetnem merjenju MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene začele z zdravljenjem. 56 pomenopavznih žensk z osteoporozo so eno leto zdravili z raloksifenom v odmerku 60 mg na dan. Dodatno so prejemale še holekalciferol (400 IU na dan) in kalcijev karbonat (1000 mg na dan). 52 pomenopavznih žensk z

osteoporozo so eno leto zdravili z alendronatom v odmerku 10 mg na dan. Dodatno so prejemale še 500 mg kalcijevega karbonata na dan ter 400 IU vitamina D₃ na dan.

3.3 MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE

Vsem preiskovancem so izmerili MKG kolka, vratu stegenice in MKG na področju ledvene hrbtenice z aparatom QRD-4500 (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) z metodo DXA (dvoenergijska rentgenska absorpciometrija). MKG so izmerili na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, v Splošni bolnišnici Celje ali Univerzitetnem kliničnem centru Maribor. Na osnovi izmerjenih vrednosti MKG pa so preiskovancem postavili diagnozo.

3.4 MERJENJE KONCENTRACIJ BIOKEMIČNIH KAZALCEV KOSTNE PREMENE

Vzorci krvi so odvzeli na tešče med 8:00 in 10:00 uro zjutraj. Plazmo oziroma serum so analizirali v rutinskem laboratoriju po navodilih proizvajalcev. Osteokalcin (OC) so v heparizirani plazmi izmerili z uporabo kemiluminiscenčne imunokemične metode (Imulite Osteocalcin, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). Serumsko kostno specifično alkalno fosfatazo (BALP) so izmerili z radioimunokemično metodo (Tande-R Ostase, Backman Coulter, Fullerton, CA, USA). Prokolagen I C-terminalni propeptid (CTX) so izmerili z encimsko imunološko metodo v serumu (Serum CrossLaps ELISA, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark), prav tako pa tudi serumski prosti topni RANKL (sRANKL – sRANKL ELISA, Biomedica, Vienna, Austria), OPG (Osteoprotegrin ELISA, Biomedica, Vienna, Austria) in katepsin K (Catepsin K ELISA, Biomedica, Vienna, Austria). Deoksipiridinolin (DPYR) je edini biokemični kazalec, ki so ga določili v urinu z encimsko imunološko metodo (Pyrilinks – D Metra BioSystem Inc., Mountain View, CA, ZDA).

3.5 IZOLACIJA DNA

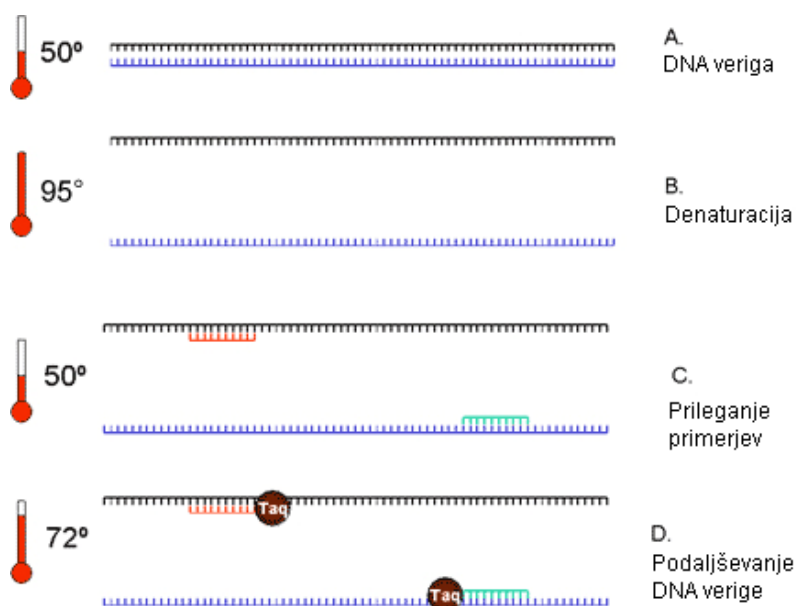
DNA smo predhodno izolirali iz levkocitov periferne venske krvi z metodo izsoljevanja proteinov po Millerjevem postopku (36) ali z uporabo reagenčnega kompleta FlexiGene DNA kit (QIAGEN) po navodilih proizvajalca (37).

3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (PCR; angl. Polymerase chain reaction) je ena izmed pomembnejših metod v raziskovalnih laboratorijih, čedalje večji pomen pa pridobiva tudi v diagnostičnih laboratorijih. Temelji na pomnoževanju zaporedja nukleotidov s pomočjo kratkih oligonukleotidnih začetnikov. Ti se pripnejo na končna dela tarčnega zaporedja in delujejo kot substrat za termostabilen encim DNA-polimerazo, ki z dodajanjem deoksinukleotidov omogoči nastanek komplementarnega zaporedja.

PCR obsega tri stopnje, ki si sledijo v ciklih (slika 7), in sicer:

- Denaturacija DNA pri temperaturi 90 - 95°C
- Pripenjanje oligonukleotidnih začetnikov pri temperaturi 50 - 60°C
- Podaljševanje komplementarne verige DNA pri temperaturi 70-78°C (32).



Slika 7: Stopnje PCR (38).

Vse tri stopnje predstavljajo en temperaturni cikel PCR. Reakcijo običajno sestavlja od 30 do 40 ponovitev temperaturnega cikla. Število kopij tarčnega nukleotidnega zaporedja se z vsakim ciklom podvoji. (39).

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. Real Time Polymerase Chain Reaction) ali kvantitativni PCR je laboratorijska tehnika, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR) in se uporablja za kvantifikacijo tarčne molekule DNA. Omogoča tako detekcijo kot kvantifikacijo specifičnega zaporedja DNA v vzorcu (40).

PCR v realnem času omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Pomnoževanje in detekcija produktov potekata istočasno. Temelji na detekciji fluorescentnega signala, ki nastane v sorazmerju s pomnoževanjem tarčne DNA. Kontinuirano spremljanje reakcije v vsakem ciklu nam omogoča, da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence vzorca od števila ciklov. PCR v realnem času omogoča lažjo, hitrejšo in bolj natančno kvantifikacijo DNA in RNA v primerjavi s tradicionalnimi metodami (40, 41).

Načinov za detekcijo produktov s PCR v realnem času je več, lahko pa jih tudi razdelimo v dve skupini, glede na to, ali z njimi zaznamo specifični produkt ali pa zaznamo tudi morebitno prisotne nespecifične produkte.

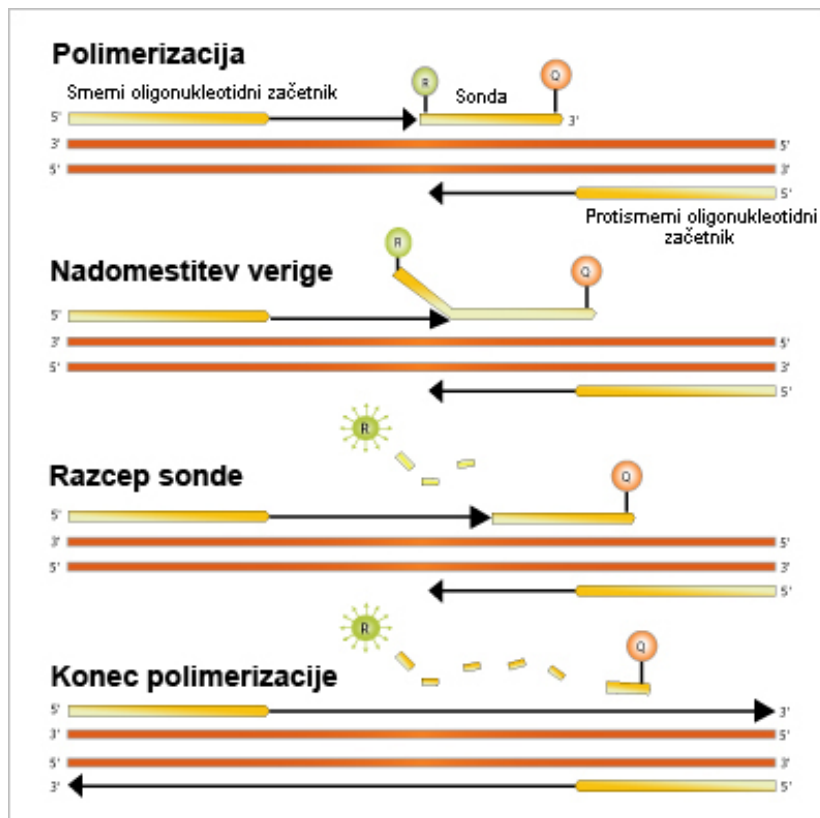
Nespecifični načini detekcije

Med nespecifične načine detekcije spadajo DNA vezavna barvila, kot je Sybr[®] Green I, ki ob vezavi na nastajajočo dvoverižno DNA odda fluorescenco. V stopnji prileganja je DNA enoverižna, barvilo je prosto in ne fluorescira. Intenziteta fluorescence se sorazmerno povečuje s količino nastale dvoverižne DNA (40, 42). Osnovni zahtevi za DNA vezavna barvila pri uporabi PCR v realnem času sta, da barvilo poveča fluorescenco, ko je vezano v dvoverižno DNA, ter da ne inhibira PCR (43).

Specifični načini detekcije

Sistemi za PCR v realnem času so bili izboljšani z uvedbo s fluorofori označenih sekvenčno specifičnih sond, ki uporabljajo 5'-nukleazno aktivnost DNA-polimeraze (44).

Hidrolizirajoče sonde TaqMan fluorescirajo zaradi hidrolize sonde, pri kateri se poveča razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem, kar onemogoči prestrežanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato sorazmerno s količino produkta PCR naraste (41, 43).



Slika 8: Shematski prikaz reakcije RT-PCR v realnem času z uporabo sond TaqMan.

Stopnja polimerizacije se prične, ko se oligonukleotidna začetnika in specifična sonda TaqMan, ki je označena s fluorescinom (R) na 5' in dušilcem (Q) na 3' koncu, vežejo na tarčno DNA. V fazi nadomestitve verige DNA-polimeraze Taq sintetizira komplementarno verigo tarčne DNA. Ko doseže sondo, DNA-polimeraza Taq zaradi svoje 5'-nukleazne aktivnosti povzroči hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde. Zaradi hidrolize pride do razcepa sonde, zato se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem poveča, hkrati pa se onemogoči prestrežanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila naraste in je sorazmerna količini produkta PCR (45).

Reakcija PCR v realnem času, ki temelji na uporabi sond TaqMan[®] (slika 8), izkorišča 5'-nukleazno aktivnosti DNA-polimeraze, ki med procesom PCR sondo razgradi. Oligonukleotidna sonda je sestavljena iz fluorescentnega reporterskega barvila (FAM ali VIC) na 5' koncu in dušilca na 3' koncu. Sondi FAM in VIC se razlikujeta v enem baznem

paru, tako da ustreza ena izmed sond mutiranemu zaporedju (alel 1), druga pa nemutiranemu (alel 2) zaporedju (46).

3.6.1 Priprava reakcijske zmesi

Za izvedbo reakcije RT-PCR smo najprej morali pripraviti reakcijsko zmes. Komponente in volumski deleži komponent za pripravo reakcijske zmesi so bili priporočeni s strani proizvajalca. Te komponente in volumske deleže smo preizkusili in ugotovili, da ni potrebna optimizacija. Za vsako serijo smo pripravili skupno reakcijsko zmes. Pripravljeno reakcijsko zmes smo dobro premešali in jo razdelili v luknjice na mikrotitrski ploščici. V vsako luknjico smo nato dodali še določen volumen vzorčne DNA, ki smo jo predhodno razredčili na koncentracijo 3 ng/ μ L. V vsaki seriji smo iz reakcijske zmesi pripravili še slepi vzorec, ki pokaže, ali je med delom prišlo do kontaminacije z DNA (negativna kontrola). V slepi vzorec smo namesto vzorčne DNA dodali ultračisto vodo. Ploščico s 384 vdolbinicami, ki so vsebovala reakcijsko zmes in vzorčno DNA, smo previdno pokrili s samolepilno folijo ter jo centrifugirali pri 2100 obratih/min 5 minut.

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za pomnožitev enega vzorca DNA.

KOMPONENTA	VOLUMEN (μ L)
5x HOT FIREPol Prole qPCR Mix Plus (no ROX)	1,2
Visoko prečiščena voda	1,65
sonde TaqMan [®] (20x)	0,3
Skupni volumen	3,15
Raztopina DNA	2,85
Končni volumen	6


3.6.2 Optimizacija reakcijskih pogojev

Pogoji za RT-PCR pomnoževanje predela 6. eksona gena PPARG so bili priporočeni s strani proizvajalca. Mi smo te pogoje predhodno preizkusili in ugotovili, da optimizacija ni potrebna. Ploščico z reakcijsko zmesjo smo vstavili v ciklični pomnoževalnik

LightCycler[®] 480 Real-Time PCR system, ki po predhodno pripravljenem računalniškem protokolu v določenih časovnih intervalih spreminja temperaturo.

Preglednica V: Reakcijski pogoji za pomnoževanje odseka *PPARG*.

STOPNJA REAKCIJE RT-PCR	T	ČAS
Začetna denaturacija	95°C	15 min
Denaturacija	95°C	20 s
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov in sond ter podaljševanje	60°C	60 s



3.6.3 Materiali in oprema

3.6.3.1 RT-PCR

REAGENTI:

- Delovne raztopine DNA, koncentracije 6 ng/μL
- Visoko prečiščena voda (bidestilirana, avtoklavirana, pripravljena z aparatom ELGA, Purelab Classic)
- reagenčna zmes 5x HOT FIREPol Prole qPCR Mix Plus (no ROX)
- 20x TaqMan[®] SNP (rs3856806) Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), ki vsebuje dva oligonukleotidna začetnika in dve TaqMan[®] MGB sondi

APARATURE IN PRIBOR:

- Delovna komora z UV lučko (Kron, Ljubljana, Slovenija)
- Polavtomatske pipete Eppendorf
- Nastavki za pipete, avtoklavirani (Sarstedt)
- Vorteks (FVL-2400N, Combi-spin, BIOSAN)
- 0,5 mL epruvete, avtoklavirane (Sarstedt)
- Ciklični pomnoževalnik LightCycler[®] 480 Real-Time PCR system (Roche Applied Science)

- Mikrotitrne ploščice (96 in 384 vdolbinic – MicroAmp® Applied Biosystems)
- Samolepilna folija (MicroAmp® Applied Biosystems)
- Mikrocentrifuga Mikro-242 (TEHTNICA, Železniki, Slovenija)
- Avtoklav A-21 (Kambič, Laboratorijska oprema)

3.7 STATISTIČNE METODE

3.7.1 Hardy – Weinbergovo načelo

Hardy – Weinbergovo načelo pravi, da bo pogostost posameznih genotipov ostala enaka, če bo dovolj velika populacija in če bosta nanjo vplivalo samo naključno prerazporejanje teh alelov pri nastanku spolnih celic in njihovo naključno kombiniranje ob oploditvi. Pravimo, da je takšna populacija v Hardy-Weinbergovem ravnovesju in se ne razvija (47).

3.7.2 Kolmogorov – Smirnov test normalnosti porazdelitve

Skupine preiskovancev smo razdelili glede na genotip (CC, CT in TT). Za vsako od podskupin smo izračunali srednje vrednosti in standardne deviacije MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene. Za statistično obdelavo smo uporabili program SPSS for Windows, verzija 16.1. (SPSS Inc., Illinois, ZDA).

Z Kolmogorov-Smirnov testom smo preverili normalnost porazdelitve pri vseh izmerjenih parametrih v posamezni genotipski skupini. Postavili smo ničelno hipotezo, da je porazdelitev izmerjenih parametrov med posameznimi genotipskimi skupinami normalna. V skupinah preiskovancev, kjer je bila porazdelitev parametra normalna, smo v nadaljnji statistični analizi uporabili parametrične teste, če pa je bila porazdelitev nenormalna pa neparametrične teste.

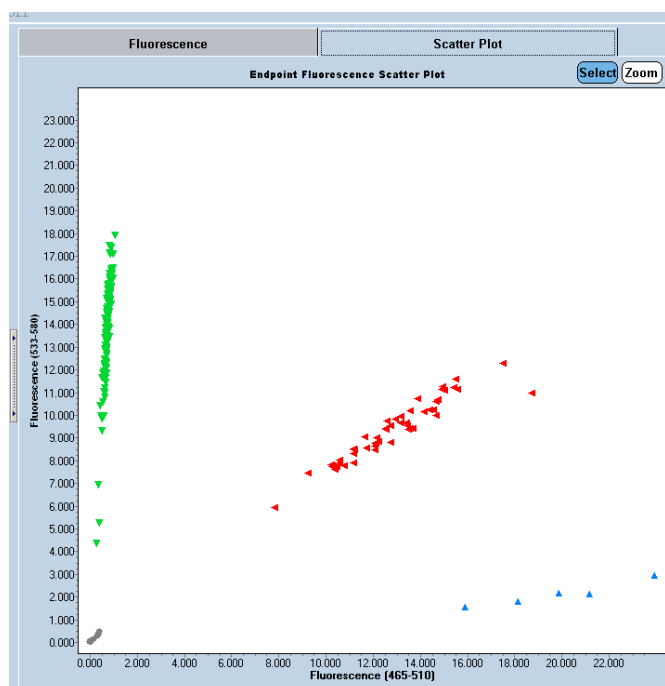
3.7.3 Statistična analiza razlik v parametrih med genotipskimi podskupinami

Genotip TT je imelo zelo malo preiskovancev, zato smo v večih podskupinah združili genotipe TT z genotipi CT in primerjali povprečne vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene med genotipskima podskupinama CC in CT+TT. Za parametre (MKG in biokemične kazalce kostne premene), ki so se v posamezni skupini preiskovancev med dvema genotipskima podskupinama (CC in CT+TT) porazdeljevali normalno, smo uporabili t-test, za parametre, ki se niso porazdeljevali normalno, pa Mann-Whitneyev test. Za parametre, ki so se med tremi genotipskimi podskupinami (CC, CT, TT) v posamezni skupini preiskovancev porazdeljevali normalno, smo uporabili test ANOVA. Za parametre, ki se med tremi genotipskimi podskupinami niso porazdeljevali normalno, pa smo uporabili Kruskal-Wallisov test. Če je bila vrednost p večja od 0,05 smo zaključili, da med genotipskimi podskupinami ni statistično značilne razlike pri analizirani spremenljivki. Če pa so bile vrednosti p manjše od 0,05 pa smo dokazali statistično značilno razliko pri določenem parametru med genotipskimi podskupinami v skupini preiskovancev.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZVEDBA GENOTIPIZACIJE

Vse vzorce je bilo potrebno predhodno razredčiti na koncentracijo 3 ng/μL, saj je za izvedbo genotipizacije s sondami Taqman potrebna količina DNA 2- 20 ng. Za vzorce, pri katerih genotipizacija ni bila uspešna, smo osnovno raztopino DNA ponovno redčili do končne koncentracije 6 ng/μL. Z vnosom večje količine DNA v reakcijsko zmes je bila genotipizacija večkrat uspešna, saj smo na ta način vnesli tudi več tarčne DNA.



Slika 9: Prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan[®]. Legenda: zelena barva: genotip CC, rdeča barva: genotip CT, modra barva: genotip TT.

Slika 9 prikazuje rezultate genotipizacije s sondami TaqMan[®], pri kateri pride do porasta fluorescence FAM ($\lambda = 533-580$ nm) in/ali VIC ($\lambda = 465-510$ nm). S pomočjo merjenja fluorescenčnega signala smo iz slike odčitali rezultate (preglednica VI).

Preglednica VI: Povezava med fluorescenčnim signalom in genotipom.

SIGNAL SONDE	GENOTIP
FAM	CC
VIC, FAM	CT
VIC	TT

4.2 UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMA His477His

Genski polimorfizem pomeni prisotnost dveh ali več različnih genotipov v neki populaciji in se pojavlja pri več kot 1% populacije. Pogostnost polimorfizma His477His v genu *PPARG* v slovenski populaciji smo izračunali na osnovi dobljenih rezultatov genotipizacije 814 vzorcev DNA. Frekvence (relativne frekvence) genotipov v celotni skupini preiskovancev so 71,74 % : 25,43 % : 2,83 % za genotipe CC : CT : TT.

Preglednica VII: Frekvence (%) genotipov za preiskovani polimorfizem v posamezni skupini preiskovancev.

SKUPINA	CC	TC	TT
Moški	63,2	29,1	2,6
Premenopavzne ženske	68,4	22,8	3,5
Pomenopavzne ženske	67,7	23,5	2,5
Zdrave pomenopavzne ženske	71,9	21,7	2,1
Osteoporozne pomenopavzne ženske	63,7	25,3	2,9
Pomenopavzne ženske, zdravljene z raloksifenom	67,9	26,8	1,8
Pomenopavzne ženske, zdravljene z alendronatom	71,2	23,1	1,9
Bolniki z operacijo kolka zaradi osteoartroze	61,1	31,5	3,7
Bolniki z operacija kolka zaradi nizkoenergijskega osteoporoznega zloma	60,4	20,9	1,1

Tudi raziskave nekaterih drugih populacij so pokazale podobne frekvence genotipov polimorfizma His477His (rs3856806), čeprav lahko opazimo določena odstopanja (preglednica VIII). Genotip TT je najpogostejši pri rumeni rasi, medtem ko pri Afričanih

sploh ni prisoten. Genotip CC je najpogostejši pri črni rasi, medtem ko je pri rumeni rasi prisoten le pri 73,3 % oseb (48).

Preglednica VIII: Frekvence genotipov polimorfizma His477His pri Evropejcih, Azijcih in Afričanih (48).

	CC	CT	TT
Evropejci	83,3	13,3	3,3
Azijci	73,3	22,2	4,4
Afričani	93,3	6,7	0,0

S χ^2 testom smo pokazali statistično neznačilno razliko med opazovano genotipsko frekvenco, ki smo jo dobili pri eksperimentalnem delu, in pričakovano gensko frekvenco, ter na ta način potrdili veljavnost Hardy-Weinbergovega načela. V preučevani slovenski populaciji se frekvence genotipov za polimorfizem His477His porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (preglednica IX).

Preglednica IX: Analiza skladnosti porazdelitev genotipov v posameznih podskupinah preiskovancev s Hardy-Weinbergovim ravnovesjem. (A = Moški, B = Premenopavzne ženske, C = Pomenopavzne ženske, D = Zdrave pomenopavzne ženske, E = Osteoporozne pomenopavzne ženske, F = Pomenopavzne ženske, zdravljene z raloksifenom, G = Pomenopavzne ženske, zdravljene z alendronatom)

Genotip	A	B	C	D	E	F	G
CC	74	39	325	169	156	38	37
CT	34	13	113	51	62	15	12
TT	3	2	12	5	7	1	1
χ^2	0,15	0,46	0,33	0,24	0,08	0,12	0,0
P	0,70	0,50	0,57	0,62	0,78	0,73	0,98

S pomočjo računalniškega programa smo določili vrednost P in ugotovili, ali se naši genotipi v populaciji porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinbergovim načelom. Vrednosti dokazujejo, da je bila razporeditev genotipov pri vseh podskupinah preiskovancev v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

4.3 OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA HIS477HIS V GENU PPARG Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE

Preiskovance smo razdelili v 6 skupin:

- Moški, n = 117
- Premenopavzne ženske, n = 57
- Pomenopavzne ženske, n = 475
 - Zdrave pomenopavzne ženske, n = 235
 - Osteoporozne pomenopavzne ženske, n = 240
- Pomenopavzne ženske, zdravljene z raloksifenom, n = 56
- Pomenopavzne ženske, zdravljene z alendronatom, n = 52
- Bolniki z operativnim posegom na kolku, n = 137
 - Nizkoenergijski osteoporozni zlom, n = 83
 - Osteoartroza, n = 54

Vsem preiskovancem je bila izmerjena MKG kolka (MKG_{tot}), vratu stegenice (MKG_{fn}) ter predela ledvene hrbtenice (MKG_{ls}). Izmerjeni so bili tudi biokemični kazalci kostne premene. Klinične značilnosti posameznih skupin preiskovancev prikazuje preglednica X.

Preglednica X: Klinične značilnosti preiskovancev posamezne podskupine

4.3.1 Skupina moških

V to skupino smo vključili 117 preiskovancev, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice in serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX in OPG. Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov in rezultate statističnega testa prikazuje preglednica XI. Različno število preiskovancev (N) pri posameznem parametru je posledica tega, da vsem preiskovancem niso bili izmerjeni vsi parametri.

Preglednica XI: Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene pri moških ter rezultati statistične obdelave (N=število preiskovancev, MKGfn = MKG vratu stegenice, MKGtot = MKG kolka, MKGls = MKG predela ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = C-terminalni propeptid kolagena I, OPG = osteoprotegerin).

Genotip	*MKGfn (kg/m ²)	*MKGtot (kg/m ²)	*MKGls (kg/m ²)	**RANKL (pmol/L)	*OC (µg/L)	**CTX (pmol/L)	*OPG (pmol/L)
CC	0,798 \pm 0,161 (N=59)	1,023 \pm 0,174 (N=59)	1,050 \pm 0,177 (N=73)	0,18 \pm 0,13 (N=14)	9,6 \pm 4,3 (N=14)	1928 \pm 837 (N=12)	5,2 \pm 1,3 (N=14)
CT + TT	0,838 \pm 0,155 (N=26)	1,030 \pm 0,130 (N=26)	1,077 \pm 0,178 (N=37)	0,20 \pm 0,11 (N=8)	10,6 \pm 7,2 (N=8)	2238 \pm 1511 (N=7)	5,8 \pm 2,0 (N=8)
p	0,281	0,847	0,455	0,769	0,690	0,767	0,449

*t-test, **Mann-Whitney

V skupini moških nismo za posamezen parameter določili statistično značilne razlike med genotipskima podskupinama CC in CT + TT, torej nismo dokazali povezanosti polimorfizma niti z MKG niti z biokemičnimi kazalci kostne premene. Ker smo genotip TT določili samo pri treh preiskovancih, smo v statistični analizi to skupino priključili preiskovancem z genotipom CT. Za potrditev pomena in vloge polimorfizma His477His pri moških bi morali v nadaljnje raziskave vključiti večjo skupino preiskovancev.

4.3.2 Skupina premenopavznih žensk

V statistično analizo smo vključili 57 premenopavznih žensk, ki smo izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice in serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX, BALP, OPG in katepsina K. Srednje vrednosti in standardne deviacije izmerjenih parametrov in rezultate statistične obdelave smo prikazali v preglednici XII.

Preglednica XII: Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih ženskah (MKG_{fn} = MKG vratu stegenice, MKG_{tot} = MKG kolka, MKG_{ls} = MKG predela ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = C-terminalni propeptid kolagena I, BALP = kostno specifična alkalna fosfataza, RANKL = ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika κ B, OPG = osteoprotegerin, katepsin K).

	*MKG _{fn} (kg/m ²)	*MKG _{tot} (kg/m ²)	*MKG _{ls} (kg/m ²)	**RANKL (pmol/L)	*OC (μ g/L)	*CTX (pmol/L)	*BALP (μ g/L)	*OPG (pmol/L)	*katepsin K (pmol/L)
CC	0,781 \pm 0,074 (N=39)	0,922 \pm 0,084 (N=39)	0,990 \pm 0,104 (N=39)	0,51 \pm 0,48 (N=39)	10,8 \pm 4,6 (N=39)	2569 \pm 1388 (N=38)	8,1 \pm 3,1 (N=39)	3,9 \pm 0,9 (N=39)	11,1 \pm 24,0 (N=39)
CT + TT	0,774 \pm 0,089 (N=15)	0,895 \pm 0,098 (N=14)	1,018 \pm 0,125 (N=15)	0,49 \pm 0,38 (N=15)	10,1 \pm 5,1 (N=15)	3022 \pm 1415 (N=15)	8,6 \pm 3,2 (N=15)	3,8 \pm 0,9 (N=15)	3,9 \pm 4,7 (N=15)
p	0,775	0,321	0,407	0,487	0,601	0,291	0,647	0,868	0,359

*t-test, **Mann-Whitney

V skupini premenopavznih žensk nismo za noben parameter določili statistično značilne razlike med genotipoma CC in CT + TT, kar pomeni, da nismo dokazali povezanosti polimorfizma His477His z MKG in preučevanimi biokemičnimi kazalci kostne premene. Ker smo genotip TT določili samo pri dveh preiskovankah, smo ti dve preiskovanki v statistični analizi priključili preiskovankam z genotipom CT. Ker je skupina premenopavznih preiskovank relativno majhna, bi za potrditev kliničnega pomena preučevanega polimorfizma potrebovali večjo skupino.

4.3.3 Skupina pomenopavznih žensk

V statistično analizo smo vključili 475 pomenopavznih žensk, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka ter področja ledvene hrbtenice in serumske vrednosti CTX, osteokalcina, BALP, RANKL in OPG. Srednje vrednosti in standardne deviacije izmerjenih parametrov ter rezultate statistične obdelave prikazuje preglednica XIII.

Preglednica XIII: Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih ženskah (MKGfn = MKG vratu stegenice, MKGtot = MKG kolka, MKGls = predela ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = C-terminalni propeptid kolagena I, BALP = kostno specifična alkalna fosfataza, RANKL = ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika κ B, OPG = osteoprotegerin).

Genotip	*MKGfn (kg/m ²)	*MKGtot (kg/m ²)	*MKGls (kg/m ²)	**RANKL (pmol/L)	*OC (μ g/L)	*CTX (pmol/L)	**BALP (μ g/L)	*OPG (pmol/L)
CC	0,696 \pm 0,124 (N=325)	0,839 \pm 0,146 (N=324)	0,860 \pm 0,167 (N=323)	0,35 \pm 0,45 (N=107)	22,52 \pm 12,59 (N=100)	3903 \pm 1979 (N=107)	12,2 \pm 5,0 (N=108)	5,6 \pm 1,7 (N=138)
CT	0,688 \pm 0,124 (N=113)	0,830 \pm 0,146 (N=112)	0,851 \pm 0,159 (N=113)	0,39 \pm 0,47 (N=39)	19,5 \pm 12,3 (N=41)	4117 \pm 1998 (N=39)	12,9 \pm 5,8 (N=41)	5,6 \pm 1,9 (N=48)
TT	0,679 \pm 0,098 (N=12)	0,806 \pm 0,089 (N=12)	0,867 \pm 0,111 (N=12)	0,25 \pm 0,13 (N=7)	22,70 \pm 7,85 (N=5)	5122 \pm 2609 (N=7)	11,7 \pm 4,6 (N=4)	5,5 \pm 1,0 (N=8)
p	0,768	0,652	0,859	0,975	0,428	0,283	0,959	0,965

*ANOVA, **Kruskal-Wallis test

V skupini pomenopavznih žensk nismo dokazali statistično značilnih razlik med parametri pri vseh treh genotipih, torej pri njih nismo pokazali vpliva na tveganje za nastanek osteoporoze.

Skupino pomenopavznih žensk smo razdelili v skupino zdravih in osteoporoznih pomenopavznih žensk, na osnovi merjenja MKG z DXA. Znižanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje MKG v zgodnji odrasli dobi, z upoštevanjem spola in rase, kaže na prisotnost osteoporoze (47).

4.3.3.1 Zdrave pomenopavzne ženske

V statistično analizo smo vključili 235 zdravih pomenopavznih žensk, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice ter serumske vrednosti CTX, RANKL, OC, BALP, OPG in katepsina K. Srednje vrednosti in standardne deviacije izmerjenih parametrov ter rezultati statistične analize so prikazani v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih ženskah (MKGfn = MKG vratu stegenice, MKGtot = MKG kolka, MKGls = MKG področja ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = C-terminalni propeptid kolagena I, BALP = kostno specifična alkalna fosfataza, OPG = osteoprotegerin, RANKL = ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B).

Genotip	*MKGfn (kg/m ²)	*MKGtot (kg/m ²)	*MKGls (kg/m ²)	**RANKL (pmol/L)	*OC (μ g/L)	*CTX (pmol/L)	*BALP (μ g/L)	*OPG (pmol/L)	**Katepsin K (pmol/L)
CC	0,763 \pm 0,118 (N=169)	0,917 \pm 0,138 (N=168)	0,969 \pm 0,145 (N=168)	0,40 \pm 0,50 (N=72)	15,4 \pm 5,1 (N=50)	3690 \pm 1692 (N=50)	12,4 \pm 4,3 (N=30)	4,9 \pm 1,5 (N=72)	4,2 \pm 5,1 (N=29)
CT + TT	0,764 \pm 0,118 (N=56)	0,915 \pm 0,126 (N=56)	0,983 \pm 0,113 (N=56)	0,35 \pm 0,40 (N=30)	14,3 \pm 5,8 (N=22)	4348 \pm 2140 (N=28)	10,3 \pm 2,8 (N=12)	5,5 \pm 1,6 (N=30)	2,5 \pm 2,5 (N=11)
p	0,738	0,942	0,510	0,324	0,415	0,112	0,129	0,107	0,555

*t-test, **Mann-Whitney test

V skupini zdravih pomenopavznih žensk nismo dokazali statistično značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi parametrov pri genotipskih podskupinah CC in CT + TT, kar pomeni, da nismo dokazali povezanosti polimorfizma niti z MKG, niti z biokemičnimi kazalci kostne premene.

4.3.3.2 Osteoporozne pomenopavzne ženske

V statistično analizo smo vključili 240 osteoporoznih pomenopavznih žensk, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice ter serumske vrednosti CTX, RANKL, OC, BALP, OPG ter katepsina K. Srednje vrednosti in standardne deviacije parametrov ter rezultate statistične obdelave prikazuje preglednica XV.

Preglednica XV: Vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah (MKGfn = MKG vratu stegenice, MKGtot = MKG kolka, MKGls = MKG področja ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = C-terminalni propeptid kolagena I BALP = kostno specifična alkalna fosfataza, RANKL = ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, OPG = osteoprotegerin, katepsin K).

Genotip	*MKGfn (kg/m ²)	*MKGtot (kg/m ²)	*MKGls (kg/m ²)	**RANKL (pmol/L)	*OC (μ g/L)	*CTX (pmol/L)	*BALP (μ g/L)	*OPG (pmol/L)	**Katepsin K (pmol/L)
CC	0,624 \pm 0,084 (N=156)	0,755 \pm 0,102 (N=156)	0,742 \pm 0,091 (N=155)	0,24 \pm 0,30 (N=35)	29,6 \pm 13,9 (N=50)	4291 \pm 2392 (N=38)	12,2 \pm 5,3 (N=78)	5,6 \pm 1,7 (N=138)	1,4 \pm 1,9 (N=5)
CT + TT	0,621 \pm 0,076 (N=69)	0,755 \pm 0,094 (N=68)	0,746 \pm 0,088 (N=69)	0,41 \pm 0,503 (N=16)	25,0 \pm 13,7 (N=24)	4148 \pm 2093 (N=18)	13,7 \pm 6,2 (N=33)	5,6 \pm 1,7 (N=56)	1,5 \pm 1,4 (N=7)
p	0,792	0,962	0,739	0,325	0,183	0,829	0,187	0,253	0,868

*t-test, **Mann-Whitney test

V skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk nismo pokazali statistično značilne razlike med genotipskima podskupinama CC in CT + TT za posamezen parameter in tako nismo dokazali vpliva polimorfizma His477His na razvoj osteoporoze.

4.3.4 Farmakogenetska analiza

Po postavljeni diagnozi osteoporozne pomenopavzne ženske zdravile z raloksifenom ali alendronatom. Biokemične kazalce kostne premene in MKG smo jim izmerili pred samim zdravljenjem in po enem letu zdravljenja. Poskušali smo ugotoviti, ali je polimorfizem His477His povezan z odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom.

4.3.4.1 Zdravljene z raloksifenom

V skupino je bilo vključenih 56 bolnih pomenopavznih žensk, ki so se eno leto zdravile z raloksifenom. MKG in biokemične kazalce OC, BALP in CTX (prečna premereževalca – piridinolin in deokspiridinolin) smo jim izmerili pred začetkom zdravljenja in pa po samem zdravljenju. V preglednici XVI so prikazane srednje vrednosti in standardne deviacije sprememb parametrov za posamezen genotip in rezultati statističnih testov.

Preglednica XVI: Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) sprememb MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah, zdravljenih z raloksifenom (MKGfn = sprememba MKG vratu stegenice po 1 letu zdravljenja, dMKGtot = sprememba MKG kolka po 1 letu zdravljenja, dMKGls = sprememba MKG področja ledvene hrbtenice po 1 letu zdravljenja, dOC = sprememba osteokalcina po 1 letu zdravljenja, dBALP = sprememba kostno specifične alkalne fosfataze po 1 letu zdravljenja, dCTX).

Genotip	*dMKGfn (%)	**dMKGtot (%)	*dMKGls (%)	*dOC (%)	*dCTX (%)	*dBALP (%)
CC	0,967 \pm 5,057 (N=38)	-1,259 \pm 18,217 (N=38)	2,156 \pm 4,511 (N=38)	-24,5 \pm 19,5 (N=37)	-29,4 \pm 25,6 (N=37)	-21,8 \pm 23,1 (N=34)
CT + TT	3,016 \pm 5,714 (N=16)	0,918 \pm 2,541 (N=16)	1,514 \pm 4,695 (N=16)	-25,5 \pm 16,2 (N=16)	-21,1 \pm 30,5 (N=16)	-28,9 \pm 14,1 (N=13)
p	0,196	0,415	0,639	0,861	0,308	0,307

*t-test, **Mann-Whitney

V skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk, ki so bile zdravljene z raloksifenom, nismo dokazali statistično značilnih razlik pri parametrih med genotipskima podskupinama CC in CT + TT, kar pomeni, da vpliva polimorfizma His477His na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom nismo dokazali.

4.3.4.2 Zdravljene z alendronatom

V raziskavo smo vključili 52 osteoporoznih pomenopavznih žensk, ki so se eno leto zdravile z alendronatom. MKG in biokemične kazalce OC, BALP ter deoksipiridinolin smo jim izmerili pred samim začetkom zdravljenja in po enem letu zdravljenja. V preglednici XVII so prikazane srednje vrednosti in standardne deviacije sprememb parametrov za posamezen genotip ter rezultati statističnih testov.

Preglednica XVII: Vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) sprememb MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah, zdravljenih z alendronatom (dMKGfn = sprememba MKG vratu stegenice po 1 letu zdravljenja, dMKGtot = sprememba MKG kolka po 1 letu zdravljenja, dMKGls = sprememba MKG predela ledvene hrbtenice po 1 letu zdravljenja, dOC = sprememba osteokalcina po 1 letu zdravljenja, sBALP = sprememba kostno specifične alkalne fosfataze po 1 letu zdravljenja, dDPYR = sprememba deoksipiridolina po 1 letu zdravljenja).

Genotip	*dMKGls (%)	*dMKGtot (%)	*dOC (%)	**dBALP (%)	*dDPYR (%)
CC	7,393 \pm 4,003 (N=32)	4,109 \pm 3,513 (N=32)	58,6 \pm 25,1 (N=32)	45,8 \pm 33,8 (N=23)	67,48 \pm 30,1 (N=34)
CT + TT	4,363 \pm 5,326 (N=12)	4,102 \pm 1,981 (N=12)	51,7 \pm 8,5 (N=12)	39,5 \pm 8,7 (N=10)	80,1 \pm 33,4 (N=12)
p	0,048	0,994	0,360	0,283	0,231

*t-test, **Mann-Whitney

Pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah, zdravljenih z alendronatom, je odstotek prirasta MKGls pri genotipu CC (7,393 \pm 4,003) statistično značilno večji ($p=0,048$) kot pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah z genotipom CT + TT (4,363 \pm 5,326). Sklepamo lahko, da genotip CC vpliva na boljšo odzivnost na zdravljenje z alendronatom. Ker smo genotip TT določili pri samo eni preiskovanki, smo to preiskovanko v statistični analizi priključili preiskovankam z genotipom CT. Pri ostalih parametrih nismo dokazali statistično značilnih razlik v povprečnih vrednostih med genotipi.

4.3.5 Zlomi

V to skupino smo vključili 137 pomenopavznih žensk po operaciji kolka, ki je bila posledica osteoartroze ali nizkoenergijskega osteoporoznega zloma. Frekvence genotipov smo med seboj primerjali s χ^2 testom, rezultati pa so podani v preglednici XVIII. Razdelili smo jih v skupine:

- Primerjava med preiskovanci z osteoartrozo in nizkoenergijskim osteoporoznim zlomom kolka (primerjava A)
- Primerjava med preiskovanci z nizkoenergijskim osteoporoznim zlomom kolka in zdravimi pomenopavznimi ženskami brez zloma kolka (primerjava B)
- Primerjava med preiskovanci z nizkoenergijskim osteoporoznim zlomom kolka in pomenopavznimi ženskami z osteoporozo in brez zloma kolka (primerjava C)
- Primerjava med preiskovanci z nizkoenergijskim osteoporoznim zlomom kolka in pomenopavznimi ženskami ter starejšimi moškimi brez zloma kolka (primerjava D)
- Primerjava med preiskovanci z nizkoenergijskim osteoporoznim zlomi in pomenopavznimi osteoporoznimi ženskami brez zloma (primerjava E)

Preglednica XVIII: Rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih ženskah z zlomom.

	PRIMERJAVA SKUPIN :				
	A	B	C	D	E
p	0,399	0,638	0,812	0,789	0,765

V skupini pomenopavznih žensk z zlomi nismo dokazali statistično značilnih razlik med frekvencami genotipov v primerjanih podskupinah. Sklepamo lahko, da polimorfizem His477His ne vpliva na tveganje za osteoporozni zlom.

4.3.6 Primerjava rezultatov z objavljenimi študijami

V našo raziskavo smo vključili 814 preiskovancev, pri katerih smo z metodo RT-PCR, določili genotipe. V skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk, zdravljenih z alendronatom, smo potrdili povezavo med polimorfizmom His477His in spremembo MKG predela ledvene hrbtenice po enem letu zdravljenja ($p=0,048$). Naša raziskava je prva preučevala odzivnost bolnic na zdravljenje z alendronatom, zato teh rezultatov ne moremo primerjati z drugimi študijami. Pri ostalih preiskovanih podskupinah povezave polimorfizma His477His ter MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene nismo pokazali.

Rhee E. J. in sodelavci v študiji, v katero so vključili 263 zdravih korejskih premenopavznih in pomenopavznih žensk, niso našli povezave med polimorfizmom His477His v genu *PPARG* in MKG (33). Ogawa S. s sodelavci je v študiji, v katero so bile vključene 404 zdrave pomenopavzne japonske ženske, našel povezavo med polimorfizmom His477His in MKG (34). Tamaki J. in njegovi sodelavci so v študiji JPOS, v katero so vključili 1.217 premenopavznih in pomenopavznih japonskih žensk, starejših od 20 let, ugotovili povezavo med polimorfizmom His477His v genu *PPARG* in nizko MKG pri premenopavznih japonskih ženskah. Ugotovili so, da imajo premenopavzne ženske z genotipom CC značilno višje vrednosti MKG kolka in vratu stegenice kot pa premenopavzne ženske z CT ali TT genotipom (20). Yue H. in sodelavci so v svojo študijo vključili 401 družino in 710 pomenopavznih kitajskih žensk. V študiji so preiskovali povezavo desetih polimorfizmov v genu *PPARG* z MKG. Med preučevane polimorfizme je sodil tudi polimorfizem His477His, vendar pa za ta polimorfizem povezave z MKG pri pomenopavznih kitajskih ženskah in kitajskih družinah niso pokazali (35).

Naša študija ne potrjuje rezultatov študij Ogawa (34) in Tamakija (20), ki sta dokazala povezavo med polimorfizmom His477His in znižano MKG. Razlog za različne rezultate študij bi lahko pripisali različnim rasam preiskovancev, saj sta Ogawa S. in Tamaki J. preučevala preiskovance azijske rase, v našo študijo pa smo vključili preiskovance bele rase. Po nam dosegljivih podatkih povezanosti polimorfizma His477His v genu *PPARG* z razvojem osteoporoze pri ženskah in moških bele rase do sedaj še niso preučevali. Rezultati naše študije kažejo, da polimorfizem His477His v genu *PPARG* najverjetneje pri beli rasi ni povezan z razvojem osteoporoze, vendar bi bile potrebne še dodatne študije na velikem številu preiskovancev, ki bi naše rezultate dodatno potrdile.

5. SKLEP

PPAR γ je protein, ki se veže na specifične odzivne elemente v DNA in na ta način spodbuja izražanje mnogih genov, povezanih predvsem z adipogenezo in lipidno presnovo. V kostnem mozgu aktivira diferenciacijo preadipocitov in zavira diferenciacijo preosteoblastov. Povezan je tudi z izgubo kostne mase s starostjo. Cilj naše raziskave je bil določiti pogostnost polimorfizma His477His v genu *PPARG* in ugotoviti njegovo povezanost z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene.

V raziskavo smo vključili 814 preiskovancev, pri katerih smo z metodo alelne diskriminacije določili naslednje frekvence genotipov CC : CT : TT = 71,74 % : 25,43 % : 2,83 %. V skupini pomenopavznih žensk, zdravljenih z alendronatom, smo pokazali statistično značilno razliko ($p=0,048$) med genotipoma CC in CT + TT v prirastu MKG predela ledvene hrbtenice. Razlika v prirastu MKG predela ledvene hrbtenice je pri pomenopavznih ženskah, zdravljenih z alendronatom, z genotipom CC statistično značilno večja kot pri preiskovankah z genotipom CT + TT, kar kaže na vpliv polimorfizma His477His na odzivnost na zdravljenje z alendronatom. V ostalih skupinah preiskovancev nismo dokazali povezanosti polimorfizma His477His v genu *PPARG* z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene ter tveganjem za zlom.

Naši rezultati predstavljajo prispevek k pojasnjevanju genetskih vplivov na nagnjenost k osteoporozi. Polimorfizem His477His v genu *PPARG* ima klinično pomemben vpliv na odzivnost na zdravljenje z alendronatom pri pomenopavznih osteoporoznih ženskah, vendar bi ta dognanja morali potrditi na večji skupini preiskovancev. Dodatna potrditev povezave proučevanega polimorfizma z odzivnostjo na zdravljenje z alendronatom bi nam lahko omogočila njegovo uporabo pri napovedovanju učinkovitosti zdravljenja z alendronatom, ki je ena najpogosteje uporabljenih zdravilnih učinkovin za zdravljenje osteoporoze.

LITERATURA

1. Petrovič D, Zorc M: Histologija, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005: 35-42.
2. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, Histologija in fiziologija, 1. izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2007: 35-37.
3. Kocijančič A: Osteoporoza, 1. natis, Posebne edicije Feniks, Ljubljana 1989
4. WHO scientific Group: Prevention and Management of Osteoporosis: Report of a WHO scientific group, Geneve, 2000; 1-176.
5. Biomedical Tissue Res Gr. Dostopno na:
<http://york.ac.uk/res/btr/imagelibrary.html>, maj 2010
6. Garnero P, Skih WJ, Gineyts E, Karpf DB, Delmas PD. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. J Clin Endocrinol Metab 1994; 79: 1693-700
7. Use of Biochemical Markers of Bone Turnover for Osteoporosis: Where Do We stand?; <http://cme.medscape.com/viewarticle/463099>, dostopano: maj 2010
8. Ciritelli R, Armento-Villareal R, Napoli N: Bone turnover markers: Understanding their value in clinical trails and practice. Osteoporos Int 2009.
9. Henry JB: Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 20th ed., Sunder, USA, 2001: 195-198
10. Roger Smith R, Wordsworth P: Clinical and biochemical disorders of the sceleton, 1. izdaja, Oxford University Press, USA, 2005: 5-158
11. Henry JB: Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 20th ed., Saunder, USA, 2001: 195-198
12. Kocjančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005: 898-900, 916-924
13. Biomedica Gruppe: <http://www.bngrp.com>, dostopano: maj 2010
14. Osteoporoza: <http://www.roche.si/default-94000.html>, dostopano: maj 2010
15. Leo Pharmaceutical products Sarath Ltd.:
http://www.leo-sarath.com/index.asp?a_id=546, dostopano: junij 2010
16. Philip DR: Osteoporoza. Pogostost, posledice in dejavniki tveganja. Dostopno na:
<http://jama-slo.parahacom.com/jama97-2/html/osteopo.html>, maj 2010

17. Morrison NA, Q: JC, Tokita A et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284-287
18. Ralston SH: Genetic Control of Susceptibility to Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (6): 2460-2466
19. Semple RK, Chatterjee Vk, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 581-589
20. Tamaki J., Iki M., Morita A., Ikeda Y., Sato Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphism is related to peak bone mass: the JPOS study. *Osteoporosis Int.* 2010; 21: 321-329
21. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator – activated receptors: nuclear control of metabolism *Endocrine reviews.* 1999; 20,5: 649-688
22. Ackert-Bicknell C, Rosen C. *The Genetics of PPARG and the Skeleton*, Hindawi Publishing Corporation, Volume 2006: 1-8.
23. Bishop-Bailey D, Hla T, Warner T.D. Intimal vascular smooth muscle cells as a target for PPAR γ ligand therapy. *Circulation Research.* 2002; 91: 210-217.
24. Gronemeyer H., Laudet V. Nuclear receptors. *Protein Profile* 2, 1995; 1173-1308.
25. Jiang C., Ting A. T., Seed B. PPAR – gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391, 6662: 82-6.
26. Savage D. B., PPAR γ structure and mode of gene regulation, *Exp rev Mol Med.*, 2005, Vol. 7; Issue 1
27. Hazra S., Miyahara T., Rippe R. A., Tsukamoto H. 2004. PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells. *Comparative Hepatology*, 3(Suppl 1): S7
28. Guan Y. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrology*, 2004; 15, 11: 2801-15.
29. Mlinar B. Uravnavanje lipogeneze in lipolize pri inzulinski rezistenci. *Doktorska disertacija*, Ljubljana 2008; 40-42
30. Stumvoll M., Haring H. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*, 2002; 51, 8: 2341-47
31. Rhee E. J., Oh K. W., Yun E. J., Jung C. H., Park C. Y., Lee W. Y., Oh E. S., Baek K. H., Kang M. I., Park S., W., Kim S. W. The association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene with serum

- osteoprotegerin levels in healthy Korean women. *Exp and mol med*, 2007, Vol. 39, No. 6, 696-704
32. Hara M., Alcoser S. Y., Qoadir A., Beiswenger K. K., Cox N. J., Ehrmann D. A., Insulin Resistance Is Attenuated in Women with polycystic ovary syndrome with Pro12Ala polymorphism in the PPAR γ gene, *J Clin Endocrinol Metab.*, Vol. 87, No. 2, 772-775
33. Rhee E.J., Oh K.W., Yun E.J., Jung C.H, Park C.Y, Lee W.Y., Oh E.S., Baek K.H., Kang M.I., Park S.W., Kim S.W. The effects of C161 \rightarrow T polymorphisms in exon 6 of peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene on bone mineral metabolism and serum osteoprotegerin levels in healthy middle-aged women. *J Am Obstetrics Gynec*, 2005; 192, 1087-93
34. Ogawa S., Urano T., Hosoi T. Association of Bone Density with a Polymorphism of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Gene: PPAR γ Expression in Osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999; 260, 122-6.
35. Yue H., He. J. W., Zhang H., Hu W. W., Hu Y. Q., Li M., Liu Y. J., Wu S. H., Zhang Z. L. No association between polymorphisms of proliferator-activated receptor-gamma gene and peak bone mineral density variation in Chinese nuclear families. 2009, *Osteoporosis Int*.
36. Valve R., Sivennis K., Miettinen R., Pihlajanäki J., Rissanen A., Deeb SS., Auwerx J., Unsitupa M., Laakso M., Two Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ gene are associated with severe overweight among obese women. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism*, Vol. 84, No. 10, 3708-3712
37. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF; A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, 1998; 16: 1215
38. FlexiGene Kit, Qiagen, Sample and Assay Technologies;
<http://qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/flexigenednasystem/flexigenednakit.aspx>; dostopano: junij 2010
39. Microbiology and Immunology on-line: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>; dostopano: junij 2010
40. Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. 2002. Real time PCR in Virology. *Nucleic Acids Research*, 30,6: 1292-1305

41. Kubista M., Andrade JM., Bengtsson M., Farootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N.: The real-time polymerase chain reaction. Elsevier Academic Press, London, 2006: 95-125.
42. Wong MI, Medrano JF: Real-time PCR form RNA quantification. BioTechniques 2005; Vol. 39, No. I, 696-704
43. Applied Biosystems: <http://www3.appliedbiosystems.com/>, dostopano: maj 2010
44. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farm Vestn 2004; 55: 215-220.
45. Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SF, Ralston SH, Lanchbury JS, Spector TD. Association of polymorphism at the type I collagen locus with reduced bone mineral density, Increased fracture risk, and increased collagen locus with reduced bone mineral density, Incraded fracture risk, and increased collagen turnover. Arthritis Rhenm 1999; 42(2): 285-90
46. TaqMan RT-PCR Assay:
<http://www.servicexs.com/servicexs+is+powered+by/applied+biosystems/taqman+rt-pcr+assay/>; Dostopano: junij 2010
47. TaqMan[®] Universal PCR Master Mix Protocol. ABI Applied Biosystems, 2002.
Part number 4304449.:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042996.pdf, dostopano: junij 2010
48. SNP database: http://www.ncbi.nlm.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3856806, dostopano: junij 2010

PRILOGA

Zap. št.	Genotip
666	CT
667	CC
668	CC
669	CT
670	CT
671	CC
672	CC
673	CC
674	CC
675	CC
676	CC
677	TT
678	CC
679	CC
680	CT
681	CC
682	CT
683	CC
684	CC
685	CC
686	CT
687	CC
688	CC
689	CC
690	CC
691	CC
692	CC
693	CT
694	CC
695	CC
696	CC
697	CC
698	CT
699	CC
700	CT
701	CC
702	CC
703	CC
704	CT

Zap. št.	Genotip
705	CC
707	CT
708	CT
709	CC
710	CC
711	CC
712	CC
713	CT
714	CC
715	CC
716	CC
717	CT
718	CC
719	CC
720	CC
721	CC
723	CC
724	CC
725	CT
726	CC
727	CC
728	CC
729	CT
730	CC
731	CC
732	CC
733	CT
734	CT
735	CC
736	CT
737	CC
739	CC
740	CT
741	CT
742	CC
743	CC
744	CC
745	CT
746	CT

Zap. št.	Genotip
747	CC
750	CC
751	TT
752	CC
753	CC
754	CT
755	CC
756	CC
757	CC
758	CC
759	CC
760	CC
761	CC
762	CT
763	CC
764	CC
765	CC
766	CC
767	CC
768	CC
769	CT
770	CC
771	CC
772	CT
773	CC
774	CC
775	CC
777	CC
778	CC
779	CC
780	CC
781	CC
782	CC
783	CC
784	CC
785	CC
786	CC
787	CC
788	CC

Zap. št.	Genotip
789	CC
790	CT
791	CC
792	CT
793	CC
794	CC
795	CC
796	CC
797	CC
798	CT
799	CC
800	CC
801	CC
802	CC
803	CC
804	CC
805	CC
806	CC
807	CT
808	CT
809	CT
810	CC
811	CC
812	CC
813	CC
814	CT
815	CC
816	CT
817	CC
818	CC
819	CC
820	CC
821	CC
822	CC
823	CT
824	CT
825	CC
826	CC
827	CC

Zap. št.	Genotip
913	CC
914	CC
915	CC
916	CT
917	CT
918	CT
919	CT
920	CC
921	CC
922	TT
923	CC
924	CT
925	CT
926	CC
927	CC
928	CC
929	CC
930	CC
931	CC
932	CC
933	CC
934	CC
935	CC
936	CC
937	CC
938	CC
939	CC
940	CC
941	CC
942	CC
943	CT
944	CT
945	TT
946	CT
947	CT
948	CT
949	CC
950	CC
951	CC
952	CC
953	CC
954	CC
955	CT

Zap. št.	Genotip
956	CC
957	CC
958	CC
959	CT
960	CC
961	CT
962	CC
963	CT
964	CT
965	CC
966	CT
967	CC
968	CC
969	CC
970	CC
971	CC
972	CC
973	CC
975	CT
976	CT
977	CC
978	CC
979	CC
980	CT
981	CT
982	CC
983	CT
984	CT
985	CC
986	CC
987	CC
988	CT
989	CC
990	CC
991	CT
992	CC
993	CC
994	CT
995	CC
996	CC
997	CC
998	CC
1001	CC

Zap. št.	Genotip
1002	CC
1003	CC
1004	CC
1005	CC
1006	CC
1007	CC
1008	CC
1009	CT
1010	CC
1011	CC
1012	CC
1013	CT
1014	CT
1015	CC
1016	CC
1017	CC
1018	CT
1019	CC
1020	CC
1021	CC
1022	CT
1025	CC
1026	CC
1027	CC
1028	CT
1030	CT
1031	CC
1032	CC
1033	CC
1034	CC
1035	CC
1036	CC
1037	CC
1038	CC
1040	CC
1041	CC
1042	CC
1043	CC
1044	CC
1045	CC
1046	CT
1047	CT
1049	CT

Zap. št.	Genotip
1050	CC
1051	CC
1052	CT
1054	TT
1055	CC
1056	CC
1057	CT
1058	CC
1059	TT
1060	CC
1061	CC
1062	CC
1063	CT
1064	CC
1065	CC
1066	CC
1068	CC
1069	CC
1070	CC
1071	CT
1072	CC
1073	CC
1074	CT
1075	CT
1076	CC
1077	CT
1078	CT
1079	CC
1080	CC
1081	CC
1082	TT
1083	CC
1084	CT
1085	CC
1086	CC
1087	CT
1088	CC
1089	CC
1090	CC
1091	CC
1092	CC
1094	CC
1095	CT

Zap. št.	Genotip
1096	TT
1097	CC
1098	CT
1099	CT
1100	CC
1101	CC
1102	CC
1103	CC
1104	CT
1105	CC
1106	CC
1107	CC
1108	CT
1109	CC
1111	TT
1112	CC
1113	CC
1114	CC
1115	CC
1116	CT
1117	CC
1118	CC
1119	CC
1120	CC
1121	CT
1122	CC
1123	TT
1124	CT
1126	CC
1127	CC
1128	CC
1129	CC
1130	CC
1131	CC
1132	CT
1133	CC
1134	CC
1135	CC
1136	CC
1137	CC
1138	CC
1139	CT
1141	CC

Zap. št.	Genotip
1142	CC
1143	CC
1144	CC
1146	CC
1147	CC
1148	CC
1149	CT
1150	CT
100f	CC
101f	CT
103f	CC
106f	CT
108f	CC
109f	CC
110f	CT
111f	CC
112f	CC
113f	CC
114f	CC
115f	CC
117f	CC
118f	CC
119f	CC
120f	CT
121f	CT
122f	CT
123f	CC
124f	CC
125f	CT
126f	CC
129f	CT
130f	CC
131f	CT
134f	CC
135f	CC
136f	CC
137f	CC
138f	CC
139f	CC
140f	TT
141f	CC
142f	CC
146f	CC

Zap. št.	Genotip
148f	CC
149f	CC
155f	CC
156f	CT
158f	CC
159f	CC
160f	CC
161f	CT
163f	CT
167f	CC
168f	CC
169f	CC
170f	CC
175f	CC
176f	CC
93f	CC
94f	CC
95f	CC
96f	CC
97f	CT
98f	CC
99f	CT
1	CC
2	CC
3	CC
4	CC
5	CT
6	CC
7	TT
8	CC
9	CC
10	CT
11	CC
12	CT
13	TT
14	CC
15	CT
16	CC
17	CC
18	CC
19	TT
20	CC
21	CC

Zap. št.	Genotip
22	CC
24	CT
25	CC
26	CT
27	CC
28	CC
29	CC
30	CC
31	CT
32	CC
33	CC
34	CC
35	CT
36	CC
37	CC
38	CC
39	CC
40	CC
41	CC
42	CC
43	CC
44	CC
45	CT
46	CT
47	CC
48	CT
49	CC
50	CT
51	CT
52	CT
53	CC
54	CC
55	CC
56	CC
57	CC
58	CC
59	CC
60	CC
61	CC
62	CC
63	CC
64	CC
65	CC

Zap. št.	Genotip
66	CC
67	CC
68	CC
69	CT
70	TT
71	CC
73	CC
74	TT
75	CC
76	CC
77	CT
78	CC
79	CC
80	CC
81	CC
83	CC
84	CT
85	CC
86	CT
87	CC
88	CC
89	CC
90	CC
91	CC
92	CT
93	CT
94	CT
95	CC
96	CC
97	CC
98	CC
99	CT
100	CC
101	CT
102	CT
103	CC
104	CT
105	CC
106	CC
107	CC
108	CC
110	CT
111	CT

Zap. št.	Genotip
112	CC
113	CC
114	CT
115	CT
116	CC
117	CC
587	CT
588	CC
589	CT
590	CC
591	CC
592	CC
593	CC
594	CC
595	CC
596	CC
597	CT
598	CC
599	CC
600	CT
601	CC
602	CT
603	CC
604	CC
605	CC
606	CC
607	CC
608	CC
609	CC
610	CT
611	CC
612	CC
613	CT
614	CT
615	CC
616	CC
617	CT
618	CC
619	CC
620	TT
621	CC
622	CT
623	CC

Zap. št.	Genotip
624	CC
625	CT
626	CT
627	CC
628	CC
629	CC
630	CC
631	CC
632	CC
633	CC
634	CT
635	CC
636	CC
637	CC
638	CC
639	CT
640	CC
659	CC
662	CT
663	CC
664	CC
665	CC
666	CT
667	CT
1002Z	CC
1003Z	CC
1007Z	CC
1009Z	CC
1012Z	CC
1021Z	CC
1032Z	CC
1033Z	CC
1034Z	CC
1035Z	CC
1036Z	CC
1037Z	CC
1038Z	CC
1039Z	CC
1040Z	CC
1041Z	CC
1042Z	CT
1043Z	CC
1045Z	CC

Zap. št.	Genotip
1049Z	CC
1051Z	CC
1052Z	TT
1053Z	TT
1055Z	CC
1056Z	CC
1057Z	CT
1058Z	CT
1059Z	CT
1060Z	CC
1061Z	CT
1062Z	CC
1064Z	CC
1065Z	CC
1066Z	CC
1067Z	CT
1068Z	CT
1069Z	CC
1070Z	CC
1071Z	CC
1072Z	CC
1074Z	CC
1075Z	CC
1076Z	CC
1077Z	CT
1078Z	CC
1079Z	CC
1081Z	CC
1082Z	CC
1083Z	CC
1085Z	CT
1087Z	CC
1088Z	CT
1089Z	CC
1090Z	CC
1091Z	CT
1092Z	CC
1093Z	CC
1094Z	CT
1095Z	CC
1097Z	CT
1098Z	CC
1100Z	CC

Zap. št.	Genotip
1101Z	CT
1102Z	CC
1103Z	CC
1104Z	CT
1105Z	CC
1106Z	CT
1107Z	CT
1108Z	CC
1110Z	CC
c01	CC
c02	CC
c03	CT
c04	CC
c05	CC
c06	CC
c07	CC
c08	CC
c09	CC
c10	CC
c13	CC
c14	CT
c31	CC
c33	CC
c34	CC
c35	CC
c36	CC
c37	CT
c38	CT
c39	CC
c40	CT
c41	CT
c42	CC
c43	CT
c44	CC
c45	CT
c46	TT

Zap. št.	Genotip
c47	CC
c48	CT
c49	CT
c50	CT
c51	CC
c52	CC
c53	CT
c54	CC
c55	CC
c56	TT
c57	CT
c58	CC
c59	CC
c60	CC
c61	CC
c62	CT
c63	CC
c64	CC
c65	CC
c66	TT
c67	CC
c68	CC
c69	CT
c70	CC
c71	CT
c73	CT
c74	CC
c75	CC
c76	CC
c77	CC
c78	CC
c79	CC
c80	CC
c81	CC
c82	CC
c83	CT

Zap. št.	Genotip
c84	CC
c85	CC
c87	CT
c88	CT
c89	CC
c90	CC
c91	CC
c92	CT
c93	CC
c94	CT
c95	CT
c96	CC
c97	CC
c98	CC
c99	CT
c100	CT
C01	CC
C02	TT
C03	CC
C04	CC
C05	CC
C06	CC
C07	CC
C08	CC
C09	CC
C10	CC
C11	CT
C12	CT
C13	CT
C14	CC
C15	CC
C16	CC
C17	CC
C18	CT
C19	CC
C20	CT

Zap. št.	Genotip
C21	CC
C22	CC
C23	CT
C24	CC
C25	CC
C26	CC
C27	CC
C28	CC
C29	CC
C30	CC
C31	CC
C32	CC
C33	CC
C34	CC
C35	CC
C36	CC
C37	CT
C38	CC
C39	CC
C41	CC
C42	CT
C43	CC
C44	CC
C45	CC
C49	CC
C50	CC
C51	CC
C52	CC
C53	CT
C54	CT
C55	CC
C56	CC
C57	CC
C61	CC