

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEVENKA BRANDSTATTER
DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEVENKA BRANDSTATTER

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV – 407G>A IN – 753A>T V
PROMOTORJU GENA RIPK3 Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO
TER BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS – 407G>A IN – 753A>T IN
PROMOTER GENE RIPK3 WITH BONE MINERAL DENSITY AND
BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE TURNOVER**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom red.prof.dr. Janje Marc, mag.farm.,spec.med.biokem. in somentorstvom asist.dr. Darje Bitenc Logar, mag.farm. Meritve mineralne kostne gostote so opravili na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in Mariboru ter na Kliniki za travmatologijo v Splošni bolnici Celje. Meritve koncentracije biokemijskih kazalcev kostne premene so opravili na Kliniki za nuklearno medicino v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. In somentorici asist. dr. Darji Bitenc Logar, mag. farm. za strokovno pomoč pri pisanju diplomske naloge, nove izkušnje in izkazano zaupanje.

Za praktične in prijazne nasvete pri delu v laboratoriju se zahvaljujem tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za Farmacijo.

Velika zahvala gre tudi mojemu najbližjemu prijatelju Janezu in ostalim prijateljem, ki so me spodbujali tekom ustvarjanja diplomskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom red.prof.dr. Janje Marc, mag.farm.,spec.med.biokem. in somentorstvom asist.dr. Darje Bitenc Logar, mag.farm.

Ljubljana, marec 2011

Nevenka Brandstatter

Sestava diplomske komisije:

Predsednik(ica): prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Član: asist. Nejc Horvat

Mentor (ica): prof. dr. Janja Marc

Somentor(ica): asist. dr. Darja Bitenc Logar

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	III
SEZNAM OKRAJŠAV	V
KAZALO SLIK	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VII
1. UVOD.....	1
1.1 KOSTNINA	1
1.1.1 Zgradba kostnine	1
1.1.2 Biokemična organizacija kosti.....	2
1.2 KOSTNA PREMENA	3
1.2.1 Uravnavanje kostne premene	5
1.3 OSTEOPOROZA	6
1.3.1 Oblike osteoporoze	8
1.3.2 Klinična slika in pogostnost.....	8
1.3.3 Diagnostika osteoporoze	9
1.3.4 Biokemični kazalci kostne premene	10
1.3.5 Zdravljenje osteoporoze	11
1.3.6 Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze.....	12
1.3.7 Genski dejavniki	14
1.4. RIP KINAZA 3	17
1.4.1 Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3.....	17
1.4.2 Vloga z receptorjem povezane serin/treonin proteinske kinaze 3	18
1.4.3 Aktivacija dejavnika NF- κ B s TNF	18
1.4.4 Nekroza in apoptoza celic	20
1.4.5 Metabolizem in vloga RIP3 kinaze v nutrigenomiki	21
1.5 GEN RIPK3	21
1.5.1 Polimorfizmi v promotorju gena RIPK3.....	22
2. NAMEN DELA	23
3. METODE IN MATERIALI.....	24
3.1. OPIS PREISKOVANCEV	24
3.1.1 Merjenje mineralne kostne gostote	24
3.1.2 Merjenje koncentracije biokemičnih kazalcev kostne premene.....	25

3.1.3 Opis vzorcev DNA	25
3.2. GENOTIPIZACIJA.....	26
3.2.1 Reakcija verižne polimerizacije	26
3.2.2 Alelna diskriminacija	27
3.2.3. Specifični način detekcije	28
3.2.4. Hidrolizirajoče sonde.....	28
3.2.5. Priprava reakcijske zmesi.....	29
3.2.6 Splošna opozorila.....	31
3.2.7 Reagenti in oprema.....	31
3.2.8 Statistične metode	33
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
4.1. VREDNOTENJE REZULTATOV GENOTIPIZACIJE	34
4.2. POGOSTNOST POLIMORFIZMOV -753A>T IN -407G>A	36
4.3. POVEZANOST POLIMORFIZMOV -753A>T IN -407G>A V GENU RIPK3 Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE	39
4.3.1. Moški preiskovanci.....	41
4.3.2. Premenopavzne preiskovanke.....	43
4.3.3. Pomenopavzne preiskovanke.....	46
4.3.4. Zdrave pomenopavzne preiskovanke	48
4.3.5. Pomenopavzne preiskovanke z osteoporozo.....	50
4.3.6. Pomenopavzne preiskovanke zdravljene z raloksifenom	52
4.3.7. Pomenopavzne preiskovanke zdravljene z alendronatom	54
4.3.8. Preiskovanci z zlomi	55
5. SKLEP	58
LITERATURA.....	60
7. PRILOGE.....	63

POVZETEK

Okostje v človeškem telesu opravlja tri glavne naloge: mehansko, zaščitno in metabolično. Kostna remodelacija je vseživljenski, fiziološki proces v katerem se obnavlja kostno tkivo. Sestavljata jo proces razgradnje kostnine z osteoklasti in proces tvorbe nove kostnine z osteoblasti. Porušeno ravnovesje med tvorbo in razgradnjo kostnine je posledica okoljskih in genetskih dejavnikov ter lahko vodi do nastanka osteoporoze. Osteoporoza je sistemska bolezen skeleta pri kateri je zmanjšana količina kostne mase in spremenjena mikroarhitektura kosti. V vsegenomski študiji izražanja genov v primarni kulturi osteoblastov, se je gen RIPK3 pokazal kot eden od potencialno kandidatnih genov, povezan z osteoporozo. Namen naloge je bil zato določiti pogostnost polimorfizmov -407 G>A in -753A>T v promotorski regiji gena RIPK3, ugotoviti njihovo povezavo z MKG in biokemičnimi kazalci ter tako oceniti njihov klinični pomen pri razvoju osteoporoze v slovenski populaciji.

V raziskavo smo vključili 855 preiskovancev iz različnih slovenskih medicinskih centrov, ter jih razdelili v skupine glede na spol (117 moških in 738 žensk), menopavzni status, prisotnost osteoporoze in terapijo. V ustanovah so preiskovancem izmerili mineralno kostno gostoto (MKG) v predelu vratu stegenice (MKG_{fn}), celotnega kolka (MKG_{tot}) ter ledvenih vretenc (MKG_{ls}) in izmerili koncentracije biokemičnih kazalcev kostne premene in sicer ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANKL), osteoprotegerin (OPG), osteokalcin (OC), C-terminalni telopeptid kolagena tip I (CTX), kostna alkalna fosfataza (BALP), katepsin K in deoksipiridinolin (DPYP).

Z metodo alelne diskriminacije v realnem času smo genotipizirali DNA vzorce vseh preiskovancev s pomočjo sond TaqMan[®] za vsak polimorfizem. S statistično analizo smo preverili pogostnost in njihov vpliv na MKG in biokemične kazalce kostne premene. V celotni skupini smo določili, da so relativne frekvence genotipov za polimorfizmem -753 A>T AA:AT:TT = 77,4%:20,3%:2,3%, relativne frekvence genotipov za polimorfizmem -407 G>A GG:GA:AA=15,7%:45,8%:38,6%. Rezultati relativne frekvence (%) za oba proučevana polimorfizma so primerljivi z rezultati raziskave pri Evropejcih.

Dokazali smo povezanost polimorfizma -753A>T z MKG vratu stegenice ($p=0,038$) ter MKG celotnega kolka ($p=0,020$), v skupini premenopavznih preiskovank.

Dokazali smo povezanost polimorfizma -753A>T s serumskimi koncentracijami kostne alkalne fosfataze (sBALP) v skupini premenopavznih preiskovank ($p=0,031$) ter v skupini pomenopavznih preiskovankah z osteoporozo ($p=0,020$).

V skupini moških preiskovancev, skupini zdravih pomenopavznih preiskovank in skupini preiskovank z osteoporozo zdravljenih z raloksifenom ter alendronatom ter skupini preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo nismo dokazali povezanosti polimorfizma -753A>T v promotorski regiji gena RIPK3 z MKG ali koncentracijami biokemičnih kazalcev kostne premene.

V celotni skupini preiskovancev nismo dokazali povezanosti polimorfizma -407G>A v promotorski regiji gena RIPK3 z MKG in koncentracijami biokemičnih kazalcev kostne premene.

Naši rezultati torej potrjujejo vlogo polimorfizma -753A>T pri razvoju osteoporoze predvsem pri ženskah v predmenopavznem obdobju, niso pa potrdili klinično pomembne vloge polimorfizma -407G>A pri razvoju osteoporoze.

Raziskavo bi bilo smiselno ponoviti na večjem številu preiskovancev, hkrati pa bolje raziskati mehanizem vpliva proteina gena RIPK3 na delovanje celic imunskega odziva in posredno na delovanje kostnih celic.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALP	celokupna alkalna fosfataza
BALP	kostna alkalna fosfataza
BMD	mineralna kostna gostota
BMD-fn	mineralna kostna gostota v predelu vratu stegenice
BMD-tot	mineralna kostna gostota v predelu celotnega kolka
BMD-ls	mineralna kostna gostota v predelu ledvenih vretenc
BMP	kostni morfogenetski protein
CSF-1	kolonije stimulirajoči dejavnik
CTSK	katepsin K
CTX	prečno povezani C-terminalni telopeptidi kolagena I
DPYD	deoksipiridinolin
IL-1,6	interlevkin 1,6
NF- κ B	jederni dejavni kappa B
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
OP	osteoporoza
OPG	osteoprotegerin
PCR	reakcija verižne polimerizacije
PDGF	trombocitni rastni dejavnik
PICP	prokolagen I C-terminalni propeptid
PINP	prokolagen I N-terminalni propeptid
PTH	paratiroidni hormon
RANK	receptor za aktivacijo jedernega dejavnika kapa B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedernega dejavnika kapa B
TGF	transformirajoči rastni dejavnik
TNF	dejavnik tumorske nekroze
TRAF	dejavnik povezan s TNF receptorjem

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura kosti	2
Slika 2: Kostna premena.....	4
Slika 3: Zdrava trabekularna kost.....	7
Slika 4: Osteoporitično spremenjena kost	7
Slika 5: Aktivacija dejavnika NF- κ B s TNF	19
Slika 6: Celična smrt ali preživetje.....	20
Slika 7: Kromosom 14 in mesto 14q11.2 gena RIPK3	21
Slika 8: Potek reakcije verižne polimerizacije	27
Slika 9: Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s hidrolizirajočimi sondami.....	28
Slika 10: Prikaz rezultatov alelne diskriminacije z aparatom Light Cyclor 480 II za polimorfizem -407G>A; modra barva: genotip GG-alel X, zelena barva: genotip AA-alel Y in rdeča barva: genotip GA- alela XY	35
Slika 11: Prikaz rezultatov alelne diskriminacije z aparatom Light Cyclor 480 II za polimorfizem -753A>T ; modra barva: genotip TT-alel X, zelena barva: genotip AA-alel Y in rdeča barva: genotip AT-alel XY	36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Diagnostične kategorije za osteoporozo osnovane na kriterijih SZO	7
Preglednica II: Razdelitev, oblike in vzroki za nastanek osteoporoze	8
Preglednica III: Kazalci tvorbe kosti	10
Preglednica IV: Kazalci razgradnje kosti	10
Preglednica V: Učinkovine za zdravljenje osteoporoze	12
Preglednica VI: Dejavniki tveganja za osteoporozo	13
Preglednica VII: Najbolj proučevani kandidatni geni za osteoporozo	16
Preglednica VIII: Podatki za za polimorfima -407 in polimorfizma -753 v promotorju gena RIPK3	22
Preglednica IX: Razdelitev preiskovancev	24
Preglednica X: Valovne dolžine (nm) reporterskih barvil	29
Preglednica XI: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje vzorčne DNA za polimorfizem -753A>T	30
Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje vzorčne DNA polimorfizem -407G>A	30
Preglednica XIII: Shema temperaturnega programa reakcije PCR v realnem času	31
Preglednica XIV: Povezava med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA	34
Preglednica XV: Relativne frekvence (%) genotipov za polimorfizem -753A>T v skupinah preiskovancev	37
Preglednica XVI: Relativne frekvence (%) genotipov za polimorfizem -407G>A v skupinah preiskovancev	37
Preglednica XVII: Relativne frekvence (%) posameznega genotipa pri Evropejcih, Azijcih in Afroameričanih za polimorfizem -407G>A	38
Preglednica XVIII: Relativne frekvence (%) posameznega genotipa pri Evropejcih, Azijcih in Afroameričanih za polimorfizem – 753A>T	38
Preglednica XIX: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov pri Evropejcih in naše raziskave za polimorfizem -407G>A	38

Preglednica XX: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov pri Evropejcih in naše raziskave za polimorfizem -753A>T	39
Preglednica XXI: Povprečne vrednosti antropoloških parametrov, MKG ter biokemijskih kazalcev kostne premene v skupini pomenopavznih žensk, zdravih pomenopavznih žensk in pomenopavzne ženske z osteoporozo	40
Preglednica XXII: Povprečne vrednosti antropoloških parametrov MKG ter biokemijskih kazalcev kostne premene v skupini pomenopavznih žensk zdravljenih z raloksifenom, pomenopavznih žensk zdravljenih z alendronatom, premenopavznih žensk in skupni moških preiskovancev	41
Preglednica XXIII: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, pOC, CTX, sRANKL, sOPG ter statistične obdelave (p) v skupini moških z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število moških preiskovancev	42
Preglednica XXIV: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K ter statistične obdelave (p) v skupini premenopavznih preiskovank z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število premenopavznih preiskovank	44
Preglednica XXV: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število pomenopavznih preiskovank	47
Preglednica XXVI: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število zdravih pomenopavznih preiskovank	49
Preglednica XXVII: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM, MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z osteoporozo z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število pomenopavznih preiskovank z osteoporozo	51

Preglednica XXVIII: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM, MKG vratu stegnenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z osteoporozo z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število pomenopavznih preiskovank zdravljenih z raloksifenom	53
Preglednica XXIX: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM, MKG vratu stegnenice, kolka, pOC, sBALP, Dpyr, ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z osteoporozo z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število pomenopavznih preiskovank zdravljenih z alendronatom	54
Preglednica XXX: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM, MKG vratu stegnenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sOPG, CTX, katepsin K ter statistične obdelave (p) v skupini preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo	56

1. UVOD

1.1 Kostnina

Človeški skelet sestavlja 206 kosti, ki skupaj s hrustanci predstavljajo oporna tkiva. Okostje v telesu opravlja tri glavne naloge:

- **mehansko:** podpira telo, mu daje osnovno obliko, in predstavlja pasivni del gibalnega aparata. Nanj se pritirajo mišice, ki s krčenjem oz. raztegovanjem premikajo kosti in tako omogočajo aktivno gibanje.
- **zaščitno:** ščiti vitalne notranje organe in kostni mozeg
- **metabolično:** kosti predstavljajo skladišče kalcija, fosfatov in drugih elementov ter rastnih faktorjev za vzdrževanje normalnega notranjega okolja

Anatomsko je mogoče razlikovati dva tipa kosti:

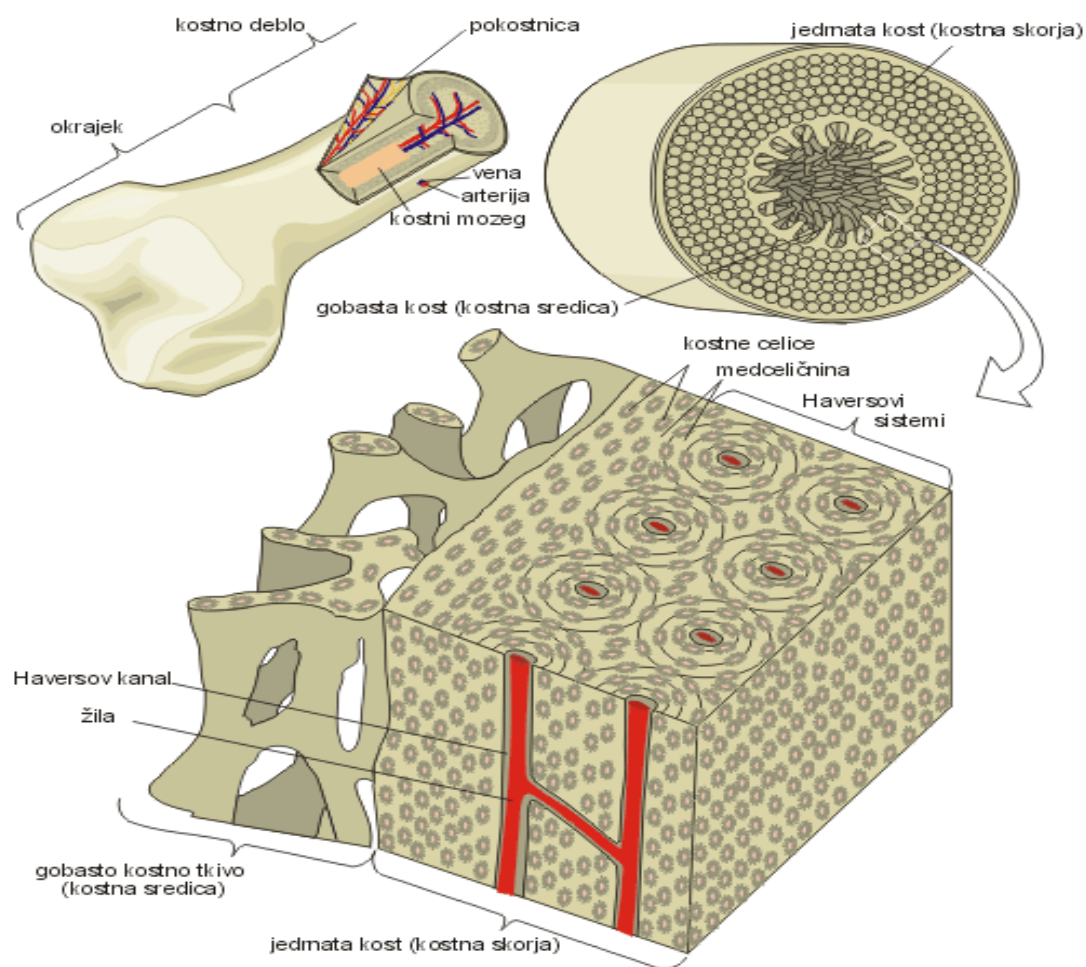
- ploščate-npr.: črevnica, lopatica, čeljustnica, lobanjske kosti
- dolge kosti- npr.: nadlahtnica, stegnenica, golenica (1-2).

1.1.1 Zgradba kostnine

Kosti so zgrajene iz kortikalne ali kompaktne kosti, ki je v 80-90% mineralizirana in trabekularne ali spongiozne kosti, ki je 15-25% mineralizirana. Zunanji del kosti je zgrajen iz debele, goste plasti kalcificiranega tkiva, korteksa (kompaktna kost), ki v diafizah obdaja medularno votlino s hematopoetskim kostnim mozgom. Zunanja površina kompaktne kosti na epifizah je prekrita s plastjo sklepnega hrustanca, ki ne mineralizira. Diafiza je skoraj v celoti zgrajena iz kortikalne - kompaktne kostnine. Trabekularna kost ima veliko površino, zato je metabolno bolj aktivna in posledično bolj dovzetna za izgubo kostne mase in zlome.

Mikroskopska zgradba kosti

Ločimo primarno ali prepleteno kostnino in sekundarno ali lamelarno kostnino. Za prepleteno kostnino je značilno, da se kolagenska vlakna prepletajo v raznih smereh, brez na videz pravega reda. To se dogaja, kadar je tvorba kosti zelo hitra, kot je to med rastjo in celjenjem zlomov. V lamelarni kosti vlakna tvorijo loke za optimalno čvrstost kosti. Lamele so lahko vzporedne, takrat gradijo ravno površino (trabekularna kost in periost) ali pa koncentrične, če so razporejene okoli kanala, ki obdaja krvne žile (Haversov sistem v kortikalni kosti), kar prikazuje Slika 1 (1-3).



Slika 1: Struktura kosti

1.1.2 Biokemična organizacija kosti

Kost je zgrajena iz anorganskega in organskega dela. Anorganski del kosti (65% kostne mase) sestavljajo stabilno vezan kalcij v kristalih hidroksiapatita $[3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot (\text{OH})_2]$ kalcij, ki se izmenjuje s kalcijem v telesnih tekočinah ter fosfat. 99% vsega kalcija je v kosteh vezanega kot kalcijev hidroksiapatit. Od drugih elementov v kosteh so prisotni še magnezij, natrij, citrati, fluoridi in drugi.

Od organskih sestavin kostnine kolagen tipa I predstavlja kar 90% vseh proteinov. Kolagenska vlakna so razporejena tako, da tvorijo lamele. Ostali nekolagenski kostni

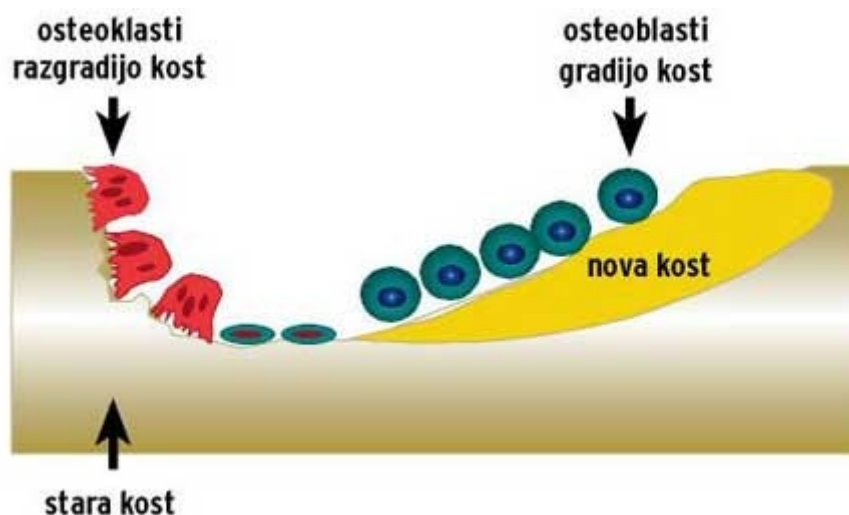
proteini so kostni proteini (osteokalcin), serumski proteini in različni rastni faktorji in drugi.

Celična organizacija kosti

- **Osteoblasti** so celice, ki gradijo kosti in vplivajo tudi na resorpcijo kosti, tako da sintetizirajo lokalne faktorje, ki spodbujajo tvorbo in delovanje osteoklastov. Osteoblasti sintetizirajo kolagen tip I, osteokalcin in številne citokine, rastne dejavnike ter lokalne faktorje. Osteoblasti ležijo na površini kostnine in med seboj komunicirajo s podaljški. Zreli osteoblasti vsebujejo večje količine alkalne fosfataze. Imajo receptorje za parathormon (PTH), kalcitriol, estrogene, prostaglandine in citokine. Ko se obdajo z medceličnino, postanejo manj aktivni in se preoblikujejo v osteocite.
- **Osteoklasti** so velike mnogojedrne celice, ki izvirajo iz hematopoetičnih celic makrofagno-monocitne vrste. Njihova glavna naloga je razgrajevanje kostne medceličnine. Običajno jih najdemo v stiku s kalcificirano kostno površino in v vdolbinah (Howshipove lakune), ki so jo sami izdolbili v procesu resorpcije kosti. Pri zorenju in delovanju osteoklastov sodelujejo številni citokini, ki jih izločajo osteoblasti ali se izločajo iz razgrajenega kostnega matriksa. Najpomembnejši citokin je RANKL (ligand za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B).
- **Osteociti** so najštevilnejše kostne celice, saj predstavljajo 90-95% vseh kostnih celic. Osteociti so preoblikovani osteoblasti, ki se nahajajo na površini kosti ali pa so ujeti med kostne lamele. V vsaki lakuni je samo en osteocit. Med seboj komunicirajo s podaljški, na koncu katerih so presledkovni stiki. Omogočajo hitro sproščanje kalcija iz kosti in tako zagotavljajo uravnoteženost notranjega okolja. Imajo receptorje za citokine, PTH, kalcitriol in estrogene (3-4).

1.2 Kostna premena

Kost se vse življenje gradi in razgrajuje, proces pa se imenuje kostna premena ali remodelacija. Najprej se kost razgradi in nato izgradi, kar prikazuje Slika 2. Ta proces poteka v kosteh celo življenje. Pri otrocih gradnja kosti prevladuje nad njeno resorpcijo. Pri odraslih med 25 in 35 letom sta oba procesa v ravnotežju. V kasnejših letih življenja pa je razgradnja kostnine intenzivnejša od izgradnje kostnine.



Slika 2: Kostna premena

http://www.mb-lekarne.si/index.php3?p=osteoporoza_ii

Proces poteka v več fazah:

FAZA MIROVANJA - faza aktivacije, kjer se neaktivni osteoblasti razmaknejo in s tem razgalijo kostno površino.

FAZA RAZGRADNJE – faza pridobivanja osteoklastov, kjer razgaljena kost privabi osteoklaste, ki izdolbejo Howshipovo lakuno

FAZA PREOBRATA – osteoklasti se odmaknejo, dno votline očistijo mononuklearni fagociti in ga obložijo s cementno plastjo

FAZA GRADNJE – faza pridobivanja osteoblastov in tvorbe osteoida (kostnega matriksa).

FAZA KONČNE PRENOVE - osteoid zapolni izdolbeno Howshipovo lakuno in se postopoma mineralizira, površino novonastale kosti prekrijejo neaktivni osteoblasti (3-4).

Prva stopnja pri razgradnji kostnine je mobilizacija kristalov hidroksiapatita. Hidroksiapatit je preko nekolagenskih proteinov vezan na kolagen in te vezi se razgradijo. Zaradi nizke vrednosti pH se kristali raztopijo, s čimer je kostni matriks izpostavljen nadaljnji razgradnji. Preostala kolagenska vlakna razgradi katepsin K pri optimalnem pH. Osteoblasti poleg tvorbe kostnega matriksa izražajo in izločajo dejavnike, ki regulirajo dozorevanje in aktivnost osteoklastov. Na celični membrani izražajo citokin RANKL iz družine dejavnikov tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor, TNF), ki z vezavo na receptor RANK na osteoklastni celični liniji ob prisotnosti M-CSF (makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik, angl. macrophage-colony stimulating factor) omogoča dozorevanje,

diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov.

Kostna resorpcija z osteoklasti je regulirana z lokalno delujočimi citokini in sistemskimi hormoni. Na osteoklastih so našli receptorje za kalcitonin, androgene, ščitnične hormone, insulin in glutamat. Znotraj celično signaliziranje v osteoklastih poteka po več signalnih poteh, ki regulirajo proliferacijo, diferenciacijo, reorganizacijo citoskeleta in preživetje osteoklastov. V teh procesih sodelujejo membranski receptorji, adapterske molekule, kinaze in transkripcijski faktorji ter Ca^{2+} . Proliferacija je regulirana preko površinskih receptorjev $\alpha\text{v}\beta 3$ (adhezijski integrinski receptorji) in c-Fms receptorjev (površinska molekula celic T_c , tarča za aktivacijo TNF) na katere se veže M-CSF. Diferenciacijo osteoklastov omogočajo signalne poti vezane na receptorje c-Fms (receptor za M-CSF), RANK (receptor za RANKL), TNFR1 (receptor za TNF) in IL-1R (receptor za IL-1). Aktivacijo osteoklastov pa je regulirana preko receptorja RANK, TNFR1, in IL-1R1. Večina signalnih poti vključuje aktivacijo kinaz, ki sprožijo translokacijo transkripcijskih faktorjev v jedro celice, kjer posledično vplivajo na prepis in aktivacijo osteoklasto specifičnih genov. Po drugi strani regulacija reorganizacije citoskeleta ne vključuje transkripcijskih jedrnih dejavnikov, odvisna pa je od različnih kinaz, ki omogočajo hiter odziv na signal (3-4).

1.2.1 Uravnavanje kostne premene

Glavno vlogo pri uravnavanju prenove kosti imajo hormoni in lokalni dejavniki, ki oboji uravnavajo nastajanje in delovanje osteoklastov in osteoblastov.

Parathormon (PTH) prek osteoblastov spodbuja tvorbo in delovanje osteoklastov in s tem pospešuje razgradnjo kosti.

Kalcitonin zavira razgradnjo kosti neposredno z zaviranjem delovanja osteoklastov.

Kalcitriol pospešuje mineralizacijo kosti ob zadostni količini kalcija. Spodbuja osteoblaste k povečani sintezi osteokalcina in osteonektina. Deluje podobno kot PTH pri spodbujanju resorbcije kosti.

Rastni hormon posredno vpliva na pospešeno tvorbo kosti tako, da pospešuje tvorbo IGF-1 v jetrih in tvorbo kalcitriola.

Insulin sodeluje pri mineralizaciji kosti tako, da pospešuje sintezo kostnega kolagena in tvorbo hrustanca.

Kortikosteroidi zavirajo absorbcijo kalcija iz črevesa in tako posredno spodbujajo izločanje PTH. Zavirajo delovanje osteoblastov in pospešujejo razgradnjo kosti.

Ščitnični hormoni s prevladujočo razgradnjo v celoti pospešujejo prenovu kosti. Na osteoklaste delujejo posredno prek spodbujanja osteoblastov.

Estrogeni prek zmanjšane tvorbe interleukina 1 in 6, posredno zavirajo tvorbo in delovanje osteoklastov.

Ostali hormoni so rastni hormon, insulin, kortikosteroidi ter ščitnični in spolni hormoni.

Lokalni dejavniki so za regulacijo resorpcije kosti še pomembnejši od hormonov.

Interleukin-1 (IL-1) je močan aktivator osteoklastov. Izločajo ga aktivirani osteoblasti in monociti. Zvišan je pri osteoporozi, pri rakastih boleznih ter pri revmatoidnem artritisu, kar se kaže kot pospešena resorpcija kosti.

Tumorski nekrozni faktor (TNF) pospešuje nastajanje in delovanje osteoklastov. Deluje podobno kot IL-1.

Kolonije stimulirajoči faktor-1 (CSF) se tvori v osteoblastih. Iz prekursorских celic spodbuja nastajanje novih osteoklastov.

RANKL (ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B) nastaja v osteoblastih, spodbuja nastanek novih osteoklastov, pospešuje delovanje zrelih in preprečuje njihovo apoptozo, ko se veže na funkcionalni receptor

Osteoprotegerin (OPG) se veže na RANKL in preprečuje nastanek novih osteoklastov, aktivacijo zrelih osteoklastov in zavira resorpcijo kosti. Razmerje med OPG in RANKL je pomembno za lokalno uravnavanje resorpcije kosti.

RANK (receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B) je receptor za RANKL.

Transformirajoči faktor beta (TNF β) zavira pretvorbo prekursorjev v osteoklaste in zavira delovanje že zrelih osteoklastov. V super družino TGF beta spadajo tudi kostno morfogenetski proteini BDP, ki delujejo na osteoblaste tako, da pospešujejo njihovo nastajanje in delovanje.

Insulinu podoben rastni faktor (IGF), rastni faktorji, ki izhajajo iz trombocitov (PDGF) in fibroblastni rastni faktor (FGF) spodbujajo nastajanje osteoblastov iz osnovnih progenitorskih celic (2-4).

1.3 Osteoporoza

Izraz osteoporoza dobesedno pomeni »porozne kosti«. Osteoporoza je sistemska bolezen za katero je značilno ginevanje količine kostne mase in s tem porušene mikroarhitekture kostnega tkiva, kar vodi v značilno **povečano lomljivost kosti** (oziroma zmanjšano čvrstost), katere posledica je večje tveganje za zlom. Na krhkost kosti vpliva količina

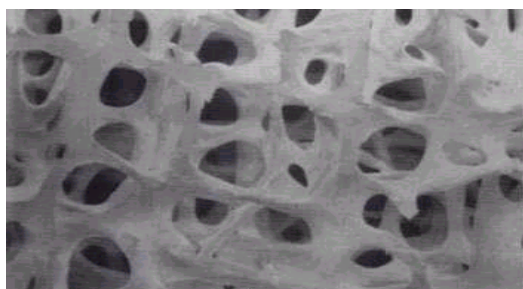
mineralne kostne gostote (MKG) in kvaliteta (kostna mikroarhitektura in kvaliteta organskih in anorganskih sestavin v ožjem smislu) kosti. Slika 2 prikazuje zdravo trabekularno kost, Slika 3 pa osteoporitično spremenjeno kost.

Osteoporoza je stanje, ko se volumska količina in struktura kosti zmanjša za več, kot je normalno glede na leta starosti. Ob zmanjšanju kostne mase se spremeni tudi notranja zgradba kosti. Predvsem in najprej se tanjšajo in celo izginejo posamezne trabekule. Kasneje se stanjša od znotraj navzven tudi kortikalni del kosti.

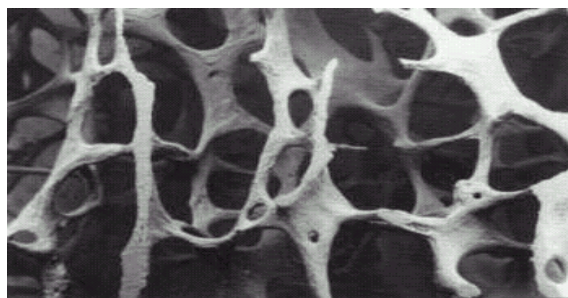
Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne gostote kosti, kar prikazuje Preglednica I. MKG je pri osteoporozi zmanjšana za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso. Kadar je zmanjšanje MKG med 1 in 2,5 SD, govorimo o osteopeniji (2,4-6).

Preglednica I: Diagnostične kategorije za osteoporozo osnovane na kriterijih SZO

Definicija	MKG - Mineralna kostna gostota
NORMALNA	T vrednost ≥ 1 = znotraj 1SD glede na referenčno vrednost
OSREOPENIJA	T vrednost 1 do 2,5SD manjša od referenčne vrednosti
OSTEOPOROZA	T vrednost je 2,5SD manjša od referenčne vrednosti
NAPREDOVANA OP	T vrednost je več kot 2,5SD manjša od referenčne vrednosti (z zlomom ali zlomi)



Slika 3: Zdrava trabekularna kost



Slika 4: Osteoporitično spremenjena kost

Znižanje za 1 SD predstavlja približno 10 do 12 odstotkov povprečja MKG mladih odraslih. Torej je osteoporoza prisotna, če se MKG zniža za 25 do 30 odstotkov glede na

najvišjo kostno gostoto. Z znižanjem MKG za 1 SD pod srednjo vrednost, to je za 10 do 12 odstotkov, se verjetnost zlomov merjenega predela poveča za 2- do 2,5-krat (2,4-6).

1.3.1 Oblike osteoporoze

Glede na vzrok nastanka razdelimo osteoporozo v dve skupini: primarno in sekundarno, kar je prikazano v Preglednica II. Primarna oblika osteoporoze je pogostejša in nastane po menopavzi oz. starosti. Pomenopavzalna osteoporoza se pojavi pri ženskah med 50. in 70. letom starosti.

Sekundarna osteoporoza se razvije kot posledica različnih bolezni oz. delovanja toksičnih dejavnikov(2,4-6).

Preglednica II: Razdelitev, oblike in vzroki za nastanek osteoporoze

Vrste OP	Oblika OP	Vzroki in posledice
Primarna OP	Pomenopavzalna OP	pomankanje estrogenov, pride do povečane resorpcije in zmanjšanja tvorbe kosti
	Senilna OP	manjša resorpcija kalcija iz črevesa zaradi sprememb na črevesni sluznici s posledično zvišano koncentracijo PTH in manjša tvorba aktivne oblike vitamina D3 v ledvicah zaradi starostnih sprememb
	Juvenilna OP	vzrok ni poznan, pojavi se pred puberteto in traja dve do štiri leta nato spontano izgine
	Nosečnostna OP	verjetno posledica slabše prilagoditve kalcotropnih hormonov (PTH, kalcitonin, kalcitriol), ki običajno zaščitijo okostje ženske v času nosečnosti
Sekundarna OP		posledica drugih bolezni ali stanj: endokrine bolezni bolezni kostnega mozga bolezni prebavil drugi vzroki (npr. revmatoidni artritis, imobilizacija)

1.3.2 Klinična slika in pogostnost

Osteoporoza je klinično neizrazito obolenje do prvega zloma kosti. Tipični osteoporotični zlomi so **zlom zapestja, vretenc in kolka**. Njihova pogostnost se spreminja glede na **starost** in **spol**. Do 80. leta starosti ima osteoporozo vsaka tretja ženska in vsak šesti

moški. Zlomi zapestja so najpogostejši med 50. in 60. letom, zlomi vretenc med 60. in 70. letom ter zlomi kolka po 70. letu starosti. Največ je zlomov vretenc.

Zlomi zapestja in kolka se pojavljajo v približno enakem procentu. Po 70. letu starosti pa je pogostnost zloma kolka večja, smrtnost po zlomu kolka pa je 10-20%.

V študiji iz leta 2006 so ugotovili da je pogostnost osteoporoze v Sloveniji pri ženskah nad 50. letom 27,5 odstotna, pri moških nad 60. letom pa 14,6 odstotna. S starostjo delež osteoporoze narašča, pri ženskah nad 65 letom je delež 40,6 odstotka, pri moških nad 65. letom pa 16,7 odstotka. Le 21,7 odstotka bolnikov z osteoporozo prejema terapijo.

Bolniki z osteoporozo imajo statistično značilno manjšo telesno težo. Vzrok zato je še neraziskan (2,4-6).

1.3.3 Diagnostika osteoporoze

V Sloveniji in v svetu je sprejet standard za diagnostiko osteoporoze z merjenjem MKG z dvoenergijsko rentgensko absorpciometrijo ali DXA (angl. Dual Energy X-ray Absorptimetry). DXA zabeleži površinsko MKG (g/cm^2) in se rutinsko meri na ledvenih vretencih (L1-L4 ali L2-L4), kolku (vratu stegenice) in zapestju. Skozi preiskovani del telesa usmerimo snop žarkov dveh energij ter s scintilacijskim števcem beležimo prepuščeno sevanje. Količina zadržanega sevanja je odvisna od sestave kosti, kostne mase in mehkih tkiv. Gostoto mineralov v kosti izračuna računalnik iz razmerja količine prepuščenih žarkov obeh energij. Uporaba sevanja z dvema energijama zmanjša vpliv mehkih tkiv in maščevja v kostnem tkivu na rezultate meritev gostote kosti.

DXA meritev, izmerjeno vrednost primerja s povprečno kostno gostoto mlade zdrave odrasle osebe (T-vrednost) in s povprečno kostno gostoto oseb enake starosti (Z- vrednost). *Ultrazvok petnice* je učinkovita presejalna, ne pa tudi diagnostična metoda. Za diagnostiko osteoporoze ni dovolj zanesljiva in natančna. Z ultrazvokom petnice kot presejalno metodo lahko iz širše populacije izločimo tiste posameznike, pri katerih obstaja večja verjetnost oziroma sum na osteoporozo.

Rentgensko slikanje hrbtenice lahko zazna zmanjšanje kostne gostote šele, ko se je kostna gostota zmanjšala za približno 30 %, kar je precej pozno. Preiskava DXA pa lahko zazna že 2% izgubo mineralne kostne gostote in je zato edina diagnostična preiskava za zanesljivo postavitev diagnoze osteoporoze ter podlaga za predpisovanje specifičnega zdravljenja. Pri DXA preiskavi je tudi nekajkrat manjše sevanje kot pri običajni RTG

preiskavi, zato jo lahko brez škode ponavljamo za namen spremljanja učinkovitosti zdravljenja (2,4,7).

1.3.4 Biokemični kazalci kostne premene

Biokemični kazalci so encimi in proteini, ki jih izločajo kostne celice ali pa razgradni produkti kolagena tip I in hidroksi apatita. Vrednosti biokemičnih kazalcev lahko odražajo intenzivnost kostne remodelacije, še pomembnejši pa so pri zgodnjem potrjevanju uspešnosti terapije.

Z rezultati meritev MKG (angl. Bone Mineral Density, BMD) ugotovimo ali je predpisana terapija uspešna šele po enem letu, biokemični kazalci pa pokažejo to že po treh mesecih. Biokemični kazalci največkrat razdelimo na kazalce tvorbe in kazalce razgradnje kostne mase, kar prikazujeta Preglednici III in IV (20).

Preglednica III: Kazalci tvorbe kosti

KAZALCI TVORBE KOSTI	OZNAKA	DOLOČANJE
Prokolagen I C-terminalni propeptid	PICP	ELISA –v serumu
Prokolagen I N-terminalni propeptid	PINP	ELISA- v serumu
Celokupna alkalna fosfataza	ALP, AP	Kolorimetrično – v serumu
Kostna alkalna fosfataza	BALP, BSAP	ELISA - vserumu
Osteokalcin	OC, BGP	ELISA, RIA – v serumu

Preglednica IV: Kazalci razgradnje kosti

KAZALCI RESORBCIJE KOSTI	OZNAKA	DOLOČANJE
Telopeptid kolagena I	ICTP	ELISA – v serumu
Tartrat-rezistentna kisl fosfataza	TRAP	ELISA, RIA – v serumu
Piridinolin	PYD	HPLC – v serum in urinu
Deoksipiridinolin	DPYD	HPLC – v serumu in urinu
C-terminalni teloepetid kolagena	CTX	Kompetitivna EIA – v serumu ali urinu
N- terminalni teloepetid kolagena	NTx	Kompetitivna EIA-v serumu ali urinu
Hidroksiprolin	OHPTo, OHP	Kolorimetrično z Erahovim reg.- v urinu
Kalcij	Ca	AA – v urinu

Našteti kazalci tvorbe kosti so prisotni v različnih fazah nastajanja nove kosti: PICP, PINP so prisotni v prvi fazi, v času proliferacije osteoblastov, ALP v času zorenja matriksa in osteokalcin v času mineralizacije matriksa.

Pri resorpciji kosti se iz kosti sproščajo razgradnji produkti kolagena (peptidni fragmenti, posamezne AK, piridinski prečni povezovalci), kalcijevi ioni in/ali tartrat rezistentna kislina fosfataza, ki jo izločajo aktivni osteoklasti. PYD in DPYD sta večinoma zastopana v kostnem tkivu, sta prečna povezovalca in povezujeta snope kolagenskih vlaken in tako stabilizirata molekule kolagena. Med kostno razgradnjo se sproščata v krvni obtok in nato v urin. Sta najbolj specifična biokemična kazalca kostne razgradnje, saj njuno določanje v serumu zmanjša biološko in analitično variabilnost (18).

Upravljanje delovanja osteoblastov in osteoklastov

Biokemijska pokazatelja osteoklastogeneze sta RANKL in OPG. Višja serumska koncentracija RANKL in nižja serumska koncentracija OPG sta pokazatelja pospešene osteoklastogeneze. V serumu se določata imunokemijsko z metodo ELISA.

RANKL in OPG sta proteina, ki nastajata v osteoblastih. OPG se veže na RANKL in s tem preprečuje njegovo vezavo na RANK ter tako zavira osteoklastogenezo (13).

1.3.5 Zdravljenje osteoporoze

Osnovni diagnostični kazalec osteoporoze je nivo mineralne kostne gostote (MKG), v pomoč pa so tudi koncentracije razgradnih produktov kolagena ali drugih kostno specifičnih proteinov v seču in serumu oz. t.i. biokemični kazalci kostne premene.

Osteoporoza je bolezensko stanje, ki je močno povezano z življenjskimi navadami posameznika. Tako v preventivi kot tudi pri zdravljenju bolezni je pomembna usmerjenost k zdravemu načinu prehranjevanja s hranili z dovolj kalcija in vitamina D za dnevne potrebe organizma. Vnos najmanj 1000 mg kalcija/dan, 800 IU vitamina D/dan in 1g/kg telesne teže proteinov je osnovna podpora pri zdravljenju osteoporoze. Prav tako je pomembna usmerjena dnevna telesna aktivnost na svežem zraku in soncu ter življenje brez kajenja in pretiranega uživanja alkoholnih pijač.

Za preprečevanje in zdravljenje osteoporoze so na voljo zdravila, ki pospešujejo kostno tvorbo, ki zavirajo kostno tvorbo in zdravila ki vplivajo na obe fazi kostne premene, kar prikazuje Preglednica V (7-8).

Preglednica V: Učinkovine za zdravljenje osteoporoze

ZAVIRALCI KOSTNE TVORBE	POSPEŠEVALCI KOSTNE TVORBE
estrogen	natrijev fluorid
kalcij v obliki soli	rekombinantni parathormon (PTH)
Bisfosfonati -ALENDRONAT	
kalcitonin	
vitamin D	
selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM) RALOKSIFEN	

Nove perspektive pri zdravljenju osteoporoze

Denosumab je naravno monoklonsko protitelo, ki zavira receptorski aktivator RANKL in na ta način blokira osteoklastogenezo, hkrati pa zmanjšuje kostno premeno in zvišuje MKG pri osteoporotičnih bolnicah. Denosumab je nov, zelo pomemben pristop k zdravljenju hude osteoporoze.

Novi selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM), novi tako imenovani »vazomotorni SERM«, ki bi deloval namesto HNZ (hormonsko nadomestno zdravljenje) v odpravljanju klimakteričnih težav, ob tem pa deloval antiresorptivno na kost brez vpliva na endometrijo in ob ugodnem kardiovaskularnem sistemu. Zdravilo bi bilo ugodno za žensko v pomenopavzi.

Teriparatid

Gre za humani rekombinantni parathormon, ki v obliki podkožnih injekcij spodbuja tvorbo nove, kakovostne kosti. Na ta način pri bolnicah s pomenopavzno osteoporozo za dobro polovico zniža tveganje za vretenčne in nevretenčne zlome (8).

1.3.6 Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze

Količina kostne mase se v dobi odraščanja večja, ker se več kosti zgradi kot razgradi. Količina kortikalnega dela kosti se večja do 30. leta starosti, trabekularne kosti pa do 25. leta starosti. Od 30. do 40. leta starosti so procesi gradnje in razgradnje kosti uravnoteženi. Po 40. letu starosti se prične fiziološko manjšanje kostne mase, ki je nekaj let enako intenzivno za ženske in moške in traja doživljensko. Pri ženskah je izguba kosti lahko že nekaj mesecev pred menopavzo, ko se količina estrogena izrazito zmanjša, predvsem trabekularnega dela, mnogo večja kakor pri moških. Estrogeni so močni

zaviralci resorpcije kosti. Izguba trabekularne kostnine mase je pri ženskah približno 0,5% letno, 3 do 5 let po menopavzi pa 3%. Moški izgubljajo 0,5% kostne mase letno, zato pride do zmanjšanja kostne mase kasneje. Na razvoj osteoporoze vplivajo tako genetski–endogeni dejavniki ter okoljski-eksogeni dejavniki, kar je prikazano v Preglednici VI (2,4,6-7).

Preglednica VI: Dejavniki tveganja za osteoporozo

ENDOGENI dejavniki	EKSOGENI dejavniki
Starost -zmanjšana tvorba nove kosti - po 65. letu starosti, pojavlja se tako pri moških kot tudi pri ženskah, vendar je še vedno pogostejša pri ženskah	Način življenja - <i>kajenje</i> - <u>nizka fizična aktivnost</u> , čezmerna telesna aktivnost, ki povzroči amenorejo - <u>prehrana</u> – intoleranca za mleko, revna s kalcijem, čezmerno uživanje alkohola, dnevno velike količine beljakovin in pretirano pitje kave - <u>majhna telesna aktivnost</u> predvsem v zaprtih prostorih, pomankanje sončnih žarkov -bolezni motnje hranjenja (izguba telesne teže)
Spol -zlasti ženske (med 51. in 65. letom starosti) - pomanjkanjeestrogenov v pomenopavzalnem obdobju	Zdravila -glukokortikoidi -antikonvulzivi -benzodiazepini -antidepresivi
Rasa -bela ali azijska rasa	Zdravstveno stanje -oslabilne nevromišične funkcije -padci -visok srčni utrip -slab vid

Družinska obremenjenost -zlom kolka pri prednikih -zlomi pri prednikih po mamini strani -splošno zdravstveno stanje - astenična konstitucija-pod 58 kg (nizek indeks telesne teže), velika telesna višina -zgodnja menopavza, pred 45.letom	Druga obolenja -diabetes mellitus -avtoimunska obolenja -pomankanje spolnih hormonov -hipertioridizem
---	--

1.3.7 Genski dejavniki

Zelo verjetno je za nastanek osteoporoze odgovornih več genov, zato označujemo osteoporozo kot poligensko bolezen. Študije na dvojčkih in družinah so pokazale, da je 60-85% variance v kostni gostoti določeno z dednostjo.

Številne študije na dvojčkih in hčerah osteoporoznih mater dokazujejo močan genski vpliv na BMD. Ta je sicer odvisen od mesta v skeletu in od spola, vendar variira v območju od 50% (vretenca pri moških) do 80% (vretenca pri ženskah). Dosedaj so največ proučevali gene: COL1A1, ESR1 in VDR. Vsi skupaj naj bi k znižanju MKG prispevali le 5%. Pristopi k iskanju tarčnih genov, so različni. Najpogostejše so asociacijske študije genotip-fenotip druge so študije na živalskih modelih in najbolj redke so genomske študije.

V preteklosti so skušali najti povezavo med osteoporozo in geni za vitamin D-receptor (VDR), estrogenski receptor (ER), kolagen I alfa 1, transformirajoči rastni faktor beta, inzulinu podoben rastni faktor (IGF), interlevkin 6 (IL 6), kostni morfogeni protein itd. Končnega odgovora, kateri geni in s kakšnim vplivom sodelujejo pri vzdrževanju kostne mase oz. prave povezave z razvojem osteoporoze še niso uspeli ugotoviti in iskanje novih genetičnih dejavnikov se nadaljuje. Novejše raziskave na področju genetike osteoporoze pa kažejo, da so določeni genski polimorfizmi soudeleženi tudi pri odgovoru bolnika na zdravljenje, npr. z estrogeni ali bisfosfonati.

V Preglednici VII so predstavljeni kandidatni geni, ki bi bili lahko povezani z razvojem osteoporoze (9-10,20).

Preglednica VII: Najbolj proučevani kandidatni geni za osteoporozo

CITOKINI, RASTNI FAKTORJI IN RECEPTORJI	KALCITROPNI HORMONI IN RECEPTORJI
TGFβ1 – transformirajoči rastni faktor β1 IGF-I – insulinu podoben rastni faktor I IL-6, IL-1 β – Interlevkin LRP5 – z lipoproteinskim receptorjem povezan protein 5	VDR - receptor vitamina D ER1 - estrogenski receptor 1 Aromataza - CYP19A1 PTH - paratiroidni hormon PTHr 1- receptor za paratiroidni hormon tipa 1 CALCR - receptor za kalcitonin CASR - receptor za zaznavo kalcija
REGULATORNI FAKTORJI ZA OSTEOLASTE	GENI POVEZANI Z OSTEOKLASTI
ALOX12 in ALOX15 BMP2 in 4 – kostni morfogeni protein 2 in 4 RUNX2 – jederno vezavni dejavnik IGF1 – insulinu podoben rastni dejavnik SOST – sklerotonin TGFβ – transformirajoči rastni dejavnik LRP5 in LRP6 – LDL receptorju soroden protein	CTSK – katepsin CLCN7 – kloridni ionski kanali OPG – osteoprotegerin RANKL – receptor za aktivacijo jedrnega faktorja in ligand NF k B
RAZLIČNI	KOSTNI MATRIX IN ENCIMI ZA RAZGRADNJO
APOE – apolipoprotein MTHFR – metilen tetrahidrofolat reduktaza HLA-D – HLA razdeda II (humani levkocitni antigen)	AHSG – α2 – HS-glikoprotein COL1A1 – kolagen tipa 1αI

1.4. RIP kinaza 3

Proteinska fosforilacija, ki ima ključno vlogo pri večini celičnih procesov, je reverzibilen proces, ki poteka ob posredovanju proteinskih kinaz in fosfoprotein fosfataz.

Protein kinaze so encimi, ki katalizirajo prenos fosfatne skupine iz nukleotidtrifosfatov (pogosto je to ATP) za eno ali več aminokislinskih ostankov v substratu stranske verige proteina, kar povzroči konformacijsko spremembo proteina in s fosforilacijo posledično spremeni funkcijo ciljnega proteina tako, da se spremeni encimska aktivnost, celična lokacija ali povezovanje z drugimi proteini.

Proteinske kinaze razvrstimo po specifičnosti v tri glavne razrede:

- Serin/treonin-protein kinaze
- Tirozin-protein kinaze
- Dvojno specifične proteinske kinaze; mešana aktivnost serin/treonin in tirozin kinaze

Do približno 30 % vseh človeških proteinov lahko modificiramo s kinazo. Kinaze regulirajo večino celičnih poti, še posebno tiste, ki imajo pomembno vlogo pri prenosu signalov ter delujejo kot molekulska stikala, ki vključujejo ali izključujejo metabolične procese in tako zagotavlja stalno koncentracijo ATP (11).

kinaza



1.4.1 Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3

Obravnavan protein ima referenčno ime z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3, ki ga kodira gen RIPK3 (angl. receptor-interacting serine-threonine kinase 3) z nomenklaturo EC=2.7.11.1. Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3 se sestoji iz 518 AA. Kodiran protein je predvsem lokaliziran v citoplazmi.

Je član družine, ki vključuje RIP (RIP1), RIP2 (RICK/CARDIAK), RIP3, RIP4 (DIK), RIP5 (SgK288), RIP6 (LRRK1) in RIP7 (LRRK2) kinaze. Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3 ima specifično C-terminalno domeno (proste –COOH skupine) ter je zato različna od drugih družinskih članov RIP kinaz. C-terminalna domena je pomembna za aktivacijo kaspaz in indukcijo apoptoze.

Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3 je močno izražena v trebušni slinavki. Odkrita je v srcu, posteljici, pljučih in ledvicah ter v debelem črevesju (23-26).

1.4.2 Vloga z receptorjem povezane serin/treonin proteinske kinaze 3

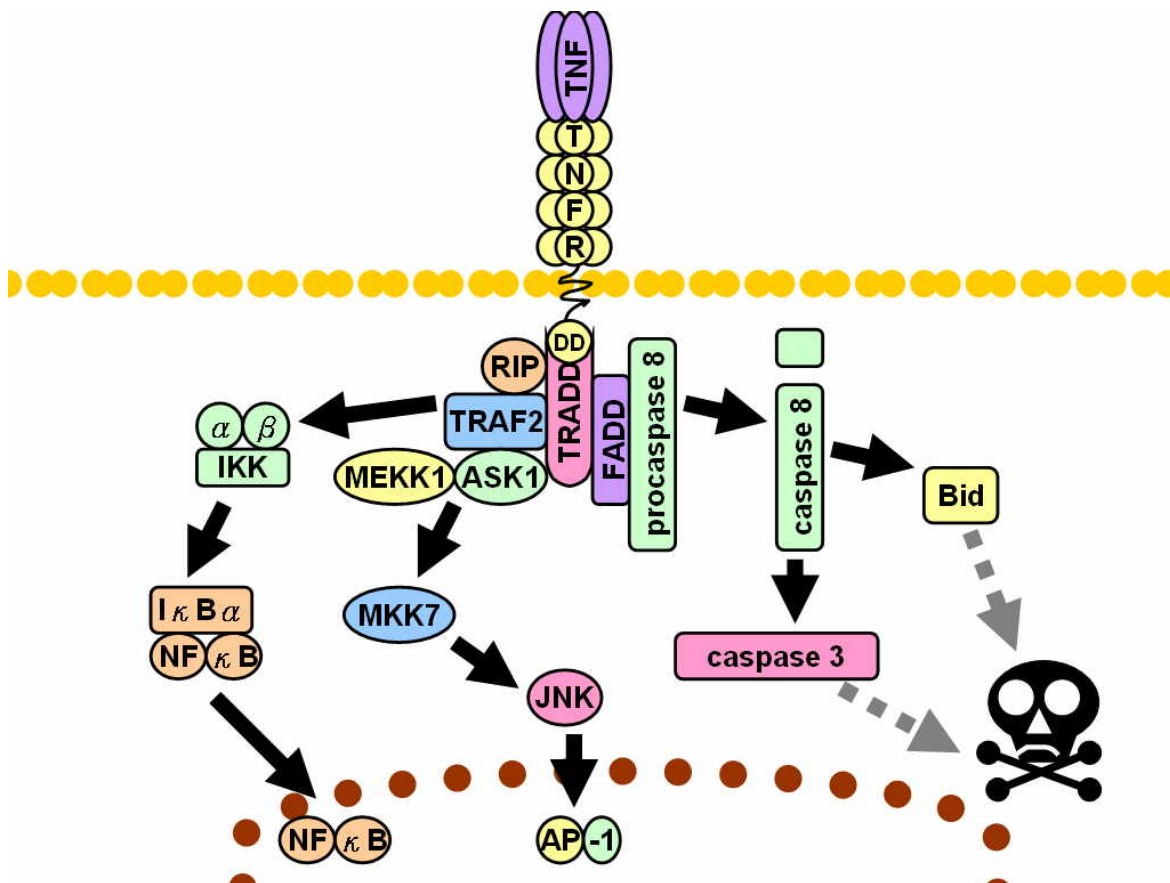
Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3 (RIP3) je del signalnega kompleksa za aktivacijo NF-kappa B transkripcijskega faktorja ter je komponenta faktorja tumorske nekroze (TNF), receptorja-I-signalnega kompleksa. Veže TRAF2 in RIPK1 in sodeluje v TNFR-1 signalnem kompleksu specifične C-terminalne domene. V celici s fosforilacijo različnih znotrajceličnih beljakovin povzroči pomembne aktivnosti v celici (npr. fosforilacija Ca^{2+} kanalčkov povzroči odprtje teh). Igra pomembno vlogo pri vnetju, avtoimunskem odgovoru, celični proliferaciji ter apoptozi in nekrozi ter presnovni energiji z uravnavanjem metabolizma glikogena, sladkorjev in presnove maščob (22-23). V raziskavi so pokazali, da z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3 (RIP3) v nekaterih celicah deluje pro-apototsko in sicer z aktiviranjem kaspaz ali zaviranjem RIP (23-26).

1.4.3 Aktivacija dejavnika NF- κ B s TNF

Signalno pot NF- κ B lahko sprožijo različni signali kot so citokini, rastni faktorji, stres, bakterije in virusi. Citokini sprožijo produkcijo od NF- κ B odvisnih kemokinov (IL-8, eotaksin), adhezijskih molekul (E-selektin, intercelična adhezijska molekula 1) in inducibilnih encimov (ciklooksigenaza-2), kar prispeva k moči in trajanju imunskega odgovora. FADD (angl. Fas-associated death domain protein) je vpleten v signalno kaskado, ki sproži apoptozo, medtem ko sta RIP (receptor družine za protein kinazo) in TRAF2 pomembna za TNF-R1 inducirano aktivacijo NF- κ B (jedrni transkripcijski faktor iz družine NF- κ B) preko aktivacije in mobilizacije I κ B kinaznega kompleksa (IKK). Aktivacija NF- κ B povzročena s strani TLR (receptorji imunskih celic), vodi do izražanja več genov, tudi citokinov, med katerimi sta pomembna tumor nekrotizirajoči faktor (TNF) in interleukin (IL-1G). TNF in IL-1G direktno vplivata na regulacijo izražanja NF- κ B, s čimer se vzpostavi pozitivna avtoregulatorna zanka, ki tako še poveča aktivacijo NF- κ B in s tem tudi izražanje citokinskih genov.

Citokin TNF (dejavnik tumorske nekroze) se veže na TNF-receptor 1 (TNF-R1). Vezava TNF na TNF-R1, receptorju omogoči mobilizacijo TRADD (angl. TNF-receptor associated death domain), ki nadalje mobilizira FADD (angl. FAS associated death domain), receptor za družine protein kinaz RIP in TRAF2 (TNF- angl.receptorassociated factor 2). Po mobilizaciji TRADD so mogoče tri signalne poti:aktivacija NF- κ B (jedrni

faktor – κ B (NF- κ B), aktiviranje poti MAPK (angl. Mitogen-activated protein kinases) ter aktivacija FADD (angl. FAS associated death domain) FADD je vpleten v signalno kaskado, ki sproži apoptozo, medtem ko sta RIP in TRAF2 pomembna za TNF-R1 inducirano aktivacijo NF- κ B preko aktivacije in mobilizacije I κ B kinaznega kompleksa (IKK), kar prikazuje Slika 5.



Slika 5: Aktivacija dejavnika NF- κ B s TNF

<http://en.wikipedia.org/wiki/TRADD>

Drugi dejavniki, kot so vrsta celic, hkratio spodbujanje drugih citokinov, ali povečanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS), lahko spremenijo ravnovesje v korist ene ali druge poti. Takšna zapletena signalizacija zagotavlja, da vsakič, ko se sprosti TNF, je mogoč različen odziv celic na nekrozo oz. vnetje (17-18).

1.4.4 Nekroza in apoptoza celic

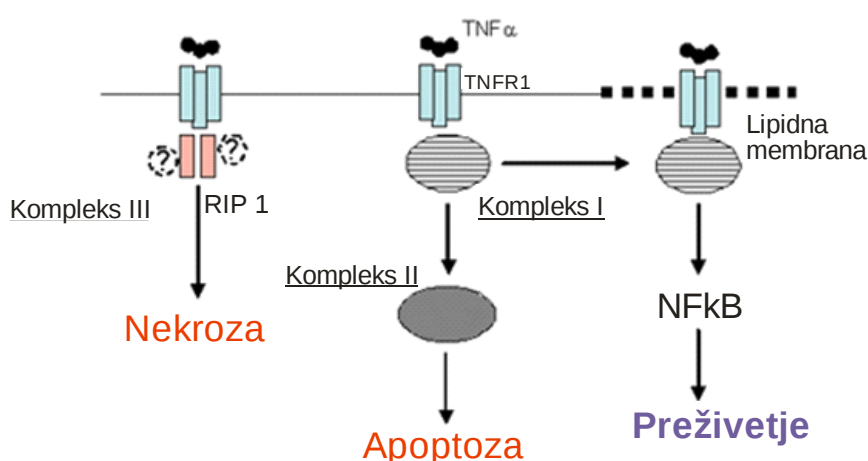
Obstajata dva programa za smrt celic z jedri: nekroza in apoptoza. Nekroza je posledica povečanja propustnosti celične membrane, ki je tipična za patološko okvaro tkiva, ki nastane pri ishemiji (neuravnotežen ozmotski tlak) in fizično ali kemično povzročeni celični smrti. Pri nekrotični celični smrti se sproščajo celične komponente, ki sprožijo vnetni odziv (14).

V zadnjih raziskavah pa ugotavljajo, da je tudi nekroza gensko uravnavana. Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3 (RIP3) deluje kot posrednik "programirane nekroze", pri nekaterih celičnih linijah v smislu nekroze kot inhibitor apoptoze. Vendar, je področje še zelo neraziskano (15).

Apoptoza pa je nasprotno aktivno uravnavan proces celične smrti, ki ne povzroči vnetja. Apoptoza sodeluje pri organiziranem odstranjevanju celic in tkiv, ne da bi se porušila njihova arhitektura. Ta proces se dogaja tudi pri kostni premeni, vendar še ni pojasnjeno ali je skrajšanje življenske dobe osteoklastov posledica neposredne citotoksičnosti ali vzpodbujene apoptoze teh celic.

Delovanje $\text{TNF}\alpha$ z aktivacijo receptorja TNFR 1, vodi do aktivacije več različnih signalnih poti, ki izhajajo iz različnih alternativnih oblik celične smrti (apoptoze ali nekroze) ali pro-preživetje/pro-protivnetno NF κ B aktivnost, kar prikazuje Slika 6.

Nezmožnost odstranitve okvarjenih in mutiranih celic zaradi napak v neapoptotskih procesih, pa je značilnost avtoimunskih in malignih obolenj (17).



Slika 6: Celična smrt ali preživetje

1.4.5 Metabolizem in vloga RIP3 kinaze v nutrigenomiki

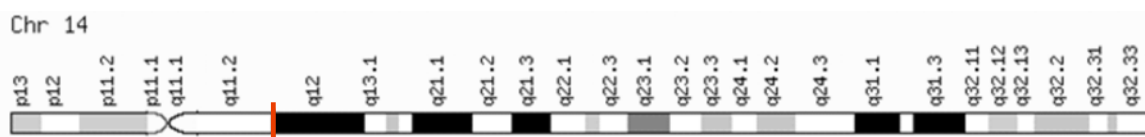
Raziskave so pokazale, da na metabolizem pomembno vplivajo mediatorji vnetja, kot so TNF, IL-1 in IL-6. V študiji so ugotovili, da je izražanje gena RIPK3 v mononuklearnih celicah periferne krvi (PBMC) debelih oseb, ki so uspešno shujšale večje pri osebah, ki so se po šestih mesecih zopet zredile kot pri osebah, ki so obdržale pridobljeno težo. Nivo izražanja gena RIPK3 bi lahko bil označevalec tveganja za uspešnost zdravljenja debelosti oz. kot nutrigenomičen biooznačevalec za individualno oceno rezultatov zdravljenja debelosti.

Rip3 kinaze sodelujejo tako v regulaciji kot povezavi procesov presnovne energije, kar kaže na njeno pomembno vlogo v presnovnih boleznih kot sta sladkorna bolezen in debelost.

Vloga RIPK3 kinaze pri usklajevanju TNF celičnega signala povzroči nekrozo, kot posledica povečane koncentracije ROS spojin zaradi povečane energije metabolizma. Metabolizem glutamina tudi postredno sodeluje v Krebsovem ciklu in posledično v dihalni verigi, ki prispeva k ROS produkciji (18).

1.5 Gen RIPK3

Gen RIPK3 kodira proteinsko kinazo (RIPK3, angl. receptor-interacting serine-threonine kinase 3). Odkrit je bil z fluorescentno hibridizacijo na kromosomu 14q11.2 in je velik 4016 bp (Slika 7). Poznani so trije transkripti tega gena; RIPK3-001, ki je velik 1883bp in vsebuje 10 eksonov, RIPK3-201, ki je velik 906bp in vsebuje 5 eksonov ter RIPK3-202, ki je velik 1913bp in vsebuje 6 eksonov. Poznan je tudi pod imenom RIP in RIP3 (23).



Slika 7: Kromosom 14 in mesto 14q11.2 gena RIPK3

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RIPK3>

Gen RIPK3 je kandidatni gen povezan z delovanjem imunskega sistema, zlasti v zvezi s TNF, TRAIL (angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand) in MAPK (angl. Mitogen-activated protein kinases) signalnimi potmi celic (30).

1.5.1 Polimorfizmi v promotorju gena RIPK3

Regulacija izražanja gena se vrši na odseku promotorja gena RIPK3 in je pred kodirajočo regijo. V promotorju gena se prične prepisovanje mRNA, tam je vezavno mesto za encim mRNA polimerazo, kot tudi vezavna mesta za druge elemente za vezavo, od katerih je odvisna intenzivnost izražanja gena. Spremembe v nukleotidnem zaporedju v promotorju lahko vplivajo na uspešnost izražanja gena. V naši študiji smo izbrali dva polimorfizma v potencialni promotorski regiji gena RIPK3. Položaj polimorfizma -407 G>A in polimorfizma -753A>T se nanaša na začetno mesto transkripcije, katera smo raziskovali. Podatki za oba polimorfizma so opisani v Preglednici VIII (23-26).

Preglednica VIII: Podatki za za polimorfima -407 in polimorfizma -753 v promotorju gena RIPK3

SNP	POLOŽAJ NA KROMOSOMU	POLOŽAJ NA GENU	SPREMEMBA NUKLEOTIDA
rs 1007381	24809611	-407	G>A
rs 3212245	24809957	-753	A>T

Polimorfizem -407G>A in polimorfizem -753A>T v genu RIPK3, se nahajata na nekodirajoči regiji, pred 5' UTR (neprevedena regija gena).

Glede na objavljene študije še ni podatkov o pomenu izbranih polimorfizmov pri osteoporozi ali drugih obolenjih. Pokazali pa so na povezanost dveh polimorfizmov (rs3212247 in rs3212243) znotraj nekodirajoče regije v genu RIPK3 za razvoj non-Hodgkin limfoma (30).

2. NAMEN DELA

Nastanek osteoporoze je povezan z dejavniki okolja ter genskimi dejavniki. V naši nalogi smo izbrali gen RIPK3 kot enega od kandidatnih genov, ki se je izkazal kot potencialno povezan z osteoporozo v vsegenomski študiji izražanja genov v primarni kulturi osteoblastov (32).

Znotrajcelično signaliziranje v osteoklastih poteka po več signalnih poteh, ki regulirajo proliferacijo, diferenciacijo, reorganizacijo citoskeleta in preživetje osteoklastov.

Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3, ki jo kodira gen RIPK3 je potencialno vključena v signalno pot NF-kappa B v osteoklastih.

Z receptorjem povezana serin/treonin proteinska kinaza 3 ima v celicah pomembno vlogo pri vnetju, avtoimunskem odgovoru, celični proliferaciji ter apoptozi in nekrozi ter presnovni energiji.

Namen našega dela je določiti pogostnost polimorfizmov -407G>A in -753A>T v promotorski regiji gena RIPK3, ugotoviti njihovo povezavo z MKG in biokemičnimi kazalci ter tako oceniti njihov klinični pomen pri razvoju osteoporoze v slovenski populaciji.

V ta namen bomo:

- v raziskavo vključili 855 preiskovancev, katerim je bila izolirana DNA iz levkocitov venske EDTA krvi, izmerjena MKG in določeni biokemični kazalci kostne premene
- z reakcijo PCR v realnem času in uporabo sond TaqMan® preverili prisotnost polimorfizmov -407G>A in -753A>T v promotorju gena RIPK3
- z alelno diskriminacijo določili genotipe preiskovancev
- s statistično analizo določili povezanost genotipov preiskovancev z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene ter tako oceniti njihov klinični pomen pri razvoju osteoporoze, ter odzivnost na zdravljenje z alendronatom in raloksifenom

3. METODE IN MATERIALI

3.1. Opis preiskovancev

V našo raziskavo smo vključili 855 preiskovancev iz različnih slovenskih medicinskih centrov: Klinike za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in Mariboru ter Splošne bolnišnice Celje- Travmatološki oddelek. V vseh ustanovah so preiskovancem z metodo DXA izmerili mineralno kostno gostoto (MKG) v predelu vratu stegenice (MKG_{fn}), celotnega kolka (MKG_{tot}) ter ledvenih vretenc (MKG_{ls}).

Raziskava je bila odobrena s strani etične komisije po predhodni pisni privolitvi preiskovancev za vključitev njihovih vzorcev v raziskavo.

Preiskovance smo razdelili v skupine glede na spol, menopavzni status, prisotnost osteoporoze in terapijo, kar prikazuje Preglednica IX.

Preglednica IX: Razdelitev preiskovancev

SKUPINA 1	➤ 117 moških
SKUPINA 2	➤ 57 premenopavznih žensk
SKUPINA 3	➤ 480 pomenopavznih žensk • 235 zdravih pomenopavznih žensk • 245 pomenopavznih žensk z osteoporozo
SKUPINA 4	➤ Preiskovank z osteoporozo zdravljenih z: • 56 raloksifenom • 52 alendronatom
SKUPINA 5	➤ 145 Preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo

3.1.1 Merjenje mineralne kostne gostote

Z metodo DXA so vsem preiskovancem izmerili mineralno kostno gostoto (MKG) v predelu vratu stegenice (MKG_{fn}), celotnega kolka (MKG_{tot}) ter ledvenih vretenc (MKG_{ls}).

Pomenopavzne preiskovanke (N=52) so po začetnem merjenju MKG zdravili z dnevnim odmerkom 10mg alendronata ter 500mg kalcija in 500UI vitamina D₃. Pomenopavzne preiskovanke (N=56) so po začetnem merjenju MKG zdravili z dnevnim odmerkom 60mg raloksifena ter 1000mg kalcija in 400UI vitamina D₃. Po enoletni terapiji so istim preiskovankam ponovno izmerili MKG in vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene.

3.1.2 Merjenje koncentracije biokemičnih kazalcev kostne premene

Priskovancem so izmerili koncentracije biokemičnih kazalcev kostne premene in sicer ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANKL), osteoprotegerin (OPG), osteokalcin (OC), C-terminalni telopeptid kolagena tip I (CTX), kostne alkalne fosfataze (BALP), deoksipiridinolin (DPYP) in katepsin K. Serumske vrednosti CTX, sRANKL, sOPG in katepsin K so določili z encimskoimunsko metodo. Koncentracijo plazemskega pOC so določili s kemiluminiscentno encimskoimunsko metodo. Serumske vrednosti sBALP so določili z radioimunsko metodo. Koncentracijo deoksipiridinolina (DPYP) so izmerili z encimskoimunsko metodo v urinu.

3.1.3 Opis vzorcev DNA

Preiskovancem so odvzeli vensko kri, ki so jo shranili pri -20°C. V časovnem okviru petih dni so iz levkocitov odvzete krvi izolirali genomsko DNA. Uporabljena je bila metoda izsoljevanja po Millerju. Za rokovanje z vzorci je obvezna uporaba rokavic za enkratno uporabo.

Za izvedbo genotipizacije je pomembno, da so raztopine vzorčnih DNA enakih koncentracij, v naši raziskavi so imeli vzorci koncentracijo 3ng/μL.

Vzorci so bili pripravljeni v mikrotiterskih ploščah s 96-imi mikroepruvetami, ki so označene s številko P-1 do P-9. Zaradi možnosti kontaminacije in izhlapevanja vzorcev redčenih DNA je pri odpiranju in zapiranju mikroepruвет potrebna večja pazljivost, še zlasti je pomembno dobro zapreti vse mikroepruvete na mikrotiterskih ploščah in jih v vrečki shraniti v hladilniku na +4° ter pred pipetiranjem centrifugirati.

3.2. Genotipizacija

3.2.1 Reakcija verižne polimerizacije

Reakcija verižne polimerizacije (angl. polymerase chain reaction, PCR) je metoda molekularne biologije za hitro pomnoževanje odsekov DNA *in vitro* za nadaljnje analize.

V reakcijski zmesi za izvedbo PCR so:

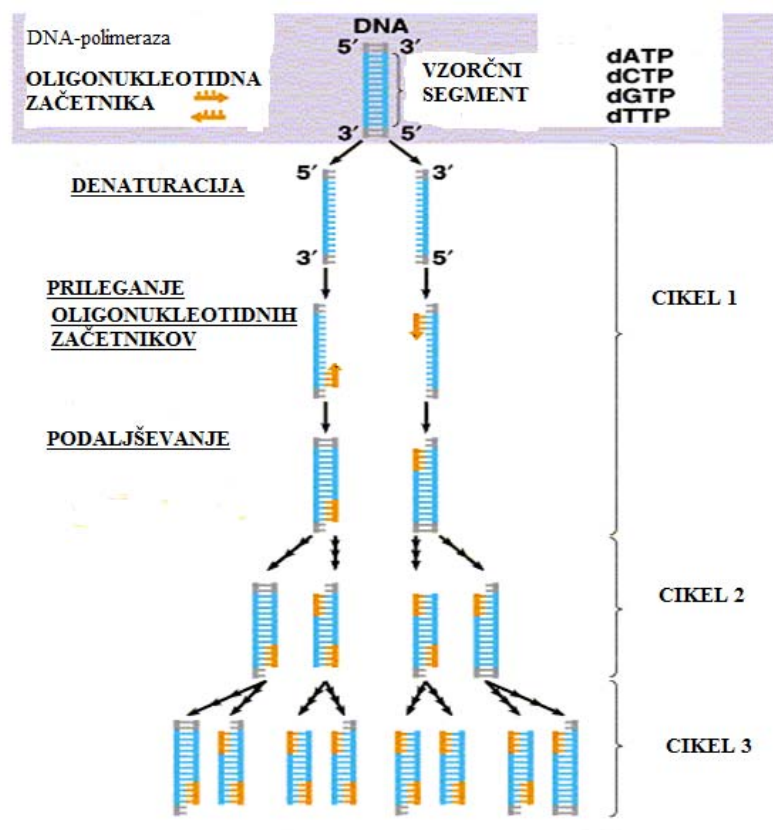
- genomsko DNA, ki jo želimo pomnoževati - matrična DNA
- oligonukleotidni začetniki izbranega odseka
- termostabilna DNA-polimeraza
- deoksiribonukleozid-trifosfati
- pufer za optimalno delovanje encima
- ioni Mg^{+2}

En cikel reakcije verižne polimerizacije je sestavljen iz treh stopenj (Slika8):

Denaturacija – z visoko temperaturo 92 - 95°C razcepimo komplementarni verigi matrične DNA

Prilegajanje oligonukleotidnih začetnikov na obe enovijačni DNA v odseku DNA, ki ga želimo pomnožiti in poteka pri 40 - 60°C (matrično DNA)

Podaljševanje verige – temperaturo dvignemo na 72°C, ki je optimalno območje za delovanje termostabilne DNA-polimeraze, ki se veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri 5' do 3' konca in tako izgradi komplementarno verigo DNA. DNA, ki nastane v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih kopij v drugem ciklu. Z enim ciklom reakcije dobimo iz ene molekule tarčne DNA dve molekuli. Običajno izvedemo 20 do 40 ciklov (20).



Slika 8: Potek reakcije verižne polimerizacije

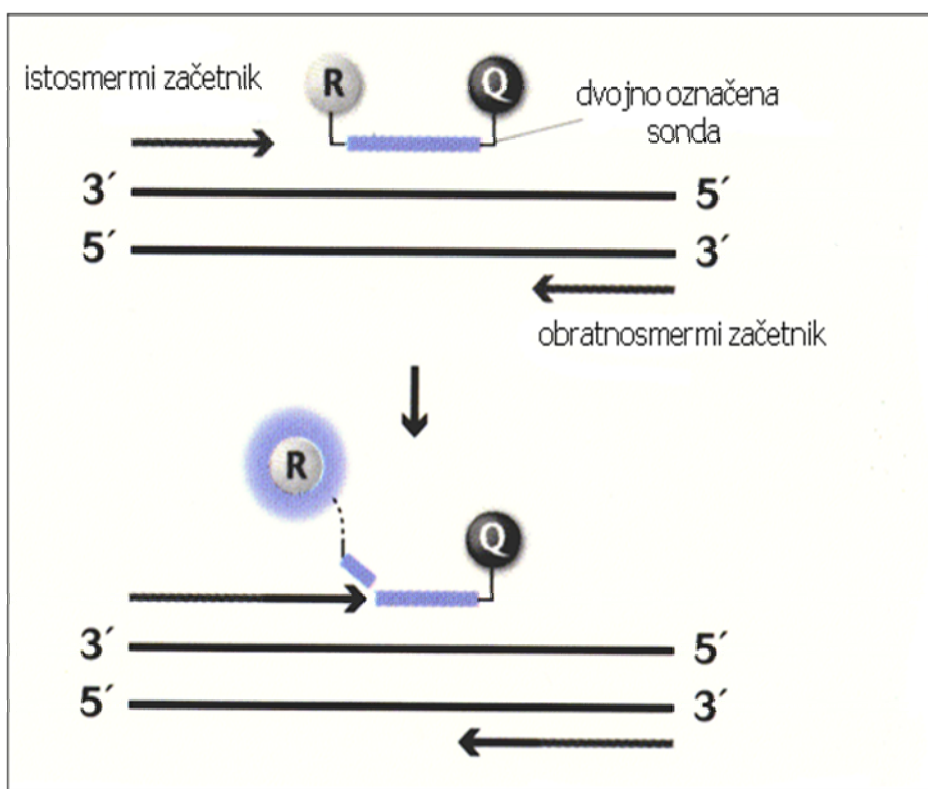
http://scienceblogs.com/insolence/2007/06/the_autism_omnibus_the_difference_betwee.php

3.2.2 Alelna diskriminacija

Alelna diskriminacija, vključuje verižno reakcijo v realnem času (Real Time PCR) in detekcijo specifičnih nukleotidov, ter je metoda za določanje znanih mutacij ali polimorfizmov. Z verižno reakcijo v realnem času pomnožimo izbran odsek DNA, ki ga želimo genotipizirati. Detekcija poteka po končanem pomnoževanju. Uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide-specifične sonde, ki prepoznajo in se vežejo na normalno oz. spremenjeno zaporedje. Na osnovi jakosti signalov sond za normalni oz. spremenjeni alel določimo preiskovani genotip. Pogoji za uspešno alelna diskriminacijo je uspešno pomnoževanje specifičnega DNA zaporedja, da lahko pride do razpada sonde in posledičnega emitiranja reporterske fluorescence (22).

3.2.3. Specifični način detekcije

Specifičen način detekcije predstavljajo s fluorofori označeni oligonukleotidi (sonde), ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Za meritev signala izkoriščamo princip fluorescenčnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo (Slika 9). Kadar sta dva fluorofora, katerih ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata, dovolj blizu, ekscitacija donorskega barvila povzroči emisijo svetlobe, ki ekscitira akceptorsko barvilo, to pa posledično emitira svetlobo drugačne valovne dolžine (22).



Slika 9: Potek reakcije PCR v realnem času in detekcija produktov PCR s hidrolizirajočimi sondami

3.2.4. Hidrolizirajoče sonde

V reakcijsko zmes dodamo hidrolizirajočo sondo, ki je specifično prepozna in se v stopnji prileganja veže na tarčno zaporedje DNA. Sonda ima na obeh koncih vezana različna fluorofora. Pri intaktni sondi fluorescenco, ki jo emitira reportersko barvilo, vezano na 5' koncu, prestreže drugo barvilo, imenovano dušilec, ki je vezano na 3' koncu (Slika 9).

Za vsak polimorfizem smo uporabili en par TaqMan® hidrolizirajočih sond. Vsaka detektira specifičen alel oz. se razlikujeta v enem baznem paru, tako da ustreza ena izmed

sond mutiranemu zaporedju, druga pa nemutiranemu zaporedju. Pri vsakem paru ima prva sonda na 5' koncu vezano fluorescentno reportersko barvilo(R) FAM, druga pa fluorescentno reportersko barvilo(R) VIC, na 3' koncu pa imata obe vezani dušilec (Q).

Tekom PCR v stopnji podaljševanja eksonukleazna aktivnost Taq DNA-polimeraze hidrolizira tarčno zaporedje vezane sonde. Z razgradnjo sonde se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem poveča in tako je onemogočeno prestrezanje fluorescence. Poveča se fluorescenca obeh barvil, katera valovna dolžina je za vsako barvilo drugačna, kar prikazuje Preglednica X. Porast fluorescence detektiramo in je sorazmerna količini nastalega produkta PCR (22,27).

Preglednica X: Valovne dolžine (nm) reporterskih barvil

REPORTERSKO BARVILO	VALOVNA DOLŽINA (nm)
zelena VIC	535-580
modra FAM	465-510

3.2.5. Priprava reakcijske zmesi

Reakcijske zmesi sta se razlikovali v vsebnosti MasterMix različnih proizvajalcev in uporabi sond za oba polimorfizma. Po prvem vrednotenju genotipov vzorcev DNA za polimorfizem-407G>A, smo se zaradi slabih rezultatov (jakosti fluorescenc) odločili za zamenjavo reakcijske zmesi. Za pripravo reakcijske zmesi za polimorfizem -407G>A smo uporabili TaqMan® Universal PCR MasterMix proizvajalca AB Applied Biosystems. Reakcijska zmes za polimorfizem -753A>T pa je vsebovala MasterMix proizvajalca Solis BioDyne.

V Preglednici XI je podana sestava reakcijske zmesi za polimorfizem -753A>T. V Preglednic XII je podana sestava reakcijske zmesi za polimorfizem -407G>A (23).

Preglednica XI: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje vzorčne DNA za polimorfizem -753A>T

REAGENTI	VOLUMEN (μL) za en vzorec	VOLUMEN (μL) za 220 vzorcev
MasterMix (AB Applied Biosystems) 2x	3,0	660,0
Ustrezna sonda TaqMan® z oligonukleotidnimi začetniki 20x	0,15	33,0
Vzorčna DNA	2,85	
Skupni volumen	6,0	6,0

Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje vzorčne DNA za polimorfizem -407G>A

REAGENTI	VOLUMEN (μL) za en vzorec	VOLUMEN (μL) za 220 vzorcev
Ultra čista voda	1,8	396
Ustrezna sonda TaqMan® 20x z oligonukleotidnimi začetniki	0,15	33,0
MasterMix (Solis) 5x	1,2	264
Vzorčna DNA	2,85	
Skupni volumen	6,0	6,0

Za serijo 192 vzorcev DNA smo pripravili reakcijsko zmes tako, da smo posamezne količine reagentov pomnožili s številom vzorcev in upoštevali približno 10% pribitek, zaradi realnih izgub pri pipetiranju.

Ploščico z 384 mikroepruветami, ki je vsebovala reakcijsko zmes in vzorčno DNA, smo prekrili s samolepilno prozorno folijo ter jo centrifugirali 4 minute pri 2000 obratih/min. Ploščico smo nato vstavili v ciklični pomnoževalnik Light Cycler® 480 Real-TimePCR system, ki omogoča pogoje za pomnoževanje izbranih fragmentov in odčitava fluorescence v raztopini.

Preglednica XIII: Shema temperaturnega programa reakcije PCR v realnem času

ZAČETNA DENATURACIJA		DENATURACIJA		PRILEGAJANJE IN PODALJŠEVANJE	
ČAS (min)	TEMPERATURA (°C)	ČAS (s)	TEMPERATURA (°C)	ČAS (s)	TEMPERATURA (°C)
15	95	20	95	60	60
ŠTEVILO CIKLOV		50x			

3.2.6 Splošna opozorila

Za zagotovitev kakovosti rezultatov testiranja je pomembno, da metode testiranja izvajamo v laboratoriju namenjenem za PCR reakcije. Reakcijska zmes za PCR je zelo občutljiva na kontaminacijo z DNA iz okolja. V PCR laboratoriju smo uporabljali čisto delovno haljo in zaščitne rokavice brez smukca. Priprava reakcijske zmesi in pipetiranje poteka v za to namenjeni delovni komori. Plastične nastavke za pipete in epruvete s pokrovčkom smo pred uporabo avtoklavirali. Pred pričetkom pipetiranja smo delovno površino in delovne pripomočke očistili s 3% hipokloritom ali z 10% etanolom in jih pred začetkom dela postavili v komoro ter izpostavili UV svetlobi za 30 minut.

Ultra čisto vodo smo shranjevali v zmrzovalniku pri -20°C v epruvetah s pokrovčkom neposredno pred uporabo pa smo jo izpostavili UV svetlobi. TagMan® sonde, smo shranjevali v zmrzovalniku pri -20°C v epruvetah s pokrovčkom, zaščitene pred svetlobo, neposredno pred uporabo pa smo jo odtajali (brez gretja). TagMan® Genotyping MasterMix pa smo shranjevali pri temperature 4°C.

3.2.7 Reagenti in oprema

Reagenti:

- 5xHot Fire Pol Probe qPCR Mix Plus proizvajalca Solis Bio Dyne; sestava: qPCR puffer, 15mM MgCl₂, dNTP, brez pasivne reference (noRox), HOT FIREPol-polimerazo

- TaqMan® Genotyping masterMix proizvajalca AB Applied Biosystems; sestava: puffer, z optimizirano sestavo, deoksiribonukleotidi trifosfati (dNTPji); Amplitaq Gold® DNA polimeraza, ultračista; ROX pasivna referenca
- TaqMan® SNP genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), ki vsebuje oligonukleotidne začetnike dve TaqMan® sondi (za vsak polimorfizem svoj reagenčni komplet)

Podatki za sonde

- 40x SNP Genotyping Assay, sonda za polimorfizem -753A>T
- Okvir sekvence za VIC/FAM:

CCAGGGCATTGTGGTAAGGCTAGAT[A/T]TATCAGCCCATCCAGAGGGTTGGTG

40x SNP Genotyping Assay, sonda za polimorfizem - 407G>A

- Okvir sekvence za VIC/FAM:

TCTCACACGAACCCTAAGGGGATAG[A/G]TACTGCTTTTATTACCTTTCTATAG

Aparature in pribor:

- Ciklični pomnoževalnik LightCycler® 480 II Real-Time PCR analizator
- Avtoklav A-21 (Kambič, laboratorijska oprema)
- Delovna komora z UV lučko
- Laboratorijska centrifuga Mikro-242
- Laboratorijska centrifuga 322A Tehnica
- Mešalnik Vortex-2 Genie
- Avtomatska 12-kanalna mikropipeta
- Polavtomatske pipette (Eppendorf; 2,5µL; 20 µL , 200µL,1000 µL)
- Miktotiterske plošče za 96 vzorcev za enkratno uporabo
- Miktotiterske plošče za 384 vzorcev za enkratno uporabo
- PVC škatlice za različne volumne nastavkov za avtoklaviranje
- Stekljeni kozarčki za avtoklaviranje PVC epruvet s pokrovčkom 0,5 in 1,5mL
- Zaščitne rokavice za enkratno uporabo Kimberly-Clark
- Samolepilna folija za miktotiterske plošče

3.2.8 Statistične metode

Najprej smo določili frekvence genotipov. S hi-kvadrat testom smo preverili ali porazdelitev genotipov ustreza Hardy-Weinbergovemu ravnovesju.

Z Shapiro-Wilk testom smo preverili, če se spremenljivke porazdeljujejo normalno ali nenormalno oz. parametrično ali neparametrično. Nadalje smo za normalno porazdeljene spremenljivke uporabili analizo variance One-Way ANOVA (za tri skupine) ali T-test dveh neodvisnih vzorcev (za dve skupini), za nenormalno porazdeljene pa neparametrične teste (Kruskal-Wallis test – za več neodvisnih spremenljivk; Mann-Whitney test – za dve neodvisni spremenljivki). S Scheffe post hoc testom smo ugotavljali statistično značilne razlike med posameznimi podskupinami.

Pri preiskovanju hipotez smo vrednosti p manjše od 0,05 upoštevali za statistično značilne. Statistično analizo smo opravili s programskim paketom SPSS verzija 16.0.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Vrednotenje rezultatov genotipizacije

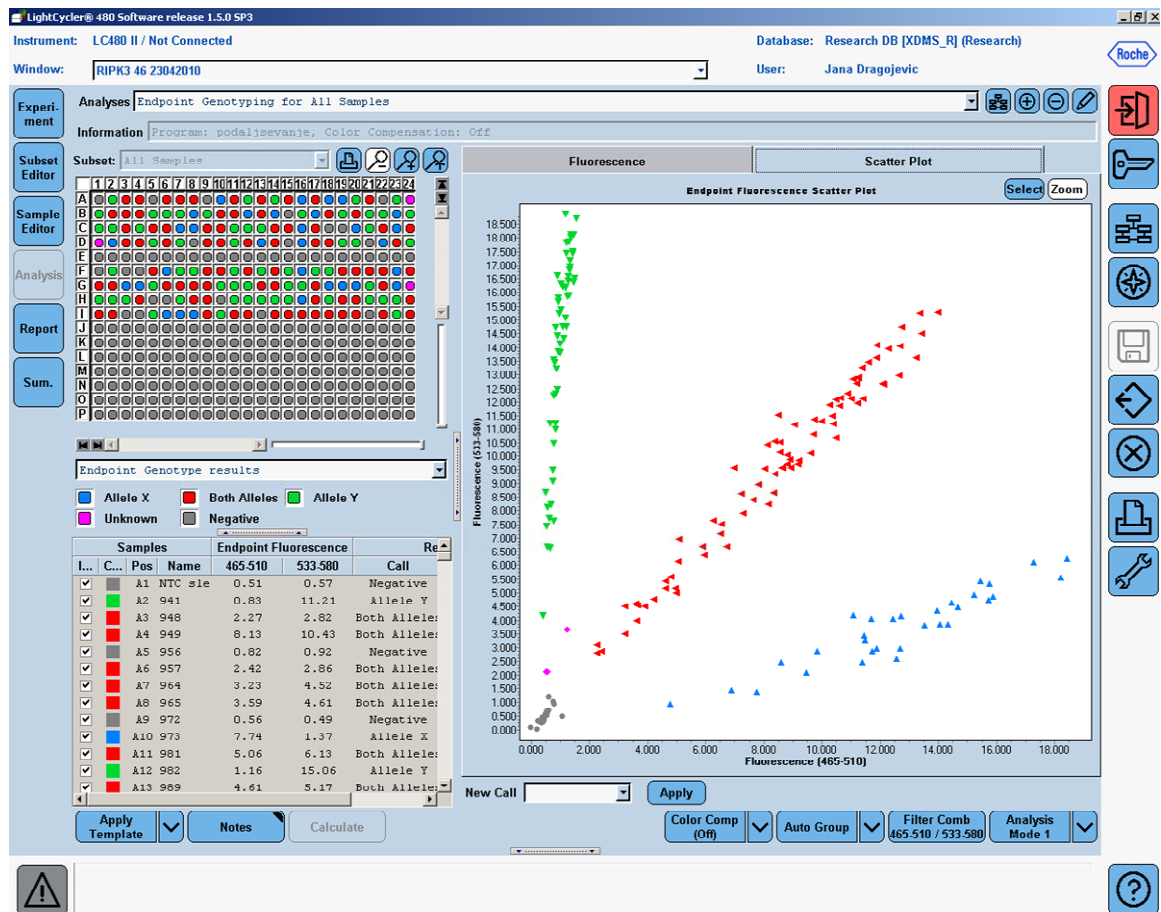
Genotipizacijo smo izvedli na mikrotiterski plošči s 384 mikroepruветami. Najprej smo testirali vzorce vseh preiskovancev s sondama TaqMan za polimorfizem -407G>A, potem pa še s sondama TaqMan za polimorfizem -753A>T. Pogoji reakcije so bili predhodno določeni s strani proizvajalca. Za polimorfizem -753A>T smo po poizkusnem vrednotenju rezultatov izbrali MasterMix proizvajalca AB Applied Biosystems. Za polimorfizem -407G>A pa MasterMix proizvajalca Solis Bio Dyne.

S pomočjo računalniško vodenega čitalca – Light Cycler 480 II smo izvedli reakcijo PCR in alelni diskriminaciji. Porast fluorescenčnega signala je sledil po razpadu sonde, ki se je vezala na komplementarno zaporedje. Računalniški program jakost signala obeh barvil pretvori v sliko, kjer so homozigoti označeni z modro ali zeleno, heterozigoti pa z rdečo barvo, kar prikazujeta Sliki 10 in 11.

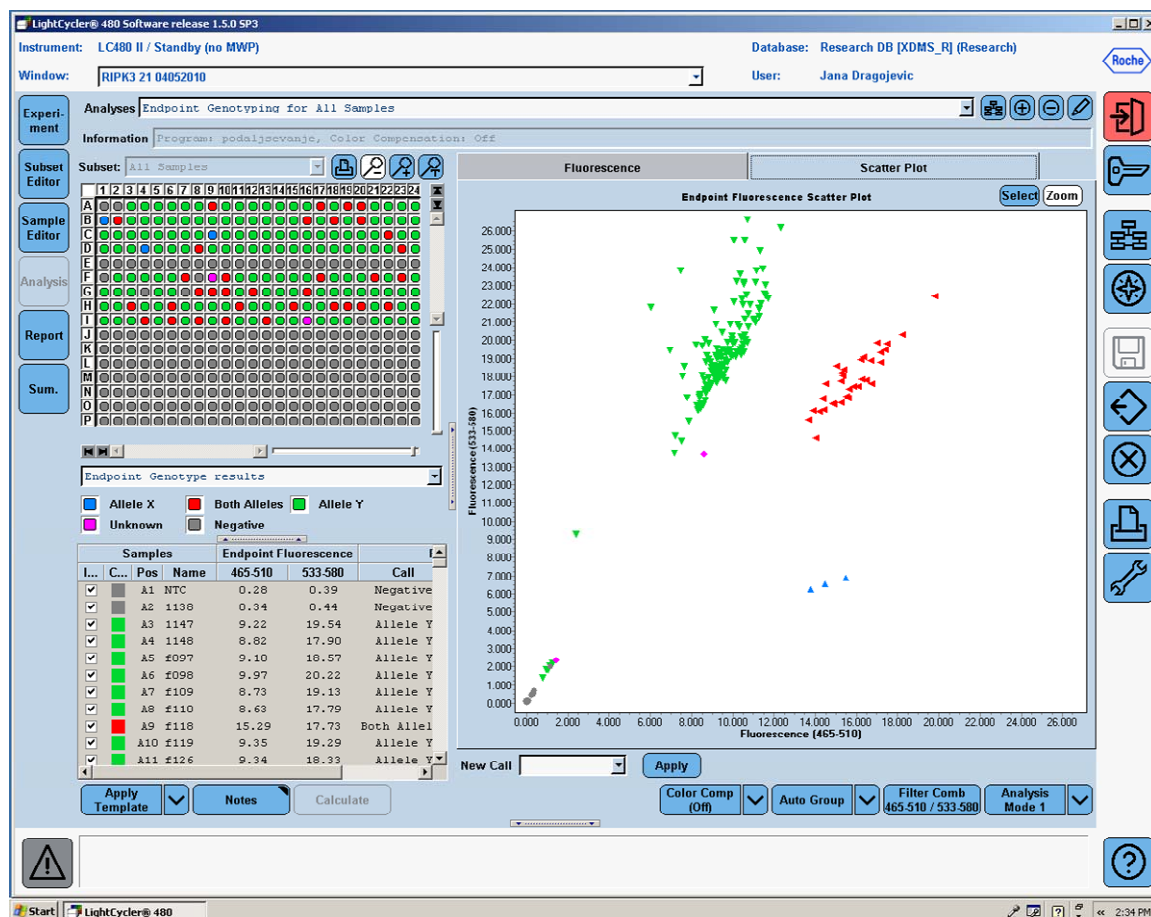
Povezava med nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA in fluorescenčnim signalom za oba polimorfizma je prikazana v Preglednici XIV.

Preglednica XIV: Povezava med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem vzorčne DNA

Porast signala	Genotip za polimorfizem	
	-407G>A polimorfizem	-753A>T polimorfizem
FAM	GG / modri	TT / modri
VIC	AA / zeleni	AA / zeleni
FAM in VIC	GA / rdeči	AT / rdeči
Neopredeljen	roza	roza
Premalo produkta	siva	siva



Slika 10: Prikaz rezultatov alelne diskriminacije z aparatom Light Cycler 480 II za polimorfizem - 407G>A; modra barva: genotip GG-alel X, zelena barva: genotip AA-alel Y in rdeča barva: genotip GA- alel XY



Slika 11: Prikaz rezultatov alelne diskriminacije z aparatom Light Cycler 480 II za polimorfizem -753A>T; modra barva: genotip TT-alel X, zelena barva: genotip AA-alel Y in rdeča barva: genotip AT-alel XY

Pri vseh vzorcih, kjer so rezultati genotipizacije neopredeljeni (roza barve) in opredeljeni kot premalo produkta (sive barve), smo testiranje ponavljali.

Za ponovno neuspele vzorce smo sklepali, da so kontaminirani ali pa je vzrok premajhna količina DNA. Te vzorce smo izločili iz statistične obdelave. Za polimorfizem -753A>T smo vključili v statistično obdelavo 831 vzorcev, za polimorfizem -407G>A pa 760 vzorcev.

4.2. Pogostnost polimorfizmov -753A>T in -407G>A

Genski polimorfizem označuje prisotnost dveh ali več različnih genotipov v neki populaciji in se pojavi pri več kot 1% populacije.

Pogostnost polimorfizma -753A>T in -407G>A v genu RIPK3 v slovenski populaciji smo izračunali na osnovi genotipov, ki smo jih dobili po genotipizaciji 855 vzorcev DNA

(priloga 1). Relativne frekvence genotipov vseh preiskovancev in posameznih skupin preiskovancev, prikazujeta Preglednici XV in XVI.

Preglednica XV: Relativne frekvence (%) genotipov za polimorfizem -753A>T v skupinah preiskovancev

SKUPINA	AA(%)	AT(%)	TT(%)
<u>VSI PREISKOVANCI</u>	77,4	20,3	2,3
MOŠKI	82,3	17,7	0
PREMENOPAVZNE ŽENSKE	68,5	31,5	0
POMENOPAVZNE ŽENSKE	80,3	18,4	1,3
• ZDRAVE POMENOPAVZNE ŽENSKE	76,6	22,5	0,9
• OSTEOPOROZNE POMENOPAVZNE ŽENSKE	84,0	14,3	1,7
POMENOPAVZNE ŽENSKE, zdravljene z RALOKSIFENOM	81,1	18,9	0
POMENOPAVZNE ŽENSKE, zdravljene z ALENDRONATOM	86,0	10,0	4
PREISKOVANCI Z OSTEOPOROZNIMI ZLOMI IN OSTEOARTROZO	54,5	26,2	6,9

Preglednica XVI: Relativne frekvence (%) genotipov za polimorfizem -407G>A v skupinah preiskovancev

SKUPINA	GG(%)	GA(%)	AA(%)
<u>VSI PREISKOVANCI</u>	15,7	45,8	38,6
MOŠKI	15,7	49,0	35,3
PREMENOPAVZNE ŽENSKE	18,5	51,9	29,6
POMENOPAVZNE ŽENSKE	16,1	50,6	33,3
• ZDRAVE POMENOPAVZNE ŽENSKE	15,9	55,0	29,1
• OSTEOPOROZNE POMENOPAVZNE ŽENSKE	16,3	45,8	37,9
POMENOPAVZNE ŽENSKE, zdravljene z RALOKSIFENOM	13,6	40,9	45,5
POMENOPAVZNE ŽENSKE, zdravljene z ALENDRONATOM	16,7	57,1	26,2
PREISKOVANCI Z OSTEOPOROZNIMI ZLOMI IN OSTEOARTROZO	9,7	21,4	51,0

S χ^2 (hi-kvadrat) testom smo primerjali pričakovano gensko frekvenco in opazovano frekvenco genotipov, za oba polimorfizma. Pričakovano gensko frekvenco smo izračunali po Hardy-Weinberg-ovem načelu. Frekvence genotipov po skupinah so bile porazdeljene v skladu s Hardy-Weinbergovem ravnovesjem, razen skupine pomenopavznih preiskovank zdravljenih z alendronatom za polimorfizem -753A>T ter v skupini preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrito za polimorfizem -407G>A. Najverjetnejši razlog je premajhna vzorčna skupina. Sicer so splošni razlogi za neravnovesje, parjenja v krvnem sorodstvu, premik ali pretok genov s preseljevanjem ter v novo nastalih mutacijah. Relativne frekvence posameznih genotipov pri Evropejcih, Azijcih in Afroameričanih prikazujeta preglednici XVII in XVIII.

Preglednica XVII: Relativne frekvence (%) posameznega genotipa pri Evropejcih, Azicij in Afroameričanih za polimorfizem -407G>A (28)

	GG	GA	AA
Evropejci	18,3	43,3	38,3
Azijci :Kitajci/Japonci	81,4 / 62,2	18,6 / 30,5	0,0 / 7,3
Afroameričani	90,0	10,0	0,0

Preglednica XVIII: Relativne frekvence (%) posameznega genotipa pri Evropejcih, Azicij in Afroameričanih za polimorfizem – 753A>T (29)

	AA	AT	TT
Evropejci	83,1	16,9	0,0
Azijci :Kitajci/Japonci	77,8 / 88,9	20,0 / 11,1	2,2 / 0,0
Afroameričani	5,2	55,2	39,75

Rezultati relativne frekvence (%) pri Evropejcih za genotip GG, GA in AA za polimorfizem -407G>A so primerljivi z rezultati naše raziskave ($p=0,984$), kar prikazuje preglednica XIX.

Preglednica XIX: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov pri Evropejcih in naše raziskave za polimorfizem -407G>A
<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fiveby2.htm>

	GG	GA	AA
Evropejci	15,0	46,9	38,1
Naša raziskava	15,7	45,8	38,6

Rezultati relativne frekvence (%) pri Evropejcih za genotip TT, AT in AA za polimorfizem -753A>T so primerljivi z rezultati naše raziskave ($p=0,244$), kar prikazuje preglednica XX.

Preglednica XX: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov pri Evropejcih in naše raziskave za polimorfizem -753A>T
<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fiveby2.htm>

	AA	AT	TT
Evropejci	83,1	16,9	0,0
Naša raziskava	77,4	20,3	2,3

4.3. Povezanost polimorfizmov -753A>T in -407G>A v genu RIPK3 z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene

Preiskovance smo razdelili v skupine glede na spol, menopavzni status, prisotnost osteoporoze in terapijo. Skupino pomenopavznih žensk ($N=480$) smo razdelili na podskupini zdrave pomenopavzne ženske in pomenopavzne ženske z osteoporozo. Preglednici XXI in XXII prikazujeta povprečne vrednosti za starost, telesno maso, višino, pričetek menopavze in trajanje menopavze, indeks telesne mase (ITM), mineralne kostne gostote (MKG) vratu stegenice (MKG_{fn}), celotnega kolka (MKG_{tot}) in ledvenih vretenc (MKG_{ls}) ter koncentracije za osteokalcin (pOC), kostna alkalna fosfataza (sBALP), ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANKL), C-terminalni telopeptid kolagena tip I (CTX), osteoprotegerin (sOPG), deoksipiridinolin (DPYP) in katepsin K.

Preglednica XXI: Povprečne vrednosti antropoloških parametrov, MKG ter biokemijskih kazalcev kostne premene v skupini pomenopavznih žensk, zdravih pomenopavznih žensk in pomenopavzne ženske z osteoporozo

	POMENOPAVZNE ŽENSKE	ZDRAVE POMENOPAVZNE ŽENSKE	POMENOPAVZNE ŽENSKE Z OSTEOPOROZO
<i>Število preiskovancev</i>	480	235	245
<i>Starost (leta)</i>	63,0 ± 8,4	61,6 ± 8,3	64,4 ± 8,2
<i>Masa (kg)</i>	69,7 ± 12,2	73,6 ± 13,0	66,0 ± 10,0
<i>Višina (m)</i>	1,60 ± 0,06	1,61 ± 0,06	1,59 ± 0,06
<i>ITM (kg/m²)</i>	27,3 ± 4,6	28,3 ± 5,0	26,2 ± 3,8
<i>Mena (leta starost)</i>	49,4 ± 4,2	49,8 ± 4,1	48,8 ± 4,4
<i>Leta od mene</i>	12,3 ± 9,2	10,5 ± 8,7	15,3 ± 9,4
<i>MKG_{fn} (kg/m²)</i>	0,691 ± 0,123	0,763 ± 0,117	0,624 ± 0,083
<i>MKG_{tot} (kg/m²)</i>	0,832 ± 0,143	0,914 ± 0,135	0,755 ± 0,099
<i>MKG_{ls} (kg/m²)</i>	0,856 ± 0,164	0,973 ± 0,138	0,742 ± 0,088
<i>pOC (µg/L)</i>	21,7 ± 12,4	15,1 ± 5,3	28,3 ± 13,7
<i>sBALP (µg/L)</i>	12,4 ± 5,2	11,8 ± 4,0	12,4 ± 5,6
<i>RANKL (pmol/L)</i>	0,37 ± 0,51	0,38 ± 0,47	0,34 ± 0,57
<i>CTX (pmol/L)</i>	4021,6 ± 2020,3	3866,0 ± 1840,6	4343,3 ± 2333,0
<i>sOPG (pmol/L)</i>	5,6 ± 1,8	5,16 ± 1,59	6,11 ± 1,84
<i>DPYP(%)</i>	7,62 ± 3,64	/	7,61 ± 3,54
<i>Katepsin K (pmol/L)</i>	3,22 ± 4,22	3,77 ± 4,63	1,44 ± 1,55

Preglednica XXII: Povprečne vrednosti antropoloških parametrov MKG ter biokemijskih kazalcev kostne premene v skupini pomenopavznih žensk zdravljenih z raloksifenom, pomenopavznih žensk zdravljenih z alendronatom, premenopavznih žensk in skupni moških preiskovancev

	POMENOPAVZNE ŽENSKE ZDRAVLJENE Z RALOKSIFENOM	POMENOPAVZNE ŽENSKE ZDRAVLJENE Z ALENDRONATOM	PREMENOPAVZNE ŽENSKE	MOŠKI
<i>Število preiskovancev</i>	56	52	57	117
<i>Starost (leta)</i>	60,5 ± 5,6	65,3 ± 6,4	45,4 ± 4,7	67,6 ± 6,1
<i>Masa (kg)</i>	65,5 ± 8,1	65,8 ± 9,7	65,4 ± 11,8	81,7 ± 12,8
<i>Višina (m)</i>	1,60 ± 0,06	1,57 ± 0,05	1,64 ± 0,06	1,71 ± 0,06
<i>ITM (kg/m²)</i>	25,6 ± 3,1	26,5 ± 3,7	24,3 ± 4,1	27,8 ± 3,7
<i>MKG_{fn} (g/cm²)</i>	0,627 ± 0,786	0,615 ± 0,090	0,778 ± 0,077	0,810 ± 0,154
<i>MKG_{tot} (g/cm²)</i>	0,726 ± 0,965	0,737 ± 0,108	0,915 ± 0,087	1,024 ± 0,160
<i>MKG_{Is} (g/cm²)</i>	0,757 ± 0,699	0,747 ± 0,082	0,997 ± 0,109	1,058 ± 0,176
<i>pOC (μg/L)</i>	33,5 ± 11,7	24,0 ± 8,8	10,6 ± 4,7	9,8 ± 5,3
<i>sBALP (μg/L)</i>	12,3 ± 5,3	12,56 ± 5,53	8,24 ± 3,10	/
<i>RANKL (pmol/L)</i>	/	/	0,50 ± 0,45	0,18 ± 0,11
<i>CTX (pmol/L)</i>	/	/	2679 ± 1366	2004 ± 1087
<i>sOPG (pmol/L)</i>	6,2 ± 2,0	/	3,92 ± 0,916	5,5 ± 1,6
<i>Dpyr(%)</i>	/	7,62 ± 3,64	/	/
<i>Katepsin K (pmol/L)</i>	/	/	8,7 ± 20,2	/

4.3.1. Moški preiskovanci

V raziskavo smo vključili 117 moških, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}) in področja ledvene hrbtenice (MKG_{Is}) ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene v serumu za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kB (sRANKL), osteoprotegerin (sOPG), C-terminalni telopeptid kolagena tipa I (CTX) ter plazemske vrednosti osteokalcin (pOC). Vsem preiskovancem znotraj posamezne skupine niso bili izmerjeni vsi parametri, kar je izraženo v različnem številu (N).

V Preglednici XXIII so za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A podane srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, indeksa telesne mase (ITM) v skupini moških preiskovancev in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave (p) med genotipskimi podskupinami za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A.

Preglednica XXIII: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, pOC, CTX, sRANKL, sOPG ter statistične obdelave (p) v skupini moških z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število moških preiskovancev.

BIOKEMIČNI	-407G>A				-753A>T			
KAZALCI	GG	GA	AA	p	AA	TA	TT	p
starost	68,00 $\pm$ 6,11 (N=16)	66,78 $\pm$ 5,96 (N=50)	68,33 $\pm$ 6,14 (N=36)	0,475	67,29 $\pm$ 6,05 (N=93)	69,15 $\pm$ 6,10 (N=20)		0,183 ^b
ITM (kg/m ²)	27,76 $\pm$ 3,06 (N=16)	28,59 $\pm$ 4,01 (N=50)	26,81 $\pm$ 3,09 (N=36)	0,079	27,88 $\pm$ 3,88 (N=93)	27,70 $\pm$ 3,49 (N=20)		0,743 ^b
MKG _{fn} (g/cm ²)	0,82 $\pm$ 0,12 (N=12)	0,83 $\pm$ 0,16 (N=40)	0,78 $\pm$ 0,15 (N=30)	0,495	0,81 $\pm$ 0,14 (N=70)	0,81 $\pm$ 0,21 (N=16)		0,965 ^b
MKG _{tot} (g/cm ²)	1,03 $\pm$ 0,11 (N=12)	1,02 $\pm$ 0,15 (N=40)	1,03 $\pm$ 0,19 (N=30)	0,895	1,03 $\pm$ 0,15 (N=70)	0,99 $\pm$ 0,19 (N=16)		0,513 ^b
MKG _{ls} (g/cm ²)	1,02 $\pm$ 0,16 (N=16)	1,07 $\pm$ 0,19 (N=49)	1,05 $\pm$ 0,17 (N=36)	0,572	1,06 $\pm$ 0,17 (N=92)	1,04 $\pm$ 0,17 (N=20)		0,794 ^t
sRANKL(pmol/L)	0,20 $\pm$ 0,07 (N=5)	0,15 $\pm$ 0,14 (N=11)	0,21 $\pm$ 0,08 (N=7)	0,546	0,20 $\pm$ 0,11 (N=19)	0,07 $\pm$ 0,09 (N=4)		0,922 ^t
pOC (μg/L)	9,16 $\pm$ 2,91 (N=5)	10,09 $\pm$ 6,57 (N=11)	9,82 $\pm$ 5,03 (N=7)	0,953	9,43 $\pm$ 5,53 (N=19)	11,60 $\pm$ 4,25 (N=4)		0,508 ^t
sOPG (pmol/L)	6,04 $\pm$ 2,00 (N=5)	5,41 $\pm$ 1,15 (N=11)	5,33 $\pm$ 2,02 (N=7)	0,731	5,43 $\pm$ 1,69 (N=19)	5,97 $\pm$ 1,02 (N=4)		0,346 ^t
CTX (pmol/L)	1128 $\pm$ 183 (N=3)	2304 $\pm$ 1180 (N=11)	1890 $\pm$ 1005 (N=6)	0,251	1894 $\pm$ 967 (N=16)	2440 $\pm$ 1577 (N=4)		0,220 ^t

ANOVA-brez oznake, Mann-Whitney test –z oznako^b, T-test- z oznako^t

V skupini moških preiskovancev nismo dokazali statistično značilnih razlik v MKG in biokemičnih kazalcih kostne premene med povprečnimi vrednostmi pri posameznih genotipih polimorfizmov -407G>A ter -753A>T. Rezultat statistične analize v skupini

moških kažejo na to, da omenjena polimorfizma značilno nista povezana z vrednostmi MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene (sRANKL, pOC, sOPG, CTX).

4.3.2. Premenopavzne preiskovanke

V raziskavo smo vključili 57 premenopavznih preiskovank, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}) in predela ledvene hrbtenice (MKG_{ls}) ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (sRANKL), osteokalcin (pOC), osteoprotegerin (sOPG), C-terminalni telopeptid kolagena tip I (CTX), kostno alkalno fosfatazo (sBALP), katepsin K. Vsem preiskovankam znotraj posamezne skupine niso bili izmerjeni vsi parametri, kar je izraženo v različnem številu (N).

V Preglednici XXIV so za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A podane srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, indeksa telesne mase (ITM), v skupini premenopavznih preiskovank in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave (p) med genotipskimi podskupinami za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A.

Preglednica XXIV: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katapsin K ter statistične obdelave (p) v skupini premenopavznih preiskovank z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število premenopavznih preiskovank

BIOKEMIČNI KAZALCI	-407G>A				-753A>T		
	GG	GA	AA	p	AA	AT	p
starost	44,50 $\pm$ 5,85 (N=10)	46,04 $\pm$ 4,35 (N=28)	44,69 $\pm$ 4,60 (N=16)	0,545	44,78 $\pm$ 4,71 (N=37)	46,59 $\pm$ 4,54 (N=17)	0,192 ^t
ITM (kg/m ²)	25,48 $\pm$ 7,22 (N=10)	24,09 $\pm$ 2,87 (N=28)	23,93 $\pm$ 3,79 (N=16)	0,617	23,87 $\pm$ 4,38 (N=37)	25,25 $\pm$ 3,64 (N=17)	0,129 ^b
MKG _{fn} (g/cm ²)	0,793 $\pm$ 0,040 (N=10)	0,796 $\pm$ 0,085 (N=28)	0,739 $\pm$ 0,068 (N=16)	0,052	0,76 $\pm$ 0,07 (N=37)	0,81 $\pm$ 0,08 (N=17)	0,038^t
MKG _{tot} (g/cm ²)	0,926 $\pm$ 0,053 (N=10)	0,929 $\pm$ 0,098 (N=27)	0,882 $\pm$ 0,080 (N=16)	0,211	0,89 $\pm$ 0,08 (N=37)	0,96 $\pm$ 0,09 (N=16)	0,020^t
MKG _{ls} (g/cm ²)	1,012 $\pm$ 0,108 (N=10)	1,017 $\pm$ 0,115 (N=28)	0,953 $\pm$ 0,089 (N=16)	0,152	0,98 $\pm$ 0,11 (N=37)	1,03 $\pm$ 0,11 (N=17)	0,071 ^t
RANKL (pmol/L)	0,30 $\pm$ 0,08 (N=10)	0,55 $\pm$ 0,54 (N=28)	0,53 $\pm$ 0,39 (N=16)	0,168 ^a	0,51 $\pm$ 0,50 (N=37)	0,47 $\pm$ 0,31 (N=17)	0,878 ^b
pOC (μg/L)	9,53 $\pm$ 4,35 (N=10)	9,69 $\pm$ 3,53 (N=28)	12,98 $\pm$ 5,96 (N=16)	0,056	11,32 $\pm$ 4,96 (N=37)	9,14 $\pm$ 3,74 (N=17)	0,105 ^b
sBALP (μg/L)	7,81 $\pm$ 3,27 (N=10)	7,68 $\pm$ 2,72 (N=28)	9,49 $\pm$ 3,45 (N=16)	0,161	8,86 $\pm$ 3,17 (N=37)	6,90 $\pm$ 2,54 (N=17)	0,031^t
sOPG (pmol/L)	333,7 $\pm$ 74,6 (N=10)	313,2 $\pm$ 50,2 (N=28)	305,3 $\pm$ 55,5 (N=16)	0,460	311,1 $\pm$ 54,3 (N=37)	322,6 $\pm$ 62,1 (N=17)	0,492 ^t
CTX (pmol/L)	2388 $\pm$ 1402 (N=9)	2671 $\pm$ 1157 (N=28)	2919 $\pm$ 1789 (N=16)	0,661	2877 $\pm$ 1485 (N=36)	2318 $\pm$ 1139 (N=17)	0,176 ^t
katapsin K (pmol/L)	10,87 $\pm$ 15,2 (N=10)	11,12 $\pm$ 26,9 (N=28)	4,47 $\pm$ 5,75 (N=10)	0,228 ^a	7,23 $\pm$ 14,76 (N=37)	13,17 $\pm$ 30,1 (N=17)	0,564 ^b

ANOVA-brez oznake, Kruskal-Wallis -z oznako^a, Mann-Whitney test -z oznako^b, T-test- z oznako^t

V skupini premenopavznih preiskovank nismo dokazali statistično značilnih razlik v MKG in biokemičnih kazalcih kostne premene med povprečnimi vrednostmi pri posameznih genotipih polimorfizma -407 G>A. Opazili smo mejno značilno razliko med vrednostimi MGKfn skupine z genotipom AA ($0,796 \pm 0,085 \text{ g/cm}^2$), ki je višja od povprečne vrednosti MGKfn kot v skupini genotipa GA ($0,739 \pm 0,068 \text{ g/cm}^2$), vendar ni statistično značilna ($p=0,052$). Opazili smo tudi mejno značilno razliko med vrednostmi pOC skupino z AA genotipom in GG genotipom, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,056$).

V skupini premenopavznih preiskovank smo dokazali **statistično značilne** razlike v MKG-vratu stegnenice in MKG-kolka ter (sBALP) kostne alkalne fosfataze med povprečnimi vrednostmi pri posameznih genotipih polimorfizma -753A>T.

Povprečna vrednost (MKGfn) vratu stegnenice je pri premenopavznih preiskovankah z genotipom AT ($0,81 \pm 0,08 \text{ g/cm}^2$) višja kot pri premenopavznih preiskovank z genotipom AA ($0,76 \pm 0,07 \text{ g/cm}^2$). Razlika je statistično značilna ($p=0,038$). Lahko sklepamo, da prisotnost alela T pri polimorfizmu -753A>T je povezana z večjo (MKGfn) vratu stegnenice in zato manjše tveganje za nastanek osteoporoze.

Povprečna vrednost (MKGtot) kolka je pri premenopavznih preiskovankah z genotipom AT ($0,96 \pm 0,09 \text{ g/cm}^2$) višja kot pri premenopavznih preiskovank z genotipom AA ($0,89 \pm 0,08 \text{ g/cm}^2$). Razlika je statistično značilna ($p=0,020$). Lahko sklepamo, da prisotnost alela T pri polimorfizmu -753T>A pomeni večjo (MKGtot) kolka in zato manjše tveganje za nastanek osteoporoze.

Dokazali smo statistično značilno razliko med genotipom AA in AT ($p=0,031$) za vrednost serumske kostne alkalne fosfataze (sBALP). Srednja vrednost serumske kostne alkalne fosfataze (sBALP) preiskovank z genotipom AA ($8,86 \pm 3,17 \text{ } \mu\text{g/L}$) je značilno višja od srednje vrednosti serumske kostne alkalne fosfataze (sBALP) preiskovank z genotipom AT ($6,90 \pm 2,54 \text{ } \mu\text{g/L}$), kar kaže na vpliv polimorfizma -753A>T na koncentracijo serumske kostne alkalne fosfataze (sBALP) pri skupini premenopavznih preiskovank. Kostna alkalna fosfataza (BALP) je pokazatelj kostne tvorbe in višja vrednost serumske kostne alkalne fosfataze (sBALP) je pokazatelj večje aktivnosti osteoblastov. Osteoblasti gradijo kosti in vplivajo tudi na resorbcijo kosti z vplivom na delovanje osteoklastov. Višje vrednosti serumske kostne alkalne fosfataze (sBALP) preiskovank z genotipom AA ($8,86 \pm 3,17 \text{ } \mu\text{g/L}$), bi lahko povezali z izrazitejšo kostno izgradnjo, kar je lahko povezano z višjo stopnjo remodelacije, ki je značilna za osteoporozo.

Rezultat statistične analize v skupini premenopavznih preiskovank kaže na to, da polimorfizem -753A>T značilno vpliva na MKG in biokemični kazalec kostne premene serumske kostne alkalne fosfataze (sBALP). Prisotnost alela T pri polimorfizmu -753A>T pomeni večjo MKG kolka in MKG vratu stegenice, zato povezana s tveganjem za nastanek osteoporoze.

4.3.3. Pomenopavzne preiskovanke

V raziskavo smo vključili 480 pomenopavznih preiskovank, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}) in predela ledvene hrbtenice (MKG_{ls}) ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (sRANKL), osteokalcin (pOC), osteoprotegerin (sOPG), C-terminalni telopeptid kolagena tipI (CTX), kostno alkalno fosfatazo (sBALP) in katepsin K. Vsem preiskovankam znotraj posamezne skupine niso bili izmerjeni vsi parametri, kar je izraženo v različnem številu (N).

V Preglednici XXV so za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A podane srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, indeksa telesne mase (ITM) v skupini pomenopavznih preiskovank in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave (p) med genotipskimi podskupinami za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A.

Preglednica XXV: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število pomenopavznih preiskovank

BIOKEMIČNI	-407G>A				-753A>T			
KAZALCI	GG	GA	AA	p	AA	AT	TT	p
starost	60,5 $\pm$ 8,36 (N=67)	63,58 $\pm$ 8,78 (N=213)	62,68 $\pm$ 7,87 (N=140)	0,050 ^a	63,2 $\pm$ 8,48 (N=372)	62,53 $\pm$ 8,32 (N=85)	62,7 $\pm$ 5,32 (N=6)	0,819 ^a
ITM (kg/m ²)	27,83 $\pm$ 5,03 (N=68)	27,34 $\pm$ 4,45 (N=214)	27,28 $\pm$ 4,76 (N=140)	0,678 ^a	27,16 $\pm$ 4,60 (N=375)	27,90 $\pm$ 4,49 (N=86)	27,8 $\pm$ 5,89 (N=6)	0,110 ^a
MKG _{fn} (g/cm ²)	0,72 $\pm$ 0,12 (N=68)	0,69 $\pm$ 0,13 (N=214)	0,69 $\pm$ 0,12 (N=141)	0,268 ^a	0,69 $\pm$ 0,12 (N=376)	0,69 $\pm$ 0,14 (N=86)	0,67 $\pm$ 0,13 (N=6)	0,656 ^a
MKG _{tot} (g/cm ²)	0,84 $\pm$ 0,14 (N=68)	0,84 $\pm$ 0,15 (N=212)	0,83 $\pm$ 0,13 (N=141)	0,991 ^a	0,83 $\pm$ 0,13 (N=375)	0,84 $\pm$ 0,17 (N=85)	0,78 $\pm$ 0,17 (N=6)	0,439 ^a
MKG _{ls} (g/cm ²)	0,88 $\pm$ 0,17 (N=68)	0,87 $\pm$ 0,16 (N=213)	0,85 $\pm$ 0,16 (N=140)	0,341 ^a	0,85 $\pm$ 0,16 (N=374)	0,87 $\pm$ 0,16 (N=86)	0,77 $\pm$ 0,12 (N=6)	0,213 ^a
RANKL (pmol/L)	0,38 $\pm$ 0,41 (N=28)	0,45 $\pm$ 0,65 (N=77)	0,27 $\pm$ 0,29 (N=44)	0,151 ^a	0,33 $\pm$ 0,44 (N=124)	0,47 $\pm$ 0,69 (N=35)	0,54 $\pm$ 0,82 (N=3)	0,601 ^a
pOC(μg/L)	19,3 $\pm$ 10,34 (N=31)	21,1 $\pm$ 11,31 (N=92)	23,9 $\pm$ 13,19 (N=52)	0,157 ^a	22,39 $\pm$ 11,80 (N=155)	21,8 $\pm$ 11,35 (N=37)	20,1 $\pm$ 9,35 (N=2)	0,964 ^a
sBALP(μg/L)	12,11 $\pm$ 3,59 (N=24)	12,98 $\pm$ 5,97 (N=72)	11,54 $\pm$ 5,25 (N=39)	0,280 ^a	11,95 $\pm$ 4,98 (N=125)	14,87 $\pm$ 5,72 (N=25)	12,3 $\pm$ 6,12 (N=2)	0,061 ^a
sOPG (pmol/L)	5,43 $\pm$ 1,75 (N=32)	5,41 $\pm$ 1,84 (N=92)	5,82 $\pm$ 1,73 (N=59)	0,353	5,60 $\pm$ 1,79 (N=157)	5,86 $\pm$ 1,83 (N=43)	5,41 $\pm$ 0,46 (N=3)	0,669
CTX (pmol/L)	3747 $\pm$ 2163 (N=27)	4158 $\pm$ 1932 (N=72)	3851 $\pm$ 1984 (N=47)	0,567	4100 $\pm$ 2079 (N=123)	3862 $\pm$ 1793 (N=34)	1910 $\pm$ 818 (N=2)	0,277
katepsinK (pmol/L)	1,90 $\pm$ 1,71 (N=12)	3,23 $\pm$ 4,18 (N=31)	3,52,8 $\pm$ 4,62 (N=7)	0,844 ^a	3,28 $\pm$ 4,34 (N=40)	3,96 $\pm$ 3,96 (N=11)	N=0	0,854 ^a

ANOVA-brez oznake, Kruskal-Wallis -z oznako^a

V skupini pomenopavznih preiskovank nismo dokazali statistično značilnih razlik v MKG in biokemičnih kazalcih kostne premene med povprečnimi vrednostmi pri posameznih genotipih polimorfizmov -407G>A ter -753A>T. Srednja vrednost (sBALP) kostne alkalne fosfataze preiskovank z genotipom AT (14,87 $\pm$ 5,72 μg/L) je višja od srednje vrednosti

sBALP preiskovank z genotipom AA ($11,95 \pm 4,98 \mu\text{g/L}$), vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,061$).

Rezultat statistične analize v skupini zdravih pomenopavznih preiskovank kaže na to, da omenjena polimorfizma značilno ne vplivata na MKG in biokemične kazalce kostne premene (sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K).

4.3.4. Zdrave pomenopavzne preiskovanke

V raziskavo smo vključili 235 zdravih pomenopavznih preiskovank, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}) in predela ledvene hrbtenice (MKG_{ls}) ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (sRANKL), osteokalcin (pOC), osteoprotegerin (sOPG), C-terminalni telopeptid kolagena tip I (CTX), kostno alkalno fosfatazo (sBALP) in katepsin K. Vsem preiskovankam znotraj posamezne skupine niso bili izmerjeni vsi parametri, kar je izraženo v različnem številu (N).

V Preglednici XXVI so za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A podane srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, (ITM) indeksa telesne mase v skupini zdravih pomenopavznih preiskovank in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave (p) med genotipskimi podskupinami za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A.

Preglednica XXVI: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katapsin K ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število zdravih pomenopavznih preiskovank

BIOKEMIČNI KAZALCI	-407G>A				-753A>T			
	GG	GA	AA	p	AA	AT	TT	p
starost	56,60 $\pm$ 5,77 (N=35)	62,06 $\pm$ 8,64 (N=121)	62,45 $\pm$ 8,13 (N=64)	0,002 ^a	61,89 $\pm$ 8,50 (N=177)	60,67 $\pm$ 8,01 (N=52)	61,00 $\pm$ 1,41 (N=2)	0,739 ^a
ITM (kg/m ²)	28,54 $\pm$ 5,77 (N=35)	28,07 $\pm$ 4,79 (N=121)	29,03 $\pm$ 5,38 (N=64)	0,481	28,31 $\pm$ 5,09 (N=177)	28,61 $\pm$ 4,67 (N=52)	28,01 $\pm$ 12,21 (N=2)	0,721 ^a
MKG _{fn} (g/cm ²)	0,80 $\pm$ 0,11 (N=33)	0,76 $\pm$ 0,12 (N=93)	0,76 $\pm$ 0,11 (N=64)	0,077 ^a	0,11 $\pm$ 0,008 (N=177)	0,14 $\pm$ 0,02 (N=52)	0,79 $\pm$ 0,19 (N=4)	0,406
MKG _{tot} (g/cm ²)	0,93 $\pm$ 0,13 (N=35)	0,91 $\pm$ 0,15 (N=120)	0,91 $\pm$ 0,11 (N=64)	0,627 ^a	0,91 $\pm$ 0,12 (N=177)	0,91 $\pm$ 0,17 (N=51)	0,95 $\pm$ 0,21 (N=2)	0,707 ^a
MKG _{ls} (g/cm ²)	1,01 $\pm$ 0,16 (N=33)	0,96 $\pm$ 0,14 (N=121)	0,98 $\pm$ 0,12 (N=63)	0,264 ^a	0,97 $\pm$ 0,13 (N=176)	0,96 $\pm$ 0,14 (N=52)	0,90 $\pm$ 0, 15 (N=2)	0,407 ^a
RANKL (pmol/L)	0,42 $\pm$ 0,42 (N=19)	0,42 $\pm$ 0,56 (N=57)	0,27 $\pm$ 0,23 (N=23)	0,200 ^a	0,49 $\pm$ 0,59 (N=71)	0,43 $\pm$ 0,45 (N=28)	0,07 $\pm$ 0,98 (N=2)	0,164 ^a
pOC (μg/L)	14,48 $\pm$ 5,09 (N=15)	14,72 $\pm$ 5,37 (N=41)	16,62 $\pm$ 5,67 (N=15)	0,437	15,10 $\pm$ 5,31 (N=52)	15,04 $\pm$ 5,62 (N=19)	(N=0)	0,966
sBALP(μg/L)	11,50 $\pm$ 3,94 (N=10)	11,25 $\pm$ 3,48 (N=26)	14,16 $\pm$ 6,12 (N=5)	0,329	11,69 $\pm$ 3,79 (N=32)	12,44 $\pm$ 4,78 (N=9)	(N=0)	0,625
sOPG (pmol/L)	4,96 $\pm$ 1,37 (N=19)	5,02 $\pm$ 1,65 (N=57)	5,51 $\pm$ 1,54 (N=23)	0,405	4,99 $\pm$ 1,43 (N=71)	5,58 $\pm$ 1,93 (N=28)	5,23 0,48 (N=2)	0,251
CTX (pmol/L)	3743 $\pm$ 1959 (N=19)	4016 $\pm$ 1791 (N=53)	3670 $\pm$ 1999 (N=23)	0,718	4004 $\pm$ 1856 (N=70)	3636 $\pm$ 1785 (N=25)	1910 1840 (N=2)	0,221
katapsin K (pmol/L)	2,18 $\pm$ 1,74 (N=10)	3,56 $\pm$ 4,46 (N=26)	6,56 $\pm$ 5,93 (N=3)	0,610 ^a	3,93 $\pm$ 4,79 (N=30)	3,23 $\pm$ 4,29 (N=9)	(N=0)	0,605 ^a

ANOVA-brez oznake, Kruskal-Wallis -z oznako^a

V skupini zdravih pomenopavznih preiskovank nismo dokazali statistično značilnih razlik v MKG in biokemičnih kazalcih kostne premene med povprečnimi vrednostmi pri posameznih genotipih polimorfizmov -407G>A ter -753A>T. Rezultat statistične analize v skupini zdravih pomenopavznih preiskovank kaže na to, da omenjena polimorfizma

značilno ne vplivata na MKG in biokemične kazalce kostne premene (sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K).

4.3.5. Pomenopavzne preiskovanke z osteoporozo

V raziskavo smo vključili 245 pomenopavznih preiskovank z osteoporozo, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}) in predela ledvene hrbtenice (MKG_{ls}) ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (sRANKL), osteokalcin (pOC), osteoprotegerin (sOPG), C-terminalni telopeptid kolagena tip I (CTX), kostno alkalno fosfatazo (sBALP) in katepsin K. Vsem preiskovankam znotraj posamezne skupine niso bili izmerjeni vsi parametri, kar je izraženo v različnem številu (N).

V Preglednici XXVII so za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A podane srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, (ITM) indeksa telesne mase v skupini pomenopavznih preiskovank z osteoporozo in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave (p) med genotipskimi podskupinami za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A.

Preglednica XXVII: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM, MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z osteoporozo z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število pomenopavznih preiskovank z osteoporozo

BIOKEMIČNI	-407G>A				-753A>T			
KAZALCI	GG	GA	AA	p	AA	AT	TT	p
starost	64,84 $\pm$ 8,70 (N=32)	65,59 $\pm$ 8,62 (N=92)	62,87 $\pm$ 7,70 (N=76)	0,105	64,36 $\pm$ 8,31 (N=195)	65,45 $\pm$ 8,07 (N=33)	63,50 $\pm$ 6,61 (N=4)	0,758
ITM (kg/m ²)	27,08 $\pm$ 7,05 (N=33)	26,39 $\pm$ 3,79 (N=93)	25,81 $\pm$ 3,59 (N=76)	0,293 ^a	26,12 $\pm$ 3,83 (N=198)	26,81 $\pm$ 4,01 (N=34)	24,69 $\pm$ 1,84 (N=4)	0,386 ^a
MKGfn(g/cm ²)	0,63 $\pm$ 0,07 (N=33)	0,61 $\pm$ 0,08 (N=93)	0,64 $\pm$ 0,09 (N=77)	0,056	0,62 $\pm$ 0,08 (N=199)	0,59 $\pm$ 0,09 (N=34)	0,60 $\pm$ 0,03 (N=4)	0,158
MKGtot(g/cm ²)	0,74 $\pm$ 0,09 (N=33)	0,74 $\pm$ 0,09 (N=92)	0,76 $\pm$ 0,10 (N=77)	0,657	0,75 $\pm$ 0,09 (N=198)	0,73 $\pm$ 0,11 (N=34)	0,70 $\pm$ 0,07 (N=4)	0,223
MKGls(g/cm ²)	0,76 $\pm$ 0,07 (N=33)	0,74 $\pm$ 0,09 (N=92)	0,74 $\pm$ 0,08 (N=77)	0,556	0,74 $\pm$ 0,09 (N=198)	0,72 $\pm$ 0,07 (N=34)	0,70 $\pm$ 0,01 (N=4)	0,434
RANKL (pmol/L)	0,30 $\pm$ 0,39 (N=9)	0,53 $\pm$ 0,86 (N=20)	0,27 $\pm$ 0,35 (N=21)	0,653 ^a	0,28 $\pm$ 0,35 (N=53)	0,66 $\pm$ 1,33 (N=7)	1,49 (N=1)	0,249 ^a
pOC (μg/L)	23,76 $\pm$ 12,05 (N=16)	26,25 $\pm$ 12,22 (N=51)	26,85 $\pm$ 14,24 (N=37)	0,723	26,07 $\pm$ 12,47 (N=103)	28,9 $\pm$ 11,62 (N=18)	20,10 $\pm$ 9,47 (N=2)	0,514
sBALP (μg/L)	14,55 $\pm$ 3,40 (N=14)	13,95 $\pm$ 6,85 (N=46)	11,15 $\pm$ 5,10 (N=34)	0,112	12,04 $\pm$ 5,35 (N=93)	16,25 $\pm$ 5,89 (N=16)	12,26 $\pm$ 6,12 (N=2)	0,020^a
sOPG (pmol/L)	6,11, $\pm$ 2,06 (N=13)	6,04 $\pm$ 1,97 (N=35)	6,02 $\pm$ 1,84 (N=36)	0,991	6,10 $\pm$ 1,91 (N=86)	6,40 $\pm$ 1,56 (N=15)	5,77 (N=1)	0,833
CTX (pmol/L)	3757 $\pm$ 2742 (N=8)	4555 $\pm$ 2287 (N=19)	4024 $\pm$ 1997 (N=24)	0,627	4227 $\pm$ 2354 (N=53)	4490 $\pm$ 1762 (N=9)	(N=0)	0,750
katepsinK (pmol/L)	0,50 $\pm$ 0,56 (N=2)	1,50 $\pm$ 1,50 (N=5)	1,25 $\pm$ 1,79 (N=4)	0,747	1,34 $\pm$ 1,45 (N=10)	1,95 $\pm$ 2,61 (N=2)	(N=0)	0,635

ANOVA-brez oznake, Kruskal-Wallis -z oznako^a

Med skupinami osteoporoznih pomenopavznih preiskovank nismo dokazali statistično značilnih razlik med MKG in genotipih obeh polimorfizmov. Prav tako nismo dokazali statistično značilne razlike med vrednostmi biokemičnih kazalcev in genotipih polimorfizma -407G>A. Povprečna vrednost (MKGfn) vratu stegenice je pri

osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah z genotipom AA ($0,864 \pm 0,09 \text{ g/cm}^2$) višja kot pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah z genotipom GA ($0,61 \pm 0,08 \text{ g/cm}^2$), vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,056$).

Pri polimorfizmu -753A>T smo dokazali statistično značilno razliko med genotipom AA in AT ($p=0,020$) za vrednost serumske kostne alkalne fosfataze (sBALP). Strednja vrednost sBALP preiskovank z genotipom AT ($16,25 \pm 5,89 \text{ } \mu\text{g/L}$) je značilno višja od srednje vrednosti sBALP preiskovank z genotipom AA ($12,04 \pm 5,35 \text{ } \mu\text{g/L}$), kar kaže na vpliv polimorfizma -753A>T na koncentracijo sBALP pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah. Kostna alkalna fosfataza sBALP je pokazatelj kostne tvorbe.

Rezultat statistične analize v skupini osteoporoznih pomenopavznih preiskovank kaže na to, da polimorfizem -407G>A, značilno ne vplivata na MKG in biokemične kazalce kostne premene (sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, CTX, katepsin K).

4.3.6. Pomenopavzne preiskovanke zdravljene z raloksifenom

V raziskavo smo vključili 56 pomenopavznih preiskovank zdravljenih z raloksifenom, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}) in predela ledvene hrbtenice (MKG_{ls}) ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (sRANKL), osteokalcin (pOC), osteoprotegerin (sOPG) in kostno alkalno fosfatazo (sBALP). Vsem preiskovankam znotraj posamezne skupine niso bili izmerjeni vsi parametri, kar je izraženo v različnem številu (N).

V Preglednici XXVIII so za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A podane srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, indeksa telesne mase (ITM) v skupini pomenopavznih preiskovank zdravljenih z raloksifenom in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave (p) med genotipskimi podskupinami za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A.

Preglednica XXVIII: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM, MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sBALP, sOPG, ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z osteoporozo z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število pomenopavznih preiskovank zdravljenih z raloksifenom

BIOKEMIČNI KAZALCI	-407G>A				-753A>T			
	GG	GA	AA	p	AA	AT	TT	p
starost	60,2 $\pm$ 5,5 (N=5)	61,0 $\pm$ 1,5 (N=17)	60,9 $\pm$ 5,4 (N=19)	0,960	60,5 $\pm$ 5,9 (N=39)	60,4 $\pm$ 4,2 (N=9)		0,085 ^t
ITM (kg/m ²)	25,6 $\pm$ 4,5 (N=6)	25,9 $\pm$ 2,7 (N=18)	25,6 $\pm$ 3,1 (N=20)	0,868	25,4 2,9 (N=43)	26,4 3,9 (N=19)		0,124 ^t
MKG _{fn} (g/cm ²)	0,62 $\pm$ 0,08 (N=6)	0,62 $\pm$ 0,57 (N=18)	0,64 $\pm$ 0,10 (N=20)	0,773	0,63 $\pm$ 0,08 (N=43)	0,62 $\pm$ 0,06 (N=10)		0,312 ^t
MKG _{tot} (g/cm ²)	0,67 $\pm$ 0,04 (N=6)	0,73 $\pm$ 0,82 (N=18)	0,73 $\pm$ 0,12 (N=20)	0,464	0,73 $\pm$ 0,10 (N=43)	0,70 $\pm$ 0,81 (N=10)		0,407 ^t
MKG _{ls} (g/cm ²)	0,73 $\pm$ 0,07 (N=6)	0,77 $\pm$ 0,09 (N=18)	0,75 $\pm$ 0,06 (N=20)	0,518	0,77 $\pm$ 0,07 (N=43)	0,72 $\pm$ 0,06 (N=10)		0,963 ^t
RANKL (pmol/L)	0,45 $\pm$ 0,22 (N=6)	0,46 $\pm$ 0,16 (N=18)	0,57 $\pm$ 0,19 (N=20)	0,183	0,53 $\pm$ 0,2 (N=43)	0,51 $\pm$ 0,14 (N=10)		0,104 ^t
pOC(μg/L)	29,1 $\pm$ 13,4 (N=6)	33,1 $\pm$ 12,3 (N=18)	35,5 $\pm$ 12,3 (N=20)	0,531	33,8 $\pm$ 12,2 (N=43)	32,6 $\pm$ 9,8 (N=10)		0,250 ^t
sBALP(μg/L)	11,3 $\pm$ 1,8 (N=5)	13,9 $\pm$ 6,7 (N=18)	11,2 $\pm$ 5,0 (N=19)	0,337	11,30 $\pm$ 4,0 (N=41)	18,4 $\pm$ 6,5 (N=9)		0,064 ^t
sOPG(pmol/L)	5,4 $\pm$ 3,3 (N=4)	6,6 $\pm$ 2,0 (N=15)	6,4 $\pm$ 2,0 (N=15)	0,643	6,1 $\pm$ 2,0 (N=33)	6,6 $\pm$ 1,8 (N=8)		0,721 ^t

ANOVA - brez oznake, T-test- z oznako^t

V skupini pomenopavznih preiskovank zdravljenih z raloksifenom nismo dokazali statistično značilnih razlik v MKG in biokemičnih kazalcih kostne premene med povprečnimi vrednostmi pri posameznih genotipih polimorfizmov -407G>A ter -753A>T. Rezultat statistične analize v skupini pomenopavznih preiskovank zdravljenih z raloksifenom kaže na to, da omenjena polimorfizma značilno ne vplivata na MKG in biokemičnine kazalce kostne premene (sRANKL, pOC, sBALP, sOPG).

4.3.7. Pomenopavzne preiskovanke zdravljene z alendronatom

V raziskavo smo vključili 52 pomenopavznih preiskovank zdravljenih z Alendronatom, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}) ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene za osteokalcin (pOC), deoksipiridinolin (DPYR) in kostno alkalno fosfatazo (sBALP). Vsem preiskovankam znotraj posamezne skupine niso bili izmerjeni vsi parametri, kar je izraženo v različnem številu (N).

V Preglednici XXIX so za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A podane srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, indeksa telesne mase (ITM) v skupini pomenopavznih preiskovank zdravljenih z alendronatom in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave (p) med genotipskimi podskupinami za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A.

Preglednica XXIX: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM, MKG vratu stegenice, kolka, pOC, sBALP, Dpyr, ter statistične obdelave (p) v skupini pomenopavznih preiskovank z osteoporozo z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število pomenopavznih preiskovank zdravljenih z alendronatom

BIOKEMIČNI KAZALCI	-407G>A				-753A>T			
	GG	GA	AA	p	AA	AT	TT	p
starost	64,6 $\pm$ 8,3 (N=7)	64,5 $\pm$ 6,4 (N=24)	65,9 $\pm$ 6,6 (N=11)	0,851	65,6 $\pm$ 6,5 (N=43)	61,2 $\pm$ 5,2 (N=5)	69,0 $\pm$ 2,8 (N=2)	0,252
ITM (kg/m ²)	29,61 $\pm$ 4,0 (N=7)	26,2 $\pm$ 3,9 (N=24)	25,1 $\pm$ 2,2 (N=11)	0,082	26,6 $\pm$ 3,4 (N=43)	25,7 $\pm$ 6,6 (N=5)	25,9 $\pm$ 1,4 (N=2)	0,881
MKG _{fn} (g/cm ²)	0,65 $\pm$ 0,06 (N=7)	0,60 $\pm$ 0,09 (N=24)	0,65 $\pm$ 0,10 (N=11)	0,174	0,61 $\pm$ 0,09 (N=43)	0,66 $\pm$ 0,06 (N=5)	0,59 $\pm$ 0,05 (N=2)	0,429
MKG _{tot} (g/cm ²)	0,73 $\pm$ 0,09 (N=7)	0,73 $\pm$ 0,12 (N=24)	0,76 $\pm$ 0,10 (N=11)	0,725	0,73 $\pm$ 0,10 (N=43)	0,78 $\pm$ 0,13 (N=5)	0,66 $\pm$ 0,09 (N=2)	0,399
pOC(pmol/L)	13,2 $\pm$ 3,7 (N=7)	13,1 $\pm$ 6,3 (N=24)	11,2 $\pm$ 6,1 (N=11)	0,058	23,4 $\pm$ 8,5 (N=43)	29,8 $\pm$ 11,4 (N=5)	20,1 $\pm$ 9,5 (N=2)	0,256
sBALP(μ g/L)	24,8 $\pm$ 9,0 (N=7)	26,1 $\pm$ 9,6 (N=24)	18,2 $\pm$ 6,5 (N=11)	0,648	12,6 $\pm$ 5,7 (N=43)	11,9 $\pm$ 3,8 (N=5)	12,3 $\pm$ 6,1 (N=11)	0,960
Dpyr(%)	7,3 $\pm$ 1,4 (N=7)	8,1 $\pm$ 4,5 (N=21)	6,7 $\pm$ 2,9 (N=11)	0,751 ^a	7,6 $\pm$ 3,8 (N=39)	8,0 $\pm$ 2,8 (N=5)	7,0 $\pm$ 1,5 (N=2)	0,847 ^a

ANOVA-brez oznake, Kruskal-Wallis -z oznako^a

V skupini pomenopavznih preiskovank zdravljenih z Alendronatom nismo dokazali statistično značilnih razlik v MKG in biokemičnih kazalcih kostne premene med

povprečnimi vrednostmi pri posameznih genotipih polimorfizmov -407G>A ter -753A>T. Opazili smo mejno značilno razliko v koncentracijah (pOC) osteokalcina, ki so pri preiskovankah z genotipom AA nižje kot pri tistih z genotipom GG in GA, vendar razlika ni statistično značilna ($p=0,058$).

Rezultat statistične analize v skupini zdravih pomenopavznih preiskovank kaže na to, da omenjena polimorfizma značilno ne vplivata na MKG in biokemične kazalce kostne premene (pOC, sBALP in DPYR).

4.3.8. Preiskovanci z zlomi

V raziskavo smo vključili 145 preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}) in predela ledvene hrbtenice (MKG_{ls}) ter vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene za ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (sRANKL), osteokalcin (pOC), osteoprotegerin (sOPG), C-terminalni telopeptid kolagena tip I (CTX), kostno alkalno fosfatazo (sBALP) in katepsin K. Vsem preiskovankam znotraj posamezne skupine niso bili izmerjeni vsi parametri, kar je izraženo v različnem številu (N).

V Preglednici XXX so za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A podane srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, indeksa telesne mase (ITM) v skupini preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave (p) med genotipskimi podskupinami za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A.

Preglednica XXX: Srednje vrednosti (povprečne vrednosti $\pm$ SD) starosti, ITM, MKG vratu stegenice, kolka, predela ledvene hrptenice, sRANKL, pOC, sOPG, CTX, katepsin K ter statistične obdelave (p) v skupini preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo z različnimi genotipi za polimorfizem -753A>T in za polimorfizem -407G>A. N je število preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo

BIOKEMIČNI KAZALCI	-407G>A				-753A>T			
	GG	GA	AA	p	AA	AT	TT	p
starost	70,46 $\pm$ 10,66 (N=13)	68,60 $\pm$ 13,61 (N=30)	73,37 $\pm$ 11,48 (N=70)	0,200 ^a	71,51 $\pm$ 11,34 (N=77)	70,7 $\pm$ 13,56 (N=37)	78,86 $\pm$ 9,13 (N=7)	0,231 ^a
ITM (kg/m ²)	27,69 $\pm$ 5,99 (N=13)	25,90 $\pm$ 3,13 (N=30)	27,02 $\pm$ 3,82 (N=66)	0,304	26,82 $\pm$ 3,65 (N=75)	27,11 $\pm$ 5,10 (N=36)	26,16 $\pm$ 3,42 (N=6)	0,858
MKG _{fn} (g/cm ²)	0,73 $\pm$ 0,17 (N=10)	0,69 $\pm$ 0,16 (N=28)	0,67 $\pm$ 0,15 (N=61)	0,577	0,70 $\pm$ 0,14 (N=70)	0,65 $\pm$ 0,18 (N=32)	0,65 $\pm$ 0,17 (N=5)	0,224
MKG _{tot} (g/cm ²)	0,82 $\pm$ 0,19 (N=10)	0,81 $\pm$ 0,19 (N=28)	0,77 $\pm$ 0,19 (N=61)	0,622	0,82 $\pm$ 0,17 (N=70)	0,75 $\pm$ 0,21 (N=32)	0,72 $\pm$ 0,18 (N=2)	0,106
MKG _{ls} (g/cm ²)	0,98 $\pm$ 0,20 (N=13)	0,87 $\pm$ 0,22 (N=29)	0,91 $\pm$ 0,18 (N=65)	0,235	0,92 $\pm$ 0,17 (N=73)	0,89 $\pm$ 0,23 (N=36)	0,86 $\pm$ 0, 23 (N=6)	0,680
RANKL (pmol/L)	0,05 $\pm$ 0,07 (N=9)	0,05 $\pm$ 0,11 (N=19)	0,01 $\pm$ 0,01 (N=9)	0,290 ^a	0,05 $\pm$ 0,59 (N=28)	0,04 $\pm$ 0,07 (N=14)	0,12 (N=1)	0,220 ^a
pOC(μg/L)	9,67 $\pm$ 6,58 (N=10)	8,28 $\pm$ 7,41 (N=24)	5,65 $\pm$ 5,14 (N=38)	0,148 ^a	7,25 $\pm$ 6,73 (N=44)	7,97 $\pm$ 6,78 (N=30)	8,40 $\pm$ 3,84 (N=4)	0,695 ^a
sOPG(pmol/L)	5,31 $\pm$ 2,32 (N=9)	4,56 $\pm$ 1,13 (N=19)	4,24 $\pm$ 1,67 (N=9)	0,355	4,80 $\pm$ 1,42 (N=28)	4,79 $\pm$ 2,05 (N=14)	3,73 (N=1)	0,816
CTX(pmol/L)	4778 $\pm$ 2310 (N=11)	4109 $\pm$ 2316 (N=24)	5170 $\pm$ 2826 (N=39)	0,346 ^a	4491 $\pm$ 2684 (N=44)	5067 $\pm$ 2715 (N=31)	6205 $\pm$ 2188 (N=5)	0,326
katepsin K (pmol/L)	45,98 $\pm$ 102,78 (N=9)	30,30 $\pm$ 51,25 (N=19)	12,02 $\pm$ 7,60 (N=9)	0,590 ^a	22,11 $\pm$ 41,70 (N=28)	33,6 $\pm$ 82,54 (N=14)	77,30 (N=1)	0,275 ^a

ANOVA-brez oznake, Kruskal-Wallis -z oznako^a

V skupini preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo nismo dokazali statistično značilnih razlik v MKG in biokemičnih kazalcih kostne premene med povprečnimi vrednostmi pri posameznih genotipih polimorfizmov -407G>A ter -753A>T. Rezultat statistične analize v skupini preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo kaže na to, da omenjena polimorfizma značilno ne vplivata na MKG in biokemičnine kazalce kostne premene (sRANKL, pOC, sOPG, CTX in katepsin K).

5. SKLEP

Namen naše raziskave je bil določiti pogostost polimorfizma -407G>A in -753A>T v promotorski regiji gena RIPK3 in ocenili njegov klinični pomen oz. genetski dejavnik tveganja pri razvoju osteoporoze s povezavo z mineralno kostno gostoto in koncentracijami biokemičnih kazalcev kostne premene v slovenski populaciji.

V diplomsko nalogo smo vključili 855 preiskovancev (117 moških in 738 žensk), z rezultati izmerjenih vrednosti MKG in vrednostmi koncentracij biokemičnih kazalcev kostne premene. Z metodo alelne diskriminacije v realnem času smo genotipizirali DNA vzorce, določili pogostnost polimorfizma, nato pa ocenili njihov klinični pomen.

Pokazali smo povezanost polimorfizma -753A>T v promotorski regiji gena RIPK3 z MKG in koncentracijami biokemičnih kazalcev kostne premene v skupinah:

- z MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), ki je višja pri genotipu AT v skupini premenopavznih preiskovank ($p=0,038$)
- z MKG kolka (MKG_{tot}), ki je višja pri genotipu AT v skupini premenopavznih preiskovank ($p=0,020$)
- z serumsko koncentracijo kostno alkalne fosfataze (sBALP), ki je višja pri genotipu AA v skupini premenopavznih preiskovank ($p=0,031$)
- z serumsko koncentracijo kostno alkalne fosfataze (sBALP), ki je višja pri genotipu AT v skupini premenopavznih preiskovankah z osteoporozo ($p=0,020$)

Pokazali smo mejno značilno razliko za vrednosti MKG in koncentracijah biokemičnih kazalcev kostne premene v skupinah polimorfizma -407 G>A v promotorski regiji gena RIPK3 v skupinah:

- z MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), ki je višja pri genotipu AA v skupini premenopavznih preiskovank ($p=0,052$)
- z plazemsko koncentracijo osteokalcina (pOC), ki je višja pri genotipu AA v skupini premenopavznih preiskovank ($p=0,056$)
- z serumsko koncentracijo kostne alkalne fosfataze (sBALP), ki je višja pri genotipu TA v skupini premenopavznih preiskovank ($p=0,061$)

- z MKG vratu stegenice (MKG_{fn}), ki je višja pri genotipu AA v skupini osteoporoznih pomenopavznih preiskovank ($p=0,056$)
- z plazemsko koncentracijo osteokalcina (pOC), ki je višja pri genotipu GG v skupini pomenopavznih preiskovank zdravljenih z Alendronatom ($p=0,058$)

Zanimivi so dobljeni rezultati v skupini premenopavznih preiskovank, ki so morda lahko povod za nadaljne raziskave za klinični pomen polimorfizma -753A>T v promotorski regiji gena RIPK3 pri osteoporozi. Prisotnost alela T pri vrednosti MKG vratu stegenice in MKG kolka, je bila povezana v MKG. Višje vrednosti koncentracije sBALP premenopavznih preiskovank z genotipom AA, bi lahko razložili kot posledico izrazitejše kostne remodelacije, kar lahko potrjujejo nižje vrednosti MKG vratu stegenice in MKG kolka pri premenopavznih preiskovankah z genotipom AA.

V skupini moških preiskovancev, skupini zdravih pomenopavznih preiskovank in skupini preiskovank z osteoporozo zdravljenih z raloksifenom ter alendronatom ter skupini preiskovancev z osteoporoznimi zlomi in osteoartrozo nismo dokazali povezanosti polimorfizma -753A>T v promotorski regiji gena RIPK3 z MKG in koncentracijami biokemičnih kazalcev kostne premene.

V celotni skupini preiskovancev nismo dokazali povezanosti polimorfizma -407G>A v promotorski regiji gena RIPK3 z MKG in koncentracijami biokemičnih kazalcev kostne premene.

Raziskave za klinični pomen polimorfizmov -753A>T in -407G>A v promotorski regiji gena RIPK3 pri osteoporozi bi bilo smiselno ponoviti na večjem številu preiskovancev, hkrati pa bolje raziskati mehanizem vpliva polimorfizma na mineralno kostno gostoto in spremembo v koncentraciji kazalcev kostne premene.

LITERATURA

1. Cvetka E, Cor A. Skelet. V: Štiblar Martinčič D et al., Anatomija, histologija in fiziologija, prva izdaja, Lj. 2007, Medicinska fakulteta Univerza v Ljubljani, 29-38
2. Kocjančič A. Motnje presnove kalcija in kostne bolezni V: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D, Interna medicina, 3. izdaja, Littera picta, Ljubljana 2005: 898-925
3. Hadjidakis D J, Androulakis I I: Bone Remodeling. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1092: 385-392,
4. Bitenc Logar D: Proučevanje tkivnih in serumskih kazalcev kostne resorpcije pri bolnikih z osteoporozo in osteoartrozo, 2008, Doktorska disertacija. p 116
5. Francis R M: The pathogenesis of osteoporosis. V: Francis R M et al., Osteoporosis pathogenesis & management, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1999: 51-80
6. Žorž G : Prevalenca osteoporoze v Sloveniji, ISIS 2006; XV(3): 34-37
7. Kociančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. Zdrav Vestn 2002; 71:571-73
8. Franić D: Novi vidiki diagnostike in zdravljenja osteoporoze. Zdrav Vestn 2009 ; 78:143-150
9. Ralston SH, Crombrughe B: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis, Genes Dev 2006; 20: 2492-2506
10. Ralston SH: Genetics of osteoporosis. Proceedings of the Nutrition Society 2007; 66, 158-165
11. Boyer R, Prenos bioloških informacij: celična komunikacija, V: Temelji biokemije 12-46, Študentska založba 2005, ISBN 961-242-041-6
12. Boyer R: Encimi: reakcije, kinetika in inhibicija, V: Temelji biokemije 125-153 Študentska založba 2005, ISBN 961-242-041-6
13. Boyer R: Metabolizem ogljikovih hidratov. V: Temelji biokemije, 393-422, Študentska založba 2005, ISBN 961-242-041-6
14. Vozelj M. Celična migracija in vnetje. V: Temelji imunologije, 327-352, DZS
15. Vozelj M. Efektorski mehanizmi humoralnega in celično posredovanega imunskega odziva. V: Temelji imunologije, st. 3253-377, DZS

16. Mencelj Bedrač S, Marc J: Vloga sistema RANKL/RANK/OPG pri nastanku osteoporoze. *Farm Vestn.* 2008; 59: 175-178
17. Declercq W, Berghe TV, Vandenabeele P: Rip Kinases at the Crossroads of Cell Death and Survival. *Cell* 2009; 138:229-232
18. Goyenechea E, Crujeiras AB, Abete I, Martinez JA: Expression of Two Inflammation-Related genes (RIPK3 and RNF216) in Mononuclear Cells is Associated with Weight-Loss Regain in Obese Subjects, *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2009; 2:78-84
19. Kasof GM, Prosser JC, Liu D, et al :The RIP-like kinase, RIP3, induces apoptosis and NF-kappaB nuclear translocation and localizes to mitochondria. *FEBS Lett.* 2000; 473:285–91
20. Marc J: Biokemični in genetični kazalci osteoporoze. *Farm Vestn* 2000; 51:352-5
21. Marc J, Janez Preželj, Komel R, Andreja Kocijančič: Polimorfizem gena za VDR in biokemični kazalci presnove kosti pri zdravljenju osteoporoze z bisfosfonati; 1. Slovenski kongres klinične kemije
22. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55:215-220
23. Gene Cards[®] Version 3, The Human Gene Compendium Free for academic non-profit institutions. License from Xennex
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RIPK3>
24. Ensembl. Dostopno na: Ensembl release 61 - Feb 2011
<http://www.ensembl.org/index.html>
25. NCBI. Gene, Genes and mapped phenotypes, updated on 10- Feb-2011
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11035>
26. Online Mendelian Inheritance in Man (MIM) cross-references in UniProtKB/Swiss-Prot <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y572>
27. TaqMan[®] SNP Genotyping Assays Protocol, AB Applied Biosystems, Part Number 4332856, RevC, 05/2006
28. Search for SNP on NCBI Reference Assembly
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1007381
29. Search for SNP on NCBI Reference Assembly
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3212245
30. James R, Cerhan, Stephen M. Ansell, Zachary S. Fredericksen, Neil E. Kay,

- Liebow M, Timothy G. Call, Ahmet Dogan, Julie M. Cunningham, Alice H. Wang, Wen Liu-Mares W, Macon WR, Jelinek D, Thomas E. Witzig TM, Habermann TM, Slager S I: Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2007; 110: 4455-4463
31. Feng S, Ma L, Yang Y, Wu M: Truncated RIP3 (tRIP3) acts upstream of FADD to induce apoptosis in the human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. *Biochem Biophys Res Comm* 2006; 347:558-565
32. Trošt Z, Trebše R, Preželj J, Komadina R, Bitenc Logar D, Marc J: A microarray based identification of osteoporosis-related genes in primary culture of human osteoblasts. *Bone* 2009; 46:72-80

7.PRILOGE

Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
666	1Y	AA	AA
667	2Y	AA	GA
668	3Y	AA	GA
669	4Y	AA	AA
670	5Y	AA	GA
671	6Y	AA	GA
672	7Y	TA	/
673	8Y	AA	GA
674	9Y	AA	AA
675	10Y	AA	AA
676	11Y	AA	GA
677	12Y	AA	GA
678	13Y	AA	GA
679	14Y	AA	GA
680	15Y	AA	GA
681	16Y	AA	AA
682	17Y	TA	GA
683	18Y	TA	/
684	19Y	TA	GA
685	20Y	AA	AA
686	21Y	AA	AA
687	22Y	TA	GA
688	23Y	TA	GA
689	24Y	AA	AA
690	25Y	AA	AA
691	26Y	AA	AA
692	27Y	AA	GA
693	28Y	AA	/
694	29Y	TA	GA
695	30Y	AA	AA
696	31Y	AA	GA
697	32Y	AA	GA
698	33Y	AA	GG
699	34Y	AA	GA
700	35Y	AA	AA
701	36Y	AA	GA
702	37Y	AA	GA
703	38Y	AA	GG
704	39Y	AA	GA
705	40Y	AA	GG
706	41Y	AA	AA

Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
707	42Y	AA	AA
708	43Y	AA	AA
709	44Y	TA	GG
710	45Y	AA	AA
711	46Y	AA	GA
712	47Y	AA	AA
713	48Y	AA	AA
714	49Y	AA	GA
715	50Y	AA	GA
716	51Y	TA	GA
717	52Y	AA	AA
718	53Y	AA	GA
719	54Y	AA	GA
720	55Y	AA	GA
721	56Y	AA	GA
722	57Y	AA	GA
723	58Y	AA	AA
724	59Y	AA	GG
725	60Y	TA	GA
726	61Y	AA	GA
727	62Y	TA	GA
728	63Y	AA	AA
729	64Y	AA	GA
730	65Y	AA	GA
731	66Y	AA	AA
732	67Y	AA	AA
733	68Y	AA	GA
734	69Y	AA	AA
735	70Y	AA	AA
736	71Y	TA	GA
737	72Y	AA	GA
738	73Y	TT	GA
739	74Y	AA	AA
740	75Y	AA	AA
741	76Y	AA	GA
742	77Y	AA	GA
743	78Y	AA	AA
744	79Y	AA	GA
745	80Y	AA	AA
746	81Y	AA	GA

747	82Y	AA	AA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
748	83Y	AA	GA
749	84Y	AA	GA
750	85Y	AA	GA
751	86Y	AA	GG
752	87Y	AA	GA
753	89Y	AA	AA
754	90Y	AA	GA
755	91Y	TA	GA
756	92Y	AA	GG
757	93Y	AA	/
758	94Y	AA	AA
759	95Y	AA	AA
760	96Y	AA	GA
761	97Y	AA	AA
762	98Y	AA	GA
763	99Y	AA	AA
764	100Y	TA	GA
765	101Y	AA	AA
766	102Y	AA	GA
767	103Y	AA	/
768	104Y	AA	/
769	105Y	AA	GA
770	106Y	AA	GA
771	107Y	AA	GA
772	108Y	TA	/
773	109Y	AA	AA
774	110Y	AA	/
775	111Y	AA	AA
776	112Y	/	/
777	113Y	TA	GA
778	114Y	TA	GA
779	189Y	AA	AA
780	190Y	TA	GA
781	191Y	AA	AA
782	192Y	AA	GA
783	193Y	AA	GA
784	194Y	/	/
785	195Y	AA	AA
786	196Y	AA	GA
787	197Y	AA	GA

788	198Y	TA	GG
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
789	199Y	AA	AA
790	200Y	AA	GG
791	201Y	AA	AA
792	202Y	AA	AA
793	203Y	TA	GG
794	204Y	/	GA
795	205Y	AA	GA
796	206Y	AA	/
797	207Y	AA	AA
798	208Y	AA	GA
799	209Y	TA	GG
800	210Y	AA	AA
801	211Y	AA	AA
802	212Y	AA	AA
803	213Y	AA	GA
804	214Y	AA	AA
805	215Y	AA	GG
806	216Y	TA	GG
807	217Y	AA	AA
808	219Y	TA	GA
809	220Y	AA	/
810	218Y	AA	GA
811	221Y	TA	GA
812	222Y	AA	/
813	223Y	AA	AA
814	224Y	AA	GA
815	225Y	AA	GA
816	226Y	AA	GA
817	227Y	AA	AA
818	228Y	AA	AA
819	229Y	AA	GA
820	230Y	AA	AA
821	231Y	AA	AA
822	232Y	AA	GA
823	233Y	AA	GA
824	234Y	AA	GG
825	168Y	AA	GA
826	169Y	TA	GA
827	170Y	AA	GA
913	115Y	AA	GA

914	116Y	AA	GA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
915	117Y	AA	AA
916	118Y	TA	GG
917	119Y	AA	GG
918	120Y	TA	/
919	121Y	TA	GA
920	122Y	TA	GA
921	123Y	AA	AA
922	124Y	AA	GG
923	125Y	AA	GA
924	126Y	TA	GG
925	127Y	TA	/
926	128Y	AA	GA
927	129Y	AA	GG
928	130Y	AA	GA
929	131Y	AA	GA
930	132Y	AA	GA
931	88Y	AA	GA
932	133Y	AA	AA
933	134Y	AA	AA
934	135Y	TA	GA
935	136Y	AA	AA
936	137Y	TA	GA
937	138Y	AA	AA
938	139Y	AA	GA
939	140Y	AA	GA
940	141Y	AA	/
941	142Y	AA	AA
942	143Y	AA	AA
943	144Y	AA	/
944	145Y	AA	AA
945	146Y	AA	AA
946	147Y	AA	/
947	148Y	TA	GG
948	149Y	AA	/
949	150Y	AA	GA
950	151Y	AA	GA
951	152Y	AA	GA
952	153Y	AA	GA
953	154Y	AA	AA
954	155Y	AA	GA

955	156Y	AA	GA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
956	157Y	AA	/
957	158Y	TA	/
958	159Y	AA	GA
959	160Y	AA	GA
960	161Y	AA	GA
961	162Y	AT	GA
962	163Y	AA	AA
963	164Y	AA	/
964	165Y	TA	/
965	166Y	AA	/
966	167Y	AA	AA
967	171Y	AA	/
968	172Y	AA	GG
969	173Y	AA	GG
970	174Y	AA	AA
971	175Y	AA	/
972	176Y	AA	/
973	177Y	AA	GG
974	178Y	AA	GA
975	179Y	AA	AA
976	180Y	AA	GA
977	181Y	AA	GA
978	182Y	AA	GA
979	183Y	AA	GA
980	184Y	AA	GA
981	185Y	TA	GA
982	186Y	AA	AA
983	187Y	AA	/
984	188Y	AA	GG
985	229Y	AA	AA
986	230Y	AA	AA
987	231Y	AA	AA
988	232Y	AA	GA
989	233Y	TA	GA
990	234Y	AA	AA
991	235Y	TA	GA
992	236Y	TA	GG
993	237Y	AA	AA
994	238Y	AA	GA
995	239Y	AA	GG

996	240Y	TA	GA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
997	241Y	AA	GA
998	242Y	AA	GG
999	243Y	AA	/
1000	244Y	TT	/
1001	245Y	AA	AA
1002	246Y	AA	GA
1003	247Y	TA	GG
1004	248Y	TA	/
1005	249Y	AA	GG
1006	250Y	AA	GA
1007	251Y	TT	GG
1008	252Y	AA	GG
1009	253Y	AA	GA
1010	254Y	AA	GA
1011	255Y	AA	/
1012	256Y	AA	GA
1013	257Y	TA	GA
1014	258Y	TT	GG
1015	259Y	AA	AA
1016	260Y	AA	AA
1017	261Y	AA	GA
1018	262Y	/	/
1019	263Y	AA	GG
1020	264Y	AA	AA
1021	265Y	AA	AA
1022	266Y	AA	GA
1023	267Y	/	/
1024	268y	/	/
1025	269y	AA	AA
1026	270Y	AA	AA
1027	271Y	AA	AA
1028	272Y	AA	GA
1029	273Y	AA	AA
1030	274Y	TA	GG
1031	275Y	AA	AA
1032	276Y	AA	AA
1033	277Y	TA	GG
1034	278Y	AA	AA
1035	279Y	AA	GG
1036	280Y	AA	GA

1037	281Y	AA	GA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
1038	282Y	AA	AA
1039	283Y	NTD	NTD
1040	284Y	AA	AA
1041	285Y	TA	GA
1042	286Y	TA	GA
1043	287Y	TA	AA
1044	288Y	TA	AA
1045	289Y	AA	GA
1046	290Y	AA	GA
1047	291Y	/	/
1048	292Y	/	/
1049	293Y	AA	GG
1050	294Y	AA	GG
1051	295Y	AA	AA
1052	296Y	AA	GA
1053	297Y	/	/
1054	298Y	AA	GA
1055	299Y	AA	GA
1056	300Y	AA	GG
1057	301Y	AA	AA
1058	302Y	AA	GA
1059	303Y	AA	GA
1060	304Y	AA	AA
1061	305Y	TA	GG
1062	306Y	AA	AA
1063	307Y	AA	AA
1064	308Y	TA	GA
1065	309Y	TA	GA
1066	310Y	AA	AA
1067	311Y	/	/
1068	312Y	TA	GA
1069	313Y	AA	GG
1070	314Y	TA	GG
1071	315Y	TA	GA
1072	316Y	TA	GA
1073	317Y	AA	GA
1074	318Y	AA	AA
1075	320Y	AA	GA
1076	321Y	/	/
1077	322Y	AA	GA

1078	323Y	AA	AA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
1079	324Y	AA	AA
1080	325Y	AA	GA
1081	326Y	AA	AA
1082	327Y	AA	AA
1083	328Y	AA	AA
1084	329Y	AA	AA
1085	330Y	AA	GA
1086	331Y	AA	GA
1087	332Y	AA	AA
1088	333Y	AA	GA
1089	334Y	AA	GA
1090	335Y	AA	GA
1091	336Y	AA	GA
1092	337Y	AA	GA
1093	338Y	/	/
1094	339Y	AA	GA
1095	340Y	AA	CT
1096	341Y	AA	AA
1097	342Y	AA	GG
1098	343Y	AA	AA
1099	344Y	AA	AA
1100	345Y	AA	AA
1101	346Y	AA	GG
1102	347Y	AA	GA
1103	348Y	AA	GA
1104	349Y	AA	AA
1105	350Y	AA	AA
1106	351Y	AA	GA
1107	352Y	TA	GG
1108	353Y	TA	GA
1109	354Y	AA	AA
1110	355Y	TA	AA
1111	356Y	AA	GA
1112	357Y	AA	GA
1113	358Y	AA	GA
1114	359Y	AA	GA
1115	360Y	AA	GG
1116	361Y	TA	GG
1117	362Y	AA	/
1118	363Y	AA	GA

1119	364Y	AA	GA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
1120	365Y	TA	GA
1121	366Y	AA	GA
1122	367Y	AA	GA
1123	368Y	AA	AA
1124	369Y	TA	GA
1125	370Y	TT	GG
1126	371Y	AA	AA
1127	372Y	AA	AA
1128	373Y	AA	AA
1129	374Y	AA	GA
1130	375Y	AA	GG
1131	376Y	AA	GA
1132	377Y	AA	GG
1133	378Y	AA	/GA
1134	379Y	AA	AA
1135	380Y	AA	GA
1136	381Y	AA	AA
1137	382Y	AA	GA
1138	383Y	AA	GA
1139	384Y	TT	GG
1140	385Y	AA	AA
1141	386Y	TA	GA
1142	387Y	AA	GG
1143	388Y	AA	GA
1144	389Y	AA	AA
1145	390Y	AA	GA
1146	391Y	AA	GA
1147	118	AA	AA
1148	319Y	AA	GG
1149	392Y	AA	GG
1150	393Y	AA	AA
100f	Fosamax	AA	GA
101f	Fosamax	AA	GA
102f	Fosamax	/	/
103f	Fosamax	AA	GA
106f	Fosamax	AA	GA
108f	Fosamax	AA	AA
109f	Fosamax	AA	/
110f	Fosamax	AA	/
111f	Fosamax	AA	GA

112f	Fosamax	AA	AA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
113f	Fosamax	AA	AA
114f	Fosamax	AA	AA
115f	Fosamax	AA	GG
117f	Fosamax	TA	GA
118f	Fosamax	TA	GG
119f	Fosamax	AA	GA
120f	Fosamax	AA	GA
121f	Fosamax	AA	GA
122f	Fosamax	TT	GG
123f	Fosamax	AA	GA
124f	Fosamax	AA	/
125f	Fosamax	AA	GA
126f	Fosamax	AA	/
129f	Fosamax	AA	AA
130f	Fosamax	AA	GA
131f	Fosamax	AA	GA
134f	Fosamax	AA	GA
135f	Fosamax	AA	GA
136f	Fosamax	AA	/
137f	Fosamax	AA	GA
138f	Fosamax	AA	GA
139f	Fosamax	AA	/
140f	Fosamax	AA	GA
141f	Fosamax	AA	GA
142f	Fosamax	AA	GA
146f	Fosamax	AA	AA
148f	Fosamax	AA	/
149f	Fosamax	AA	GA
155f	Fosamax	AA	GA
156f	Fosamax	AA	GA
158f	Fosamax	AA	AA
159f	Fosamax	TA	GA
160f	Fosamax	AA	GG
161f	Fosamax	AA	AA
163f	Fosamax	AA	AA
167f	Fosamax	AA	/
168f	Fosamax	TA	GA
169f	Fosamax	AA	GG
170f	Fosamax	AA	AA
171f	Fosamax	/	/

174f	Fosamax	/	/
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
175f	Fosamax	TA	GA
176f	Fosamax	AA	GG
93f	Fosamax	AA	GG
94f	Fosamax	AA	AA
95f	Fosamax	AA	AA
96f	Fosamax	TT	GG
97f	Fosamax	AA	/
98f	Fosamax	AA	AA
99f	Fosamax	AA	/
1	opg	AA	GA
2	opg	AA	GA
3	opg	AA	AA
4	opg	TA	/
5	opg	TA	GG
6	opg	AA	AA
7	opg	TA	GA
8	opg	AA	AA
9	opg	AA	GA
10	opg	AA	GG
11	opg	AA	/
12	opg	AA	GA
13	opg	AA	GA
14	opg	AA	GA
15	opg	AA	GA
16	opg	AA	GA
17	opg	TA	GG
18	opg	AA	AA
19	opg	AA	GA
20	opg	AA	GA
21	opg	TT	GA
22	opg	AA	GA
23	opg	/	/
24	opg	AA	GG
25	opg	AA	GA
26	opg	TA	GA
27	opg	TA	GA
28	opg	AA	GA
29	opg	AA	GG
30	opg	AA	AA
31	opg	AA	GG

32	opg	AA	AA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
33	opg	AA	GG
34	opg	AA	AA
35	opg	AA	AA
36	opg	AA	GA
37	opg	AA	GA
38	opg	AA	GA
39	opg	TT	GG
40	opg	TA	/
41	opg	AA	AA
42	opg	AA	GA
43	opg	TA	GA
44	opg	AA	AA
45	opg	AA	AA
46	opg	AA	AA
47	opg	AA	GA
48	opg	AA	GA
49	opg	TA	GG
50	opg	AA	GA
51	opg	TA	GA
52	opg	TA	GA
53	opg	AA	GA
54	opg	AA	GA
55	opg	TA	GG
56	opg	AA	GG
57	opg	AA	AA
58	opg	AA	GA
59	opg	TA	GA
60	opg	TT	GA
61	opg	TA	GA
62	opg	TA	GA
63	opg	TA	GA
64	opg	AA	GA
65	opg	AA	GG
66	opg	AA	AA
67	opg	TA	GA
68	opg	AA	GA
69	opg	AA	GA
70	opg	AA	AA
71	opg	TA	GG
72	opg	/	/

73	opg	TA	GG
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
74	opg	AA	AA
75	opg	AA	GA
76	opg	AA	GG
77	opg	AA	GA
78	opg	AA	AA
79	opg	AA	GA
80	opg	AA	/
81	opg	AA	GA
82	opg	/	/
83	opg	AA	AA
84	opg	TA	GA
85	opg	AA	GA
86	opg	AA	GA
87	opg	AA	GA
88	opg	AA	GA
89	opg	TA	GA
90	opg	TA	GG
91	opg	AA	GG
92	opg	AA	GA
93	opg	/	GA
94	opg	TA	GA
95	opg	AA	GA
96	opg	AA	AA
97	opg	AA	AA
98	opg	AA	AA
99	opg	TA	GG
100	opg	AA	AA
101	opg	AA	GG
102	opg	AA	AA
103	opg	AA	AA
104	opg	AA	GG
105	opg	AA	GA
106	opg	TA	GA
107	opg	TA	GG
108	opg	AA	AA
109	opg	/	/
110	opg	AA	GG
111	opg	TA	GA
112	opg	AA	GA
113	opg	AA	GA

114	opg	AA	GA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
115	opg	TA	GA
116	opg	AA	AA
117	opg	AA	AA
587	ralo	TA	GA
588	ralo	AA	AA
589	ralo	AA	GA
590	ralo	AA	AA
591	ralo	AA	AA
592	ralo	AA	GA
593	ralo	AA	AA
594	ralo	AA	AA
595	ralo	AA	GA
596	ralo	TA	GG
597	ralo	AA	AA
598	ralo	AA	GA
599	ralo	AA	GG
600	ralo	AA	/
601	ralo	AA	AA
602	ralo	AA	/
603	ralo	AA	AA
604	ralo	AA	/
605	ralo	AA	AA
606	ralo	AA	GA
607	ralo	TA	GA
608	ralo	AA	GG
609	ralo	TA	GA
610	ralo	AA	GA
611	ralo	TA	/
612	ralo	AA	GA
613	ralo	TA	GA
614	ralo	AA	/
615	ralo	AA	AA
616	ralo	AA	GA
617	ralo	AA	GA
618	ralo	AA	AA
619	ralo	AA	AA
620	ralo	AA	AA
621	ralo	TA	GG
622	ralo	AA	GA
623	ralo	AA	GG

624	ralo	AA	/
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
625	ralo	AA	AA
626	ralo	AA	GA
627	ralo	AA	/
628	ralo	AA	/
629	ralo	AA	GA
630	ralo	AA	AA
631	ralo	AA	AA
632	ralo	/	/
633	ralo	AA	AA
634	ralo	AA	GA
635	ralo	TA	/
636	ralo	AA	AA
637	ralo	AA	GG
638	ralo	AA	AA
639	ralo	AA	AA
640	ralo	AA	GA
659	ralo	TT	GA
660	ralo	/	/
661	ralo	/	/
662	ralo	AA	GA
663	ralo	AA	/
664	ralo	AA	AA
665	ralo	AA	AA
666	ralo	TA	/
667	ralo	AA	GG
1002Z	ZIT	AA	GG
1003Z	ZIT	AA	/
1004Z	ZIT	AA	GA
1005Z	ZIT	AA	AA
1006Z	ZIT	TT	GA
1007Z	ZIT	AA	GA
1008Z	ZIT	AA	AA
1009Z	ZIT	AA	/
1010Z	ZIT	AA	AA
1011Z	ZIT	AA	AA
1012Z	ZIT	AA	GA
1021Z	ZIT	AA	GA
1028Z	ZIT	AA	AA
1030Z	ZIT	AA	GA
1031Z	ZIT	AA	AA

1032Z	ZIT	AA	/
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
1033Z	ZIT	AA	AA
1034Z	ZIT	AA	AA
1035Z	ZIT	AA	AA
1036Z	ZIT	TA	GA
1037Z	ZIT	AA	GG
1038Z	ZIT	AA	/
1039Z	ZIT	AA	GG
1040Z	ZIT	AA	AA
1041Z	ZIT	TA	GG
1042Z	ZIT	AA	GA
1043Z	ZIT	AA	AA
1045Z	ZIT	TA	/
1049Z	ZIT	TA	GA
1051Z	ZIT	AA	GG
1052Z	ZIT	TA	GG
1053Z	ZIT	AA	AA
1054Z	ZIT	AA	AA
1055Z	ZIT	AA	/
1056Z	ZIT	AA	/
1057Z	ZIT	AA	/
1058Z	ZIT	AA	GG
1059Z	ZIT	AA	GG
1060Z	ZIT	AA	AA
1061Z	ZIT	AA	GA
1062Z	ZIT	AA	/
1064Z	ZIT	TT	GA
1065Z	ZIT	TA	GA
1066Z	ZIT	AA	GA
1067Z	ZIT	AA	AA
1068Z	ZIT	AA	GA
1069Z	ZIT	TT	GA
1070Z	ZIT	TA	/
1071Z	ZIT	TA	GG
1072Z	ZIT	TA	/
1074Z	ZIT	AA	GA
1075Z	ZIT	AA	AA
1076Z	ZIT	AA	GA
1077Z	ZIT	TA	/
1078Z	ZIT	AA	GA
1079Z	ZIT	AA	AA

1081Z	ZIT	AA	AA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
1082Z	ZIT	TA	GA
1083Z	ZIT	AA	AA
1085Z	ZIT	AA	AA
1087Z	ZIT	AA	GA
1088Z	ZIT	AA	GA
1089Z	ZIT	AA	GA
1090Z	ZIT	TA	GG
1091Z	ZIT	AA	GA
1092Z	ZIT	AA	AA
1093Z	ZIT	AA	GA
1094Z	ZIT	TA	GA
1095Z	ZIT	AA	AA
1097Z	ZIT	TT	GA
1098Z	ZIT	AA	AA
1100Z	ZIT	AA	AA
1101Z	ZIT	AA	AA
1102Z	ZIT	AA	AA
1103Z	ZIT	AA	GA
1104Z	ZIT	AA	AA
1105Z	ZIT	TA	GA
1106Z	ZIT	AA	AA
1107Z	ZIT	TA	GA
1108Z	ZIT	AA	GA
1110Z	ZIT	TA	/
c01	zlomi_D	AA	/
c02	zlomi_D	AA	GG
c03	zlomi_D	AA	GA
c04	zlomi_D	AA	AA
c05	zlomi_D	AA	GA
c06	zlomi_D	AA	GA
c07	zlomi_D	TA	GA
c08	zlomi_D	AA	GG
c09	zlomi_D	AA	GA
c10	zlomi_D	AA	AA
c11	zlomi_D	/	/
c13	zlomi_D	AA	CT
c14	zlomi_D	TA	/
c31	zlomi_D	AA	AA
c33	zlomi_D	AA	GA
c34	zlomi_D	AA	GG

c35	zlomi_D	AA	AA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
c36	zlomi_D	AA	GA
c37	zlomi_D	TA	GG
c38	zlomi_D	AA	AA
c39	zlomi_D	AA	GA
c40	zlomi_D	TA	/
c41	zlomi_D	TA	GA
c42	zlomi_D	AA	GA
c43	zlomi_D	AA	GA
c44	zlomi_D	TA	GA
c45	zlomi_D	AA	AA
c46	zlomi_D	AA	AA
c47	zlomi_D	AA	GG
c48	zlomi_D	TA	GG
c49	zlomi_D	AA	GA
c50	zlomi_D	AA	GA
c51	zlomi_D	AA	AA
c52	zlomi_D	AA	/
c53	zlomi_D	AA	AA
c54	zlomi_D	TA	GA
c55	zlomi_D	AA	AA
c56	zlomi_D	AA	GA
c57	zlomi_D	AA	/
c58	zlomi_D	TA	GA
c59	zlomi_D	AA	AA
c60	zlomi_D	AA	GA
c61	zlomi_D	TA	GA
c62	zlomi_D	AA	GA
c63	zlomi_D	AA	GA
c64	zlomi_D	AA	GA
c65	zlomi_D	AA	AA
c66	zlomi_D	AA	AA
c67	zlomi_D	AA	GG
c68	zlomi_D	AA	GA
c69	zlomi_D	TA	GA
c70	zlomi_D	AA	/
c71	zlomi_D	TT	GA
c73	zlomi_D	TA	GG
c74	zlomi_D	TA	GG
c75	zlomi_D	TA	GG
c76	zlomi_D	AA	GG

c77	zlomi_D	TA	GG
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
c78	zlomi_D	AA	AA
c79	zlomi_D	AA	/
c80	zlomi_D	TA	/
c81	zlomi_D	AA	AA
c82	zlomi_D	AA	AA
c83	zlomi_D	AA	AA
c84	zlomi_D	AA	AA
c85	zlomi_D	AA	AA
c87	zlomi_D	AA	AA
c88	zlomi_D	AA	AA
c89	zlomi_D	AA	AA
c90	zlomi_D	AA	AA
c91	zlomi_D	AA	AA
c92	zlomi_D	AA	AA
c93	zlomi_D	AA	AA
c94	zlomi_D	AA	AA
c95	zlomi_D	AA	AA
c96	zlomi_D	AA	AA
c97	zlomi_D	AA	AA
c98	zlomi_D	TT	GA
c99	zlomi_D	AA	AA
c100	zlomi_D	TT	AA
C01	zlomi_V	AA	AA
C02	zlomi_V	AA	AA
C03	zlomi_V	TT	GG
C04	zlomi_V	TA	AA
C05	zlomi_V	AA	AA
C06	zlomi_V	TA	GA
C07	zlomi_V	AA	AA
C08	zlomi_V	TA	AA
C09	zlomi_V	AA	AA
C10	zlomi_V	TA	AA
C11	zlomi_V	TA	GA
C12	zlomi_V	TA	AA
C13	zlomi_V	AA	AA
C14	zlomi_V	TT	GG
C15	zlomi_V	TA	AA
C16	zlomi_V	TA	AA
C17	zlomi_V	TA	AA
C18	zlomi_V	TA	AA

C19	zlomi_V	AA	AA
Zap.štev	Štev.vzorca	Genotip za polimorfizem	
		-753 A > T	- 407 G > A
C20	zlomi_V	TA	AA
C21	zlomi_V	TA	AA
C22	zlomi_V	AA	AA
C23	zlomi_V	TA	AA
C24	zlomi_V	TA	AA
C25	zlomi_V	AA	AA
C26	zlomi_V	AA	AA
C27	zlomi_V	AA	AA
C28	zlomi_V	TT	AA
C29	zlomi_V	AA	AA
C30	zlomi_V	AA	AA
C31	zlomi_V	AA	AA
C32	zlomi_V	TT	GA
C33	zlomi_V	TA	GA
C34	zlomi_V	AA	AA
C35	zlomi_V	TA	AA
C36	zlomi_V	TT	GG
C37	zlomi_V	TA	AA
C38	zlomi_V	TA	AA
C39	zlomi_V	AA	AA
C41	zlomi_V	AA	AA
C42	zlomi_V	TT	GA
C43	zlomi_V	AA	AA
C44	zlomi_V	TA	AA
C45	zlomi_V	AA	AA
C49	zlomi_V	TT	AA
C50	zlomi_V	AA	AA
C51	zlomi_V	TA	AA
C52	zlomi_V	TA	AA
C53	zlomi_V	AA	AA
C54	zlomi_V	TT	GA
C55	zlomi_V	AA	AA
C56	zlomi_V	TA	AA
C57	zlomi_V	AA	AA
C61	zlomi-V	AA	GA