

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA MURŠAK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA MURŠAK

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV V PROMOTORJU IN EKSONU B V GENU  
PPARG Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI  
KOSTNE PREMENE**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN PROMOTER AND EXON B IN  
PPARG GENE WITH BONE MINERAL DENSITY AND BIOCHEMICAL  
MARKERS OF BONE TURNOVER**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in delovnim mentorstvom asist. Jane Dragojevič, mag. farm. Meritve mineralne kostne gostote so opravili na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in Mariboru ter na Kliniki za travmatologijo v Splošni bolnišnici Celje. Meritve koncentracij biokemičnih kazalcev kostne premene so opravili na Kliniki za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

### **Zahvala**

Zahvala gre mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in delovni mentorici asist. Jani Dragojevič, mag. farm. za izkazano zaupanje, potrpežljivost, strokovno vodenje skozi delo v laboratoriju in številne koristne nasvete. Zahvalila bi se rada tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč pri delu v laboratoriju.

Predvsem pa se želim zahvaliti družini in prijateljem za neomajno podporo, razumevanje in vse lepe trenutke.

### **Izjava**

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

Ljubljana, april 2011

Vesna Muršak

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Andrej Umek, mag. farm.

## VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	KOSTNINA.....	1
1.1.1	ZGRADBA IN SESTAVA KOSTI.....	1
1.1.2	KOSTNA PREMENA.....	2
1.2	OSTEOPOROZA .....	2
1.2.1	EPIDEMIOLOGIJA OSTEOPOROZE IN NJENIH ZAPLETOV.....	3
1.2.2	KLINIČNA SLIKA .....	4
1.2.3	DEJAVNIKI TVEGANJA .....	4
1.2.4	DIAGNOSTIKA.....	5
1.2.5	ZDRAVLJENJE .....	8
1.3	PPAR $\gamma$ (receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov $\gamma$ ) .....	8
1.3.1	STRUKTURA PPAR $\gamma$ .....	8
1.3.2	MEHANIZEM DELOVANJA PPAR $\gamma$ .....	9
1.3.3	VLOGA PPAR $\gamma$ V TELESU.....	10
1.3.4	PPAR $\gamma$ IN OSTEOPOROZA .....	11
1.3.5	GEN ZA PPARG.....	12
2	NAMEN DELA.....	14
3	MATERIALI IN METODE .....	15
3.1	SPLOŠNA OPOZORILA.....	15
3.2	PREISKOVANCI.....	15
3.3	PRIPRAVA RAZTOPIN VZORČNIH DNA .....	16
3.4	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO .....	17
3.4.1	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU .....	17
3.5	GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA Pro12Ala .....	19
3.6	ANALIZA TALILNIH KRIVULJ VISOKE LOČLJIVOSTI .....	20

3.6.1	GENOTIPIZACIJA -2957A>G.....	21
3.7	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA .....	23
3.7.1	POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA DNA IN ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR.....	23
3.7.2	PRIPRAVA PRODUKTOV PCR ZA SEKVENCIRANJE.....	25
3.8	STATISTIČNI TESTI.....	28
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	29
4.1	GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA Pro12Ala.....	29
4.2	GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA -2957A>G.....	30
4.2.1	OPTIMIZACIJA POGOJEV.....	30
4.2.2	POTEK GENOTIPIZACIJE.....	32
4.3	UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMOV.....	35
4.4	IZRAČUN IN ANALIZA HAPLOTIPOV .....	36
4.5	OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV Pro12Ala IN -2957A>G TER NJUNIH HAPLOTIPOV Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE .....	37
4.5.1	MOŠKI PREISKOVANCI.....	38
4.5.2	PREMENOPAVZNE PRISKOVANKE.....	41
4.5.3	POMENOPAVZNE PREISKOVANKE.....	44
4.6	VPLIV POLIMORFIZMOV Pro12Ala IN -2957A>G TER NJUNIH HAPLOTIPOV NA POJAV NIZKOENERGIJSKEGA ZLOMA.....	54
4.6.1	VPLIV POLIMORFIZMA -2957A>G.....	55
4.6.2	VPLIV POLIMORFIZMA Pro12Ala.....	55
4.6.3	VPLIV HAPLOTIPA AC.....	56
4.6.4	VPLIV HAPLOTIPA AG .....	56
4.6.5	VPLIV HAPLOTIPA GC.....	57

4.7	OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV Pro12Ala IN -2957A>G TER NJUNIH HAPLOTIPOV Z ODZIVNOSTJO NA ZDRAVLJENJE.....	57
4.7.1	ZDRAVLJENJE Z ALENDRONATOM.....	58
4.7.2	ZDRAVLJENJE Z RALOKSIFENOM .....	60
5	SKLEP.....	62
6	LITERATURA .....	64
7	PRILOGE .....	68
7.1	REZULTATI GENOTIPIZACIJE .....	68

## POVZETEK

Osteoporoza je najpogostejša presnovna bolezen kosti, ki zaradi izgube kostne mase, ki je posledica porušenega ravnovesja med kostno razgradnjo in tvorbo, vodi v povečano tveganje za zlome. Osteoblasti, celice odgovorne za izgradnjo kosti, in adipociti izhajajo iz skupnih mezenhimskih matičnih celic (MMC). Receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), v kostnem mozgu aktivira diferenciacijo MMC v adipocite in tako zavira njihovo diferenciacijo v osteoblaste. PPAR $\gamma$  ima tako pomembno vlogo v uravnavanju kostne mase.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti pogostost in povezanost polimorfizmov -2957A>G (rs12497191) in Pro12Ala (rs1801282) v genu PPARG in njunih haplotipov z mineralno kostno gostoto (MKG) in biokemičnimi kazalci kostne premene. Proučili smo tudi vpliv obeh polimorfizmov na odzivnost zdravljenja z alendronatom in raloksifenom ter vpliv na pojav nizkoenergijskega zloma, značilnega za bolnike z osteoporozo.

V raziskavo je bilo vključenih 734 preiskovancev (117 moških in 617 žensk), ki smo jim določili genotip za polimorfizem -2957A>G (AA, GA, GG) s pomočjo analize talilnih krivulj visoke ločljivosti in genotip za polimorfizem Pro12Ala (CC, CG, GG) z metodo alelne diskriminacije s sondami TaqMan.

Relativne frekvence genotipov polimorfizma -2957A>G so bile 70,3% : 27,6% : 2,1% za genotipe AA : GA : GG, za polimorfizem Pro12Ala pa so bile frekvence naslednje: 69,1% : 26,6% : 4,3% za genotipe CC : GC : GG. Dokazali smo povezanost polimorfizma -2957A>G s koncentracijami RANKL ( $p=0,011$ ) pri pomenopavznih preiskovankah in z odzivnostjo na zdravljenje z alendronatom. Po enoletnem zdravljenju se je statistično značilno povečala MKG ledvenih vretenc pri pomenopavznih preiskovankah s prisotnim mutiranim alelom ( $p=0,024$ ). Pokazali smo tudi, da prisotnost alela G zmanjša obete za pojav nizkoenergijskega zloma ( $p=0,025$ ). Polimorfizem Pro12Ala ni pokazal povezanosti z nobeno od proučevanih kliničnih lastnosti, zato smo zaključili, da nima pomembnejšega vpliva na kostno premeno in nastanek osteoporoze. Statistična analiza podatkov za haplotipe je pokazala povezanost števila kopij haplotipa AC s koncentracijami osteoprotegerina ( $p=0,040$ ) pri moških preiskovancih. Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah smo odkrili povezanost števila kopij haplotipa AG s koncentracijami osteokalcina ( $p=0,012$ ). Pri pomenopavznih preiskovankah smo odkrili povezanost števila

kopij haplotipa GC s koncentracijami RANKL ( $p=0,013$ ). Ugotovili smo tudi vpliv števila kopij haplotipa GC na odzivnost na zdravljenje z alendronatom.

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da osebe z genotipom -2957AA predstavljajo rizične osebe za pojav osteoporoznega zloma, ki se slabše odzovejo na zdravljenje z alendronatom.

## ABSTRACT

Osteoporosis is the most common metabolic disease of bones, which due to bone loss as a result of imbalance between bone resorption and formation, leading to increased risk of bone fractures. Osteoblasts, bone forming cells, and adipocytes are both derived from the marrow mesenchymal stem cells. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) activates differentiation of marrow mesenchymal stem cells to adipocytes and blocks their ability to differentiate into osteoblasts. PPAR $\gamma$  thus plays an important role in regulating bone mass.

The objective of our work was to determine frequency and association of polymorphisms -2957A>G (rs12497191) and Pro12Ala (rs1801282) in PPARG gene and their haplotypes with bone mineral density (BMD) and biochemical markers of bone turnover. We also aimed to determine the impact of both polymorphisms on the response to alendronate or raloxifene treatment and on the low-energy fracture.

We genotyped samples of 734 volunteers (117 males and 617 females). High resolution melting was used to analyze the -2957A>G polymorphism and the analysis of the Pro12Ala polymorphism was performed by an allelic discrimination method using TaqMan probes.

The relative frequencies of genotypes for polymorphism -2957A>G were 70,3% : 27,6% : 2,1% for AA : GA : GG genotypes. For polymorphism Pro12Ala frequencies were as follows: 69,1% : 26,6% : 4,3% for genotypes CC : GC : GG.

We discovered statistically significant association between the -2957A>G polymorphism and concentrations of RANKL ( $p=0,011$ ) in group of postmenopausal women and a significant association with responsiveness to alendronate treatment. After one year of treatment BMD of lumbar spine has significantly increased in group of postmenopausal women carrying at least one copy of mutated G allele ( $p=0,024$ ). Mutated allele was also associated with reduced odds for low-energy fracture occurrence ( $p=0,025$ ). Polymorphism



Pro12Ala showed no association with any of the studied clinical characteristics, therefore we concluded that it has no significant impact on the bone loss and on the risk of developing osteoporosis. Statistical analysis of haplotypes showed that the number of AC haplotype copies was associated with osteoprotegerin concentrations (OPG;  $p=0,040$ ) in male individuals. In the group of healthy postmenopausal women the number of AG haplotype copies was related to osteocalcin concentrations ( $p=0,012$ ). An association between the number of GC haplotype copies and RANK concentrations ( $p=0,013$ ) was found in the group of postmenopausal women. We have also discovered that the number of GC haplotype copies was related to alendronate treatment responsiveness.

Based on our results we can conclude that individuals with -2957AA genotype represent individuals with higher risk for osteoporotic fracture and have poorer responsiveness to alendronate treatment.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

<b>B</b>	ocena koeficienta regresije
<b>BALP</b>	kostna alkalna fosfataza
$c_p$	cikel, ko je presežena linija fluorescenčnega praga
<b>CTX</b>	C-terminalni telopeptid kolagena I
<b>ddNTP</b>	dideoksinukleotidi
<b>DPYR</b>	deoksipiridinolin
<b>dBALP</b>	sprememba vrednosti BALP po enem letu
<b>dDPYR</b>	sprememba vrednosti DPYR po enem letu
<b>dMKG</b>	sprememba vrednosti MKG po enem letu
<b>dOC</b>	sprememba vrednosti OC po enem letu
<b>DXA</b>	dvoenergjska rentgenska absorpciometrija
<b>HRM</b>	analiza talilnih krivulj visoke ločljivosti
<b>ITM</b>	indeks telesne mase
<b>IZ<sub>95%</sub></b>	95% interval zaupanja
<b>MKG</b>	mineralna kostna gostota
<b>MKG<sub>fn</sub></b>	mineralna kostna gostota vratu stegenice
<b>MKG<sub>ls</sub></b>	mineralna kostna gostota ledvenih vretenc
<b>MKG<sub>tot</sub></b>	mineralna kostna gostota kolka
<b>MMC</b>	mezenhimske matične celice kostnega mozga
<b>N</b>	število preiskovancev
<b>OC</b>	osteokalcin
<b>OPG</b>	osteoprotegerin
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>PPAR</b>	receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov $\gamma$
<b>PPRE</b>	PPAR odzivni elementi
<b>QCT</b>	kvantitativna računalniška tomografija
<b>QUS</b>	kvantitativni ultrazvok
<b>RANKL</b>	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B
<b>SBII</b>	sladkorna bolezen tipa II
<b>SD</b>	standardna deviacija
<b>SZO</b>	Svetovna zdravstvena organizacija

<b>T<sub>m</sub></b>	talilna temperatura
<b>TZD</b>	tiazolidindioni

**KAZALO SLIK IN PREGLEDNIC****SLIKE**

<i>Slika 1: Struktura PPAR<math>\gamma</math> (17).</i>	9
<i>Slika 2: Prikaz signalnih poti PPAR<math>\gamma</math> (20).</i>	10
<i>Slika 3: Shematski prikaz razvoja kostnih celic in adipocitov (21).</i>	11
<i>Slika 4: Shema genomske strukture človeškega gena PPARG (17).</i>	13
<i>Slika 5: Shematski prikaz enega cikla verižne reakcije s polimerazo.</i>	17
<i>Slika 6: Detekcija produktov PCR s hidrolizirajočimi sondami (33).</i>	18
<i>Slika 7: Prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan<sup>®</sup>.</i>	29
<i>Slika 8: Krivulja pomnoževanja dveh vzorcev (C16 in C18) pri različnih koncentracijah MgCl<sub>2</sub>.</i>	31
<i>Slika 9: Prikaz talilnih vrhov za različne genotipe polimorfizma -2957A&gt;G: nemutiran homozigot (AA), heterozigot (GA) in mutiran homozigot (GG).</i>	31
<i>Slika 10: Prikaz normalizacije osnovnih talilnih krivulj.</i>	32
<i>Slika 11: Prikaz temperaturnega premika normaliziranih talilnih krivulj po temperaturni osi.</i>	33
<i>Slika 12: Prikaz končnih obdelanih talilnih krivulj v obliki diagrama razlik.</i>	34
<i>Slika 13: Prikaz končnih obdelanih talilnih krivulj v obliki diagrama razlik po dodatku referenčnega nemutiranega homozigota.</i>	34

**PREGLEDNICE**

<i>Preglednica I: Najbolj proučevani kandidatni geni pri osteoporozi (11).</i>	5
<i>Preglednica II: Definicija osteoporoze na podlagi merjenja MKG z DXA (12).</i>	6
<i>Preglednica III: Učinkovine za zdravljenje osteoporoze.</i>	8
<i>Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo polimorfizma Pro12Ala.</i>	19
<i>Preglednica V: Pogoji PCR v realnem času.</i>	19
<i>Preglednica VI: Optimirana sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo polimorfizma -2957A&gt;G.</i>	21
<i>Preglednica VII: Pogoji PCR v realnem času in analize HRM.</i>	22
<i>Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za reakcijo PCR.</i>	24
<i>Preglednica IX: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje tarčnega DNA odseka.</i>	24
<i>Preglednica X: Sestava reakcijske zmesi.</i>	26
<i>Preglednica XI: Pogoji PCR reakcije.</i>	26
<i>Preglednica XII: Sestava raztopine STOP.</i>	27
<i>Preglednica XIII: Povezava med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem DNA</i>	29
<i>Preglednica XIV: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem -2957A&gt;G v preiskovanih skupinah.</i>	35
<i>Preglednica XV: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem Pro12Ala v preiskovanih skupinah.</i>	36
<i>Preglednica XVI: Frekvence napovedanih haplotipov (AC, AG, GC, GG).</i>	36
<i>Preglednica XVII: Prikaz parametrov vezavnega neravnovesja.</i>	37
<i>Preglednica XVIII: Povprečne vrednosti in SD izmerjenih parametrov v skupini moških, premenopavznih in pomenopavznih preiskovank.</i>	38
<i>Preglednica XIX: Povprečne vrednosti in SD izmerjenih parametrov za pomenopavzne osteoporozne preiskovanke, zdravljene z alendronatom ali raloksifenom, in preiskovancev z nizkoenergijskim zlomom.</i>	38
<i>Preglednica XX: Vpliv polimorfizma -2957A&gt;G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških</i>	39
<i>Preglednica XXI: Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških</i>	39

<b>Preglednica XXII:</b> Vpliv števila kopij haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških .....	39
<b>Preglednica XXIII:</b> Prikaz rezultatov Mann Whitneyevega testa za primerjavo srednjih vrednosti OPG med posameznimi skupinami glede na število kopij haplotipa AC.....	40
<b>Preglednica XXIV:</b> Vpliv števila kopij haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških:.....	40
<b>Preglednica XXV:</b> Vpliv števila kopij haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških. ....	40
<b>Preglednica XXVI:</b> Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah.....	42
<b>Preglednica XXVII:</b> Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah.....	42
<b>Preglednica XXVIII:</b> Vpliv števila kopij haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah.....	43
<b>Preglednica XXIX:</b> Vpliv števila kopij haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah.....	43
<b>Preglednica XXX:</b> Vpliv števila kopij haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah.....	44
<b>Preglednica XXXI:</b> Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah .....	45
<b>Preglednica XXXII:</b> Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah .....	46
<b>Preglednica XXXIII:</b> Vpliv števila kopij haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah.....	46
<b>Preglednica XXXIV:</b> Vpliv števila kopij haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah. ....	47
<b>Preglednica XXXV:</b> Vpliv števila kopij haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah. ....	47
<b>Preglednica XXXVI:</b> Prikaz rezultatov Mann Whitneyevega testa za primerjavo srednjih vrednosti RANKL med posameznimi skupinami glede na število kopij haplotipa GC.....	48
<b>Preglednica XXXVII:</b> Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah.....	49

<b>Preglednica XXXVIII:</b> Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah .....	49
<b>Preglednica XXXIX:</b> Vpliv haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah .....	50
<b>Preglednica XL:</b> Vpliv haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah.....	50
<b>Preglednica XLI:</b> Prikaz rezultatov Bonferroni post hoc testa za OC kot odvisno spremenljivko in število kopij haplotipa AG kot neodvisno spremenljivko. ....	51
<b>Preglednica XLII:</b> Vpliv haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah.....	51
<b>Preglednica XLIII:</b> Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah.....	52
<b>Preglednica XLIV:</b> Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah.....	52
<b>Preglednica XLV:</b> Vpliv haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah. ....	53
<b>Preglednica XLVI:</b> Vpliv haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah .....	53
<b>Preglednica XLVII:</b> Vpliv haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah .....	54
<b>Preglednica XLVIII:</b> Ocena vpliva polimorfizma -2957A>G ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo. ....	55
<b>Preglednica XLIX:</b> Ocena vpliva polimorfizma Pro12Ala ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo. ....	56
<b>Preglednica L:</b> Ocena vpliva števila kopij haplotipa AC ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo. ....	56
<b>Preglednica LI:</b> Ocena vpliva števila kopij haplotipa AG ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo. ....	57
<b>Preglednica LII:</b> Ocena vpliva števila kopij haplotipa GC ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo. ....	57
<b>Preglednica LIII:</b> Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom .....	58

<b>Preglednica LIV:</b> Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom.....	58
<b>Preglednica LV:</b> Vpliv haplotipa AC na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom. .....	59
<b>Preglednica LVI:</b> Vpliv haplotipa AG na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom.....	59
<b>Preglednica LVII:</b> Vpliv haplotipa AG na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom.....	59
<b>Preglednica LVIII:</b> Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom. ....	60
<b>Preglednica LIX:</b> Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom.....	60
<b>Preglednica LX:</b> Vpliv haplotipa AC na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom. .....	61
<b>Preglednica LXI:</b> Vpliv haplotipa AG na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom.....	61
<b>Preglednica LXII:</b> Vpliv haplotipa GC na MKG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom.....	61



# 1 UVOD

## 1.1 KOSTNINA

Kosti dajejo človeškemu telesu oporo, ščitijo življenjsko pomembne organe, so nasadišče za mišice in shramba za kostni mozeg, zagotavljajo pa tudi zadostno zalogo kalcija in drugih mineralov za vzdrževanje ravnovesja notranjega okolja (1).

### 1.1.1 ZGRADBA IN SESTAVA KOSTI

Ločimo dva tipa kostnega tkiva; **kortikalno (kompaktno)** in **trabekularno (gobasto) kostno tkivo**. Kortikalno kostno tkivo tvori 80% kostne mase in se nahaja v zunanjih plasteh dolgih kosti. Trabekularno kostno tkivo zavzema 20% kostne mase in se nahaja v vretencih, ploščatih kosteh in končnih delih dolgih kosti. Z razliko od kortikalnega je močno porozno, ima večjo površino ter je metabolno bolj aktivno, saj presnovni procesi potekajo na površini kosti (1).

Kost je sestavljena iz anorganskih (65%) in organskih (35%) snovi. **Anorganski del** kosti sestavljajo v glavnem kalcijevi ioni in fosfati. V kosteh se nahaja 99% vsega kalcija, in sicer v obliki amorfnega kalcijevega fosfata, ki se lahko izmenjuje s kalcijem v telesnih tekočinah, in v obliki kristalov hidroksiapatita. V manjši količini so prisotni tudi karbonati, citrati in fluor kot anioni ter natrij, magnezij in drugi kot kationi (1, 2).

**Organski del** kosti je sestavljen iz kolagena tipa I, nekolagenih proteinov (osteonektin, osteokalcin), ki tvorijo nemineraliziran kostni matriks ali osteid, in kostnih celic (1, 2). Te vzdržujejo strukturno integriteto kosti in regulirajo presnovo. Ločimo tri tipe celic (2):

- Osteoblasti se razvijejo iz mezenhimskih matičnih celic kostnega mozga (MMC) (iz njih se razvijejo tudi hondrociti, mišične celice, adipociti) in so odgovorni za izgradnjo kosti. Izločajo proteine (najpomembnejši je kolagen tipa I), ki sestavljajo osteoid, sodelujejo pri mineralizaciji kosti in uravnavajo delovanje osteoklastov (RANKL, OPG, m-CSF). Osteoblasti se lahko naprej razvijejo v osteocite ali pa se preoblikujejo v ploščate, podolgovate celice, ki pokrivajo površino kosti (2, 3).
- Osteociti so preoblikovani osteoblasti, ki ostanejo ujeti v mineraliziranem kostnem matriksu. Zanje so značilni dolgi izrastki, s katerimi komunicirajo z drugimi celicami. Osteociti aktivno sodelujejo pri izmenjavi ionov in delujejo kot mehanosenzorične celice, ki zaznajo potrebo po remodelaciji in popraviljanju mikropoškodb (2, 3).

- Osteoklasti izvirajo iz celic krvotvornega sistema in so odgovorni za resorpcijo kosti. So večjedrne celice, ki preko delovanja od ATP odvisne protonske črpalke v membrani ustvarijo kisel medij, ki raztopi mineralne komponente. Izločajo tudi proteolitične encime (katepsin K, kislja fosfataza, karbonska anhidraza), ki razgrajujejo osteoid (2, 3).

### 1.1.2 KOSTNA PREMENA

Kostna premena je proces, sestavljen iz razgradnje in tvorbe kosti, ki poteka vse življenje. V enem letu se obnovi od 5-10% celotnega skeleta (4). Namen premene je mobilizacija kostnega kalcija v okviru vzdrževanja notranjega ravnovesja, nadomeščanje starega kostnega tkiva, prilagajanje skeleta različnim mehanskim obremenitvam ter popravljanje in obnavljanje poškodovane kostnine (2, 5). Obnova kostnega tkiva ne poteka na celotni površini kosti, ampak na točno določenih mestih t.i. kostnih remodelacijskih enotah (*ang. bone remodeling units*) (4). En cikel kostne premene traja tri do štiri mesece in je sestavljen iz večih faz. V začetni fazi aktivacije pride do interakcije med osteoblasti in prekursorji osteoklastov, kar vodi do diferenciacije v večjedrne osteoklaste, ki migrirajo do razgaljene kostne površine in se prilepijo nanjo. Zreli osteoklasti izločajo vodikove protone in proteolitične encime, ki omogočajo demineralizacijo in razgradnjo osteoida v fazi resorpcije. Sledi faza preobrata, kjer osteoklaste nadomestijo enojedrne celice, ki počistijo nastalo resorpcijsko votlino in odložijo cementno plast (sestavljeno iz proteoglikanov) ter izločajo rastne dejavnike, ki sprožijo tvorbo nove kosti. V fazi tvorbe nove kosti osteoblasti najprej izgradijo osteoid, ki se nato mineralizira (2, 5). Na razvoj in diferenciacijo osteoklastov in osteoblastov in s tem na kostno remodelacijo vplivajo različni sistemski (PTH, kalcitonin, estrogeni, rastni hormon) in lokalni dejavniki (citokini, rastni faktorji) (3).

## 1.2 OSTEOPOROZA

Osteoporozna je sistemska skeletna bolezen, za katero so značilne nizka kostna masa in mikroarhitekturne spremembe kostnega tkiva, kar poveča krhkost kosti in tveganje za zlome. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO; *ang. World Health organisation – WHO*) je definirala osteoporozo na osnovi izmerjene mineralne kostne gostote (MKG). Osteoporozna je opredeljena kot bolezen, pri kateri je izmerjena MKG za 2,5 ali več standardnih deviacij (SD) pod povprečno vrednostjo za mlade odrasle osebe (4).

Klinično delimo osteoporozo v dve skupini: **primarno** osteoporozo, ki se naprej deli na juvenilno, idiopatično, pomenopavzalno (tip I) ter senilno (tip II) osteoporozo, in na **sekundarno** osteoporozo. Najpogostejši sta pomenopavzalna in senilna osteoporozna (1).

**Pomenopavzalna osteoporozna (osteoporozna tipa I)** prizadene ženske v prvih 15 do 20 letih po menopavzi, glavni vzrok pa predstavlja pomanjkanje estrogenov (1, 6). Zaradi pomanjkanja estrogenov pride do povečane tvorbe osteoklastov in osteoblastov (estrogeni namreč zavirajo izločanje in delovanje citokinov, IL-6, TNF, M-CSF, ki so odgovorni za osteoklastogenezo in osteoblastogenezo) in s tem do povečane hitrosti kostne remodelacije. Posledica pomanjkanja estrogenov je tudi podaljšana življenjska doba osteoklastov in s tem porušeno ravnovesje med resorpcijo in tvorbo kosti (estrogeni spodbujajo apoptozo zrelih osteoklastov) (3). Značilni so kompresijski zlomi tistih kosti, kjer prevladuje trabekularna kostnina (zlomi vretenc, reber, zapestja in kolka) (1).

**Senilna osteoporozna (osteoporozna tipa II)** prizadene moške in ženske po 70. letu starosti. Vzroka za nastanek sta manjšanje kostne mase in manjša absorpcija kalcija iz črevesa (zaradi sprememb na črevesni sluznici in zmanjšane tvorbe aktivne oblike vitamina D<sub>3</sub> v ledvicah), ki ima za posledico zvišano koncentracijo PTH. Manjšanje kostne mase se začne že po 40. letu starosti in je posledica pospešene razgradnje kosti ob nespremenjeni stopnji tvorbe nove kosti ali zmanjšane gradnje kosti ob nespremenjeni razgradnji kosti. Glavna klinična značilnost senilne osteoporoze je zlom kolka in vretenc (1, 6).

**Sekundarna osteoporozna** je redkejša in se razvije kot posledica različnih bolezni (nezdravljen hipogonadizem, boleznih prebavil z moteno absorpcijo kalcija) oziroma delovanja zdravil (dolgotrajno zdravljenju z glukokortikoidi) (1).

### 1.2.1 EPIDEMIOLOGIJA OSTEOPOROZE IN NJENIH ZAPLETOV

Osteoporozna je najpogostejša presnovna bolezen kosti. Ocenjujejo, da trenutno preko 200 milijonov ljudi po vsem svetu trpi za osteoporozo (7). Je trikrat pogostejša pri ženskah kot pri moških zaradi nižje maksimalne kostne mase (ang. *peak bone mass*) in zaradi hormonskih sprememb po menopavzi (4). Prevalenca osteoporoze v Sloveniji je pri ženskah nad 50. letom 27,5%, pri moških nad 60. letom pa 14,6%. Delež osteoporoznih bolnic je pri ženskah nad 65. letom 40,6%, pri moških nad 65. let pa 16,7%, kar kaže na porast osteoporoze s starostjo (8).

Glavni zaplet osteoporoze predstavljajo zlomi, njihova incidenca z leti narašča. Po 50. letu starosti je tveganje za zlom zaradi osteoporoze približno 40% in je podobno tveganju za

koronarno srčno bolezen (9). Vsaka tretja ženska in vsak peti moški, starejši od 50. let, bodo doživeli osteoporozni zlom (7). Po 45. letu so najbolj pogosti zlomi zapestja, po 65. letu pa začne eksponentno naraščati zlom kolka (9). Pri osebah, ki so že doživele zlom, se tveganje za ponoven zlom poveča za 86% (7).

### 1.2.2 KLINIČNA SLIKA

Klinična slika je do zloma kosti neizrazita in neznačilna. Že majhne telesne obremenitve lahko povzročijo kompresijski zlom vretenc, za katerega je značilna močna bolečina, ki pa mine spontano po enem do dveh mesecih. Kasnejši dodatni zlomi vretenc vodijo do deformacije hrbtenice in kronične tope bolečine v hrbtu. Zaradi kompresijskih zlomov prsnih in ledvenih vretenc se telesna višina zmanjša tudi do 20 cm, nastane pa tudi značilna ukrivljenost hrbta v predelu prsnega koša (1). Najhujši zaplet osteoporoze predstavlja zlom kolka, ki je zelo boleč, potrebna je hospitalizacija, zaradi zapletov pa je lahko usoden (4).

### 1.2.3 DEJAVNIKI TVEGANJA

Dejavniki, ki povečajo tveganje za razvoj osteoporoze in z njo povezanih zlomov so (4, 7):

- ženski spol
- starost
- genetski dejavniki
- prehrana (nizek vnos kalcija)
- pomanjkanje vitamina D
- način življenja (fizična neaktivnost, prekomerno pitje alkohola, kajenje)
- nizek indeks telesne mase
- nagnjenost k padcem
- dolgotrajna terapija z glukokortikoidi
- hormonske motnje (zgodnja menopavza, hipogonadizem, hiperparatiroidizem, hipertiroidizem)
- nekatere bolezni jeter, žolčnih poti in prebavil

**Genetski dejavniki** imajo pomembno vlogo pri razvoju osteoporoze. Študije na dvojčkih in družinah so pokazale vpliv genetskih dejavnikov na uravnavanje MKG in na druge dejavnike tveganja za osteoporozni zlom (geometrija kolka, kvantitativne ultrazvočne lastnosti kosti, biokemični kazalci kostne premene, indeks telesne mase, mišična moč, starost ob menopavzi). V splošni populaciji so genetski vplivi na MKG in ostale zgoraj omenjene fenotipe poligenske narave, torej so pod vplivom različnih genetskih sprememb (vsaka z majhnim, omejenim vplivom) in njihovo interakcijo z okoljskimi faktorji. Za

odkrivanje kandidatnih genov se uporabljajo asociacijske študije, študije vezanega dedovanja na ljudeh in živalih ter vsegenomske analize genskega izražanja.

Do danes je bilo raziskanih že veliko kandidatnih genov, ki naj bi bili povezani s kostno maso ali osteoporoznimi zlomi (*Preglednica I*), najbolj proučevani pa so gen za receptor vitamina D (VDR), gen za kolagen tipa I  $\alpha$ I (COL1A1) in gen za estrogenski receptor (10, 11).

**Preglednica I:** Najbolj proučevani kandidatni geni pri osteoporozi (11).

<b>Hormoni in receptorji</b>	<b>Citokin in receptorji</b>
androgenski receptor (AR) aromataza (CYP19A1) receptor za kalcitonin (CTR) estrogenski receptor $\alpha$ in $\beta$ (ESR1 in ESR2) paratiroidni receptor tipa I (PTH1R) paratiroidni hormon (PTH) receptor za vitamin D (VDR)	interlevkin-1 $\alpha$ in $\beta$ (IL-1 $\alpha$ in $\beta$ ) antagonist receptorja za interlevkin-1 (IL-1RA) interlevkin-6 (IL-6) dejavnik tumorske nekroze (TNF) receptor dejavnika tumorske nekroze 2 (TNFR2)
<b>Regulatorni dejavniki osteoblastov</b>	<b>Z osteoklasti povezani geni</b>
Alox 12 in Alox 15 kostni morfogeni protein 2 in 4 (BMP2, BMP4) jedrni vezavni dejavnik A1 (RUNX2) inzulinu podoben rastni dejavnik 1 (IGF1) sklerostin (SOST) transformirajoči rastni dejavnik $\beta$ (TGF $\beta$ ) LDL-receptorju soroden protein 5 in 6 (LRP5 in 6) receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )	katepsin K (CTSK) kloridni kanal 7 (CLCN7) osteoprotegerin (OPG) receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B (RANK) ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B (RANKL)
<b>Sestavine kostnega matriksa</b>	<b>Ostali</b>
$\alpha$ HS2 glikoprotein (AHSG) kolagen tipa 1 $\alpha$ I (COL1A1) osteokalcin (BGLAP)	apolipoprotein Ec (APOE) metilentetrahidrofolatna reduktaza (MTHFR) HLA razred II (HLA-D)

Proučevanje genov, ki vplivajo na razvoj osteoporoze, ima pomembno vlogo v klinični praksi. Geni, ki uravnavajo MKG in krhkost kosti, predstavljajo potencialne tarče za načrtovanje novih učinkovin za zdravljenje osteoporoze. Genetski kazalci pa bi se lahko v prihodnosti uporabljali kot diagnostično orodje za ocenjevanje tveganja za osteoporozni zlom pri posameznikih (10).

#### 1.2.4 DIAGNOSTIKA

Po priporočilu SZO je diagnozo osteoporoze možno postaviti na podlagi merjenja MKG z dvoenergijsko rentgensko absorpcimetrijo (DXA, ang. *dual energy x-ray absorptiometry*) (*Preglednica II*) ali na osnovi že dokazanih osteoporoznih zlomov (12).

Rezultati merjenja MKG so lahko predstavljeni v obliki (7):

- T-vrednosti (število SD nad ali pod srednjo vrednostjo MKG za zdrave, mlade odrasle osebe)
- Z-vrednosti (število SD nad ali pod srednjo vrednostjo MKG za populacijo enake starosti in spola)

Meritve MKG z DXA potekajo na območju ledvenih vretenc, kolka in zapestja. Meritve motijo kalcinacije v aorti, skolioza in osteoartritis, ki lažno zvišajo MKG (13).

Danes se poleg DXA za določanje kostne gostote dostopne še druge tehnike kot npr. kvantitativni ultrazvok (QUS, ang. *quantitative ultrasound*) in kvantitativna računalniška tomografija (QCT, ang. *quantitative computer tomography*), ki pa niso uporabne za diagnostiko osteoporoze, ampak se uporabljajo za ocenjevanje tveganja za zlom kosti (QUS) in v kliničnih raziskavah (QCT) (7, 13).

**Preglednica II:** Definicija osteoporoze na podlagi merjenja MKG z DXA (12).

MKG (T-vrednost)	Klasifikacija
0 do -1	normalno
-1 do -2,5	osteopenija
pod -2,5	osteoporoza
pod -2,5 + zlomi	huda osteoporoza

**Biokemični kazalci kostne premene** so uporabno orodje za študijo kostne premene. Uporabljajo se za spremljanje učinkovitosti in nadzor zdravljenja, saj lahko spremembe v njihovi koncentraciji zaznamo že po nekaj tednih terapije, medtem ko se spremembe v MKG pojavijo po 1-2 letih (7, 14). Delimo jih na kazalce kostne tvorbe (odražajo aktivnost osteoblastov) in kazalce kostne resorpcije (odražajo aktivnost osteoklastov) (14).

**Biokemični kazalci kostne tvorbe (15):**

- *Kostna alkalna fosfataza (BALP)* je specifičen produkt osteoblastov, ki ima pomembno vlogo pri tvorbi osteoida in mineralizaciji. Pri odraslih z normalno jetrno funkcijo predstavlja BALP 50% celokupne aktivnosti alkalne fosfataze v serumu.
- *Osteokalcin (OC)* je kalcij vezoči protein, ki ga sintetizirajo osteoblasti in sodeluje pri mineralizaciji kostnega tkiva. Je specifičen kazalec funkcije osteoblastov, njegova koncentracija v serumu pa je sorazmerna s stopnjo kostne tvorbe.

- *Propeptidi prokolagena tipa I* – C-terminalni propeptid prokolagena tipa I (PICP) in N-terminalni propeptid prokolagena tipa I (PINP) nastaneta po cepitvi molekule prokolagena tipa I do kolagena in odražata količino novo nastalega kolagena tipa I.

#### **Biokemični kazalci resorpcije kosti (15):**

- *Hidroksiprolin (HYP)* nastane s posttranslacijsko hidroksilacijo prolina in predstavlja 12-14% aminokislin, ki sestavljajo kolagen. Najdemo ga tudi v drugih tkivih (koža), zato je nespecifični kazalec razgradnje kolagena.
- *Glikozidi hidroksilizina* nastajajo med posttranslacijsko fazo sinteze kolagena. Znani sta dve obliki galaktozil hidroksilizin in glikozilgalaktozil hidroksilizin. Med razgradnjo kolagena se sproščajo v sistemski krvni obtok in nato v urin.
- *Piridinolin (PYD)* in *deoksimiridinolin (DPYD)* prečno povezujeta snope kolagenskih vlaken in tako stabilizirata molekule kolagena. Med fazo resorpcije kosti se izločata v sistemski krvni obtok in urin. Sta specifična za kostno tkivo in odražata razgradnjo zrelega kolagena.
- *C-terminalni (CTX)* in *N-terminalni (NTX) telopeptid* sta telopeptida kolagena tipa I, ki imata vezane še prečne povezovalce. Poznani sta dve obliki CTX, in sicer  $\alpha$ CTX in  $\beta$ CTX.  $\alpha$ CTX predstavlja razgradnjo na novo nastalega kolagena,  $\beta$ CTX razgradnjo starega kolagena, njuno razmerje  $\alpha$ CTX/ $\beta$ CTX pa je merilo hitrosti kostne premene.
- *Tartrat rezistentna kislja fosfataza (TRAP)* – znanih je šest izoencimov, v kosti prevladuje izoencim 5b, ki ga izločajo osteoklasti, zato je uporaben za oceno njihove aktivnosti.
- *Katepsin K* je proteazni encim, ki cepi verige kolagena tipa I. Izločajo ga osteoklasti med fazo resorpcije kosti
- *Kostni sialoprotein (BSP)* je glikoprotein, katerega sinteza poteka v osteoblastih in osteoklastom podobnih celicah. Povezan naj bi bil z aktivnostjo osteoklastov.

#### **Dejavniki, ki uravnavajo delovanje osteoblastov in osteoklastov**

RANKL in osteoprotegerin (OPG) sta proteina osteoblastov in lokalna dejavnika, ki uravnavata kostno premeno. OPG je receptor, ki veže RANKL in prepreči njegovo vezavo na RANK ter tako zavira osteoklastogenezo. Višja serumska koncentracija RANKL in nižja serumska koncentracija OPG sta pokazatelj pospešene osteoklastogeneze (16).

### 1.2.5 ZDRAVLJENJE

Za zdravljenje osteoporoze so na voljo učinkovine, ki zavirajo resorpcijo kosti ali učinkovine, ki spodbujajo tvorbo kosti ter tako povečajo MKG in preprečujejo (zmanjšajo tveganje za) osteoporozne zlome (*Preglednica III*). Osnovo vsakega zdravljenja osteoporoze in obvezen dodatek k terapiji osteoporoze predstavljata zadosten vnos kalcija (najmanj 1000mg/dan) in vitamina D (800 IU/dan). Poleg farmakoloških ukrepov pa je potrebno poskrbeti tudi za zdrav način življenja (fizična aktivnost, prenehanje s kajenjem, ustrezna prehrana) (7, 9).

*Preglednica III: Učinkovine za zdravljenje osteoporoze.*

Zaviralci resorpcije kosti	Spodbujevalci tvorbe kosti
hormonsko nadomestno zdravljenje	PTH
bisfosfonati	teriparatid
selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev	stroncijev ranelat
kalcitonin	
denosumab	

## 1.3 PPAR $\gamma$ (RECEPTOR, AKTIVIRAN S PROLIFERATORJEM PEROKSISOMOV $\gamma$ )

Receptori, aktivirani s proliferatorjem peroksisomov (PPAR; *ang. Peroxisome proliferator-activated receptor*), so transkripcijski faktorji, ki spadajo v družino jedrnih receptorjev in igrajo pomembno vlogo v metabolizmu glukoze in lipidov. Do danes so pri človeku poznani trije podtipi: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  in PPAR $\gamma$ . Najbolj proučevan je PPAR $\gamma$ , ki prevladuje v maščevju, kjer igra ključno vlogo pri uravnavanju adipogeneze ter tako sodeluje pri nadzoru energijskega ravnotežja in homeostazi lipidov in glukoze (17, 18).

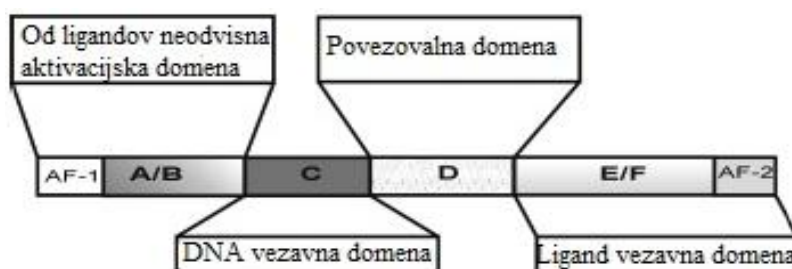
### 1.3.1 STRUKTURA PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  sestavljajo, podobno kot vse jedrne receptorje, štiri funkcijske domene (*Slika 1*):

- domena A/B (*ang. Ligand-independent activation domain*) z od ligandov neodvisno aktivacijsko funkcijo (AF-1) na N-terminalnem koncu,
- domena C ali vezavna domena za DNA (*ang. DNA binding domain*) z dvema cinkovima prstoma, ki sta odgovorna za vezavo PPAR $\gamma$  na promotorsko mesto tarčnega gena,



- domena D (*ang. Hinge domain*), ki povezuje domeno C in E/F, je tarča za vezavo kofaktorjev. Vsebuje zaporedje, ki ga prepoznajo transportni proteini, in določa prenos na novo sintetiziranih proteinov iz citoplazme do celičnega jedra,
- domena E/F ali vezavna domena za ligand (*ang. Ligand-binding domain*) na C-terminalnem delu je odgovorna za vezavo specifičnih ligandov na receptor in s tem za aktivacijo vezave PPAR $\gamma$  na odzivne elemente PPAR (PPRE; *ang. PPAR response elements*) v promotorski regiji tarčnega gena. Vsebuje fragment, imenovan od ligandov odvisna aktivacijska funkcija 2 (AF-2) (17).

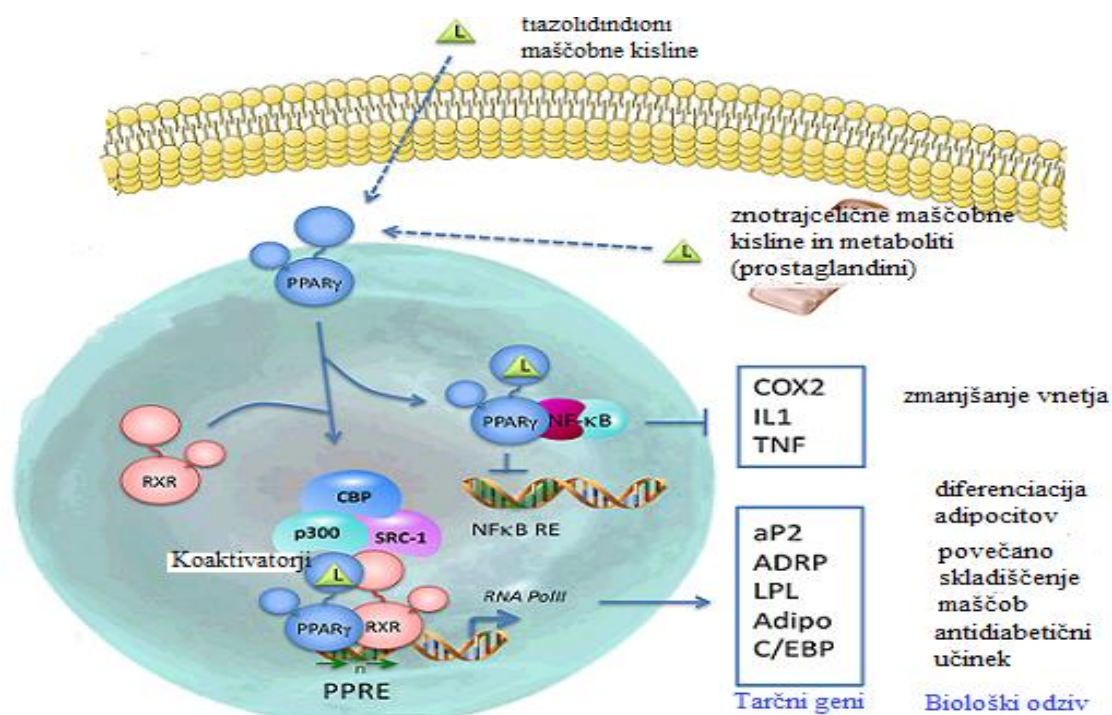


Slika 1: Struktura PPAR $\gamma$  (17).

PPAR $\gamma$  obstaja v obliki dveh proteinskih izoform, PPAR $\gamma$ 1 in PPAR $\gamma$ 2. PPAR $\gamma$ 2 ima na N-terminalnem koncu 28 dodatnih aminokislin, ki so kodirane z eksonom B in povečajo transkripcijsko aktivnost PPAR $\gamma$ 2 za 5-10 krat. Medtem ko je izoforma PPAR $\gamma$ 1 značilna za širok spekter tkiv, je PPAR $\gamma$ 2 omejena na maščobno tkivo (17).

### 1.3.2 MEHANIZEM DELOVANJA PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  tvori heterodimer z retinojskim receptorjem  $\alpha$  (RXR  $\alpha$ ; *ang. Retinoic X receptor  $\alpha$* ) in se veže na PPRE v regulatorni regiji tarčnih genov (19). PPRE so sestavljeni iz dveh ponovitev zaporedja AGGTCA, ki sta med seboj ločeni z enim nukleotidom. V neaktivnem stanju je PPAR $\gamma$  vezan na korepresor, ki aktivira histon-deacetilazo in s tem onemogoča transkripcijsko aktivnost jedrnega receptorja. Po vezavi liganda na kompleks PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ /korepresor se korepresor odcepi, hkrati pa se aktivirajo koaktivatorji (CBP/p300, SRC1) s histon-acetil-transferazno aktivnostjo, ki povzročijo dekonenzacijo kromatina. V naslednji fazi se aktivirani kompleks PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  veže na PPRE in aktivira transkripcijo tarčnega gena (17). Specifičnosti tarčnih genov ne določajo le lastnosti odzivnih elementov v promotorju, ampak tudi koaktivatorji, ki se vežejo na kompleks PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ , le-ti pa so odvisni od vezanega liganda (Slika 2) (19).



Slika 2: Prikaz signalnih poti PPAR $\gamma$  (20).

PPAR $\gamma$  aktivira širok spekter naravnih in sintetičnih ligandov. Med naravne ligande spadajo polinenasičene maščobne kisline (linolna kislina, arahidonska kislina), prostaglandin PGJ2 in njegovi derivati ter oksidirane maščobne kisline. Med sintetičnimi ligandi so najbolj znani tiazolidindioni (TZD), ki se uporabljajo v terapiji sladkorne bolezni tipa II (SBII) (17).

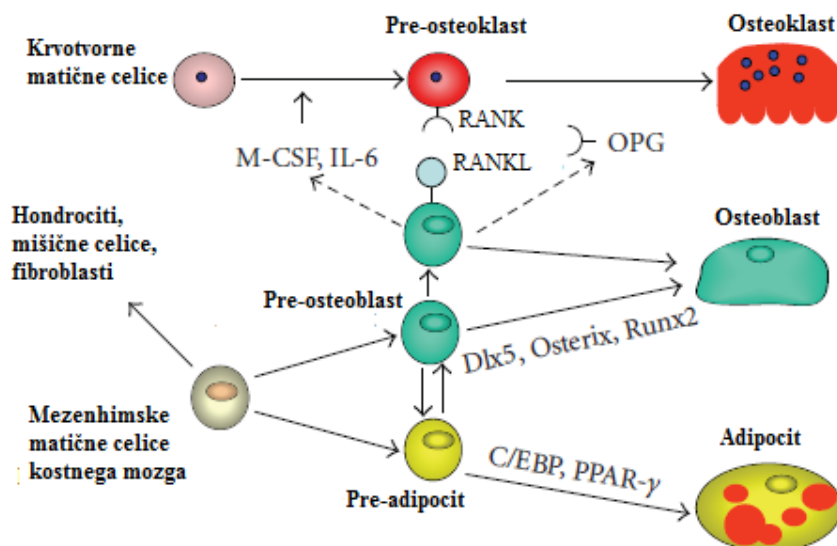
### 1.3.3 VLOGA PPAR $\gamma$ V TELESU

Raziskave so pokazale ključno vlogo PPAR $\gamma$  pri diferenciaciji adipocitov. Ektopično izražanje PPAR $\gamma$  pospeši adipogenezo v neadipogenih fibroblastnih celicah. Adipociti odrasle miši brez PPAR $\gamma$  umrejo v nekaj dneh, miši z izbitim genom za PPAR $\gamma$  pa ne zmorejo razviti maščobnega tkiva (17, 18). Poleg diferenciacije adipocitov ima PPAR $\gamma$  pomembno vlogo tudi pri vzdrževanju njihovih funkcij. Kot transkripcijski faktor tako inducira oz. aktivira izražanje številnih genov, ki vplivajo na fenotip adipocitov, kot npr. vezavni protein za maščobne kisline v adipocitih aP2, fosfoenolpiruvat-karboksikinaza, lipoproteinska lipaza, sintaza maščobnih kislin, acetilkoencim A-karboksilaza (17, 18, 21). PPAR $\gamma$  pa sodeluje tudi v različnih patoloških stanjih, kot so sladkorna bolezen tipa II, vnetje (aktivacija PPAR $\gamma$  zmanjša izražanje vnetnih citokinov TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), ateroskleroza in rakava obolenja. Tiazolidindioni, ki se uporabljajo v terapiji SBII, povečajo izražanje in aktivacijo PPAR $\gamma$ , kar zmanjša inzulinsko rezistenco in zniža nivo

glukoze pri bolnikih s SBII. Aktivacija PPAR $\gamma$  s TZD stimulira diferenciacijo adipocitov, in sicer se poveča število majhnih adipocitov, ki so bolj občutljivi na inzulin kot večji adipociti. Prav tako povečajo izražanje gena, ki kodira od inzulina odvisen glukozni transporter (GLUT4; *ang. Insulin-dependent glucose transporter*) in gena, ki kodira z c-Cb1 povezani protein (CAP; *ang. C-Cb1-associated protein*) (17, 18).

### 1.3.4 PPAR $\gamma$ IN OSTEOPOROZA

Osteoblasti in adipociti izhajajo iz skupnih MMC (3). V kostnem mozgu je usoda MMC odvisna od izražanja oz. aktivacije specifičnih transkripcijskih faktorjev, ki sprožijo diferenciacijo specifične linije celic. Za diferenciacijo v osteoblaste je potrebna aktivacija transkripcijskih faktorjev Runx2, osterix (OSX), Dlx5, za diferenciacijo v adipocite pa so potrebni transkripcijski faktorji iz družine C/EPB in PPAR $\gamma$  (21, 22) (Slika 3).



**Slika 3: Shematski prikaz razvoja kostnih celic in adipocitov (21).**

S starostjo se povečuje delež adipocitov v kostnem mozgu pri moških in ženskah, hkrati pa se zmanjšuje volumen trabekularne kostnine (23). Pri starostni osteoporozi je znižanje kostnega volumna povezano s povečanjem deleža adipoznega tkiva v kostnem mozgu (23, 24). Povečan delež adipocitov je pri bolnikih z osteoporozo obratno sorazmeren s hitrostjo tvorbe kosti (23).

Različne študije kažejo na pomembno vlogo PPAR $\gamma$  v uravnavanju kostne homeostaze in diferenciaciji MMC (22). PPAR $\gamma$  v kostnem mozgu aktivira diferenciacijo preadipocitov in zavira diferenciacijo preosteoblastov in tako uravnava ravnotežje med adipogenezo in osteoblastogenezo. Akune in sod. so pokazali, da imajo miši z znižano aktivnostjo PPAR $\gamma$

povečano kostno maso, ki je posledica povečane osteoblastogeneze in zmanjšane adipogeneze, pri tem pa je funkcija osteoblastov in osteoklastov normalna (24). Aktivacija PPAR $\gamma$ 2 izoforme v modelnih mišjih MMC z aplikacijo rosiglitazona vodi v pretvorbo celic osteoblastnega rodu v terminalno diferencirane adipocite preko inhibicije izražanja za osteoblaste specifičnih genov (22). Aplikacija rosiglitazona glodalcem aktivira PPAR $\gamma$  in povzroči zmanjšanje MKG ter volumna trabekularne kosti, poveča pa se delež adipocitov v kostnem mozgu (21, 22). Zaviranje tvorbe kosti je delno posledica inhibicije transkripcijskih faktorjev Runx2, OSX in Dlx5 (21).

Klinične študije na ljudeh poročajo o neželenih učinkih tiazolidindionov na kosti, in sicer o povečanem pojavu zlomov pri posameznikih na terapiji s tiazolidindioni. Študije kažejo, da povzročijo zmanjšanje tvorbe kosti in s tem pospešijo izgubo kostne mase pri zdravih posameznikih in pri bolnikih s SBII, ter tako povečajo tveganje za zlome (25).

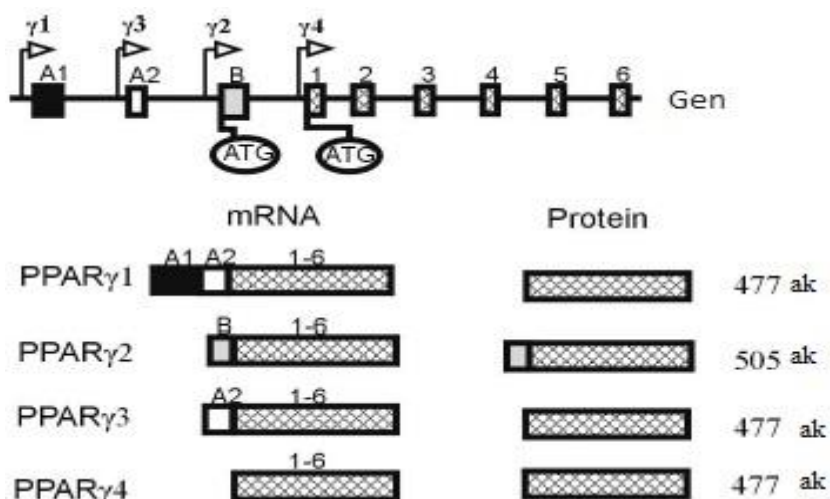
### 1.3.5 GEN ZA PPARG

Gen PPARG se pri ljudeh nahaja na kromosomu 3 na poziciji 3p25 (17). Gen, ki ga sestavlja devet eksonov (A1, A2, B, eksoni 1-6) in štirje promotorji, kodira dve proteinski izoformi, PPAR $\gamma$ 1 in PPAR $\gamma$ 2, ter štiri različne mRNA (PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3, PPAR $\gamma$ 4), ki so posledica uporabe različnih promotorjev in različnega izrezovanja mRNA (23) (Slika 4).

#### 1.3.5.1 ZNANI POLIMORFIZMI V GENU PPARG IN NJIHOV KLINIČNI POMEN

V okviru genetskih študij pri ljudeh so odkrili veliko polimorfizmov v genu PPARG, ki so jih raziskovali v povezavi z različnimi boleznimi. Najpogosteje so preiskovali njihovo vlogo v debelosti, SBII in metabolnem sindromu (19).

Najpogosteje analizirani polimorfizem je Pro12Ala (C→G; rs1801282), ki se nahaja v eksonu B in je tako specifičen za izoformo PPAR $\gamma$ 2 (19, 26). Gre za mutacijo s spremenjenim pomenom, kjer pride do zamenjava C (citozina) za G (gvanin), posledica pa je sprememba aminokislina (prolin v alanin). Pokazali so, da prisotnost alela Ala zmanjša afiniteto PPAR $\gamma$ 2 za vezavo na PPARE in transkripcijsko aktivnost tako v prisotnosti kot odsotnosti PPAR $\gamma$  agonistov. Različne študije povezujejo alel Ala s povečano zaščito pred SBII, z zmanjšano incidenco srčno-žilnih obolenj in dovzetnostjo za kolorektalni rak (19).



Slika 4: Shema genomske strukture človeškega gena *PPARG* (17).

Naslednji pogosto preiskovani polimorfizem je His477His (161C>T; rs3856806) v eksonu 6 gena *PPARG*. JPOS študija na Japonski populaciji je pokazala povezavo polimorfizma z nizko maksimalno kostno maso (27).

Med nedavno odkrite polimorfizme v promotorju *PPAR $\gamma$ 2* spada polimorfizem -2957A>G (A→G, rs12497191), ki se nahaja v vezavnem mestu za transkripcijski represor  $\delta$ EF1. Muller in sod., ki so polimorfizem poimenovali -2821C>T, so z *in vitro* študijami so pokazali, da alel -2957A poveča transkripcijo gena *PPARG*. Polimorfizem povezujejo s SBII in debelostjo pri Pima Indijancih (28).

## 2 NAMEN DELA

Osteoporoza je presnovna bolezen kosti, na razvoj katere vplivajo tako okoljski kot genetski dejavniki. Številne raziskave so pokazale, da je okoli 85% sprememb v MKG gensko pogojenih, zato je veliko raziskav usmerjenih v proučevanje kandidatnih genov, katerih produkti sodelujejo v presnovi kosti. Eden izmed kandidatnih genov je tudi gen, ki kodira protein PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  je transkripcijski dejavnik, za katerega je znano, da ima pomembno vlogo pri regulaciji adipogeneze in lipidne presnove. Raziskave so pokazale, da PPAR $\gamma$  v kostnem mozgu aktivira diferenciacijo preadipocitov in istočasno zavira diferenciacijo preosteoblastov ter uravnava ravnotežje med adipogenezo in osteoblastogenezo in tako sodeluje tudi v uravnavanju kostne mase. Prevelika aktivnost PPAR $\gamma$  bi lahko vodila v zmanjšano število osteoblastov in osteoporozo.

Namen diplomske naloge je določiti pogostost polimorfizmov v promotorju (-2957A>G) in eksonu B (Pro12Ala) v genu PPARG ter njunih haplotipov in ugotoviti njihovo povezanost z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene. Ugotoviti bomo poskušali tudi njihov vpliv na odzivnost zdravljenja z alendronatom in raloksifenom ter vpliv na tveganje za pojav nizkoenergijskega zloma.

V ta namen bomo:

- v raziskavo vključili 734 preiskovancev, ki jim je bila odvzeta kri in izmerjene vrednosti biokemičnih kazalcev in izmerjena MKG
- z reakcijo PCR v realnem času in z uporabo TaqMan<sup>®</sup> sond preverili prisotnost polimorfizma Pro12Ala in določili genotipe priskovancev
- z analizo talilnih krivulj visoke ločljivosti (HRM) preverili prisotnost polimorfizma v promotorju gena za PPAR $\gamma$  (-2957A>G) in določili genotipe priskovancev
- s pomočjo programa PHASE predvidevali pare haplotipov za polimorfizma
- statistično ovrednotili podatke in ugotovili ali polimorfizma Pro12Ala, -2957A>G v genu PPARG ter njuni haplotipi vplivajo na MKG, biokemični kazalci kostne premene, odzivnost na zdravljenje z alendronatom in raloksifenom ter na tveganje za pojav nizkoenergijskega zloma

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SPLOŠNA OPOZORILA

Naše delo je temeljilo na metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki je zelo specifična in občutljiva, zato je potrebna posebna pazljivost pri delu, da se izognemo kontaminaciji. Potrebna je prostorska ločitev stopenj dela (prostor za pripravo vzorcev, prostor pre- in post-PCR). Tako smo reakcijsko zmes za PCR reakcijo pripravljali v najčistejšem območju (prostor pre-PCR) v delovni komori. Delovno komoro in delovni pribor smo predhodno očistili s 3% natrijevim hipokloritom in vse skupaj še 25 min osvetljevali z UV-svetlobo. Plastične epruvete in nastavke za pipete za enkratno uporabo smo avtoklavirali 21 min pri temperaturi 121°C in nadtlaku 1 bar (avtoklav A-21 Kambič) . Pri delu smo uporabljali ultračisto vodo (bidestilirana, avtoklavirana, pripravljena z aparatom ELGA PureLab Classic), čiste rokavice za enkratno uporabo in svežo haljo.

#### 3.2 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 734 preiskovancev iz različnih slovenskih centrov. Glede na spol, menopavzni status, diagnozo in terapijo smo jih razdelili v naslednje skupine:

- moški preiskovanci (N=117)
- premenopavzne preiskovanke (N=59)
- pomenopavzne preiskovanke (N=478):
  - zdrave preiskovanke (N=233)
  - osteoporozne preiskovanke (N=245)
- pomenopavzne osteoporozne preiskovanke, ki so se zdravile z:
  - alendronatom (N=53)
  - raloksifenom (N=56)
- preiskovanci, ki so utrpeli nizkoenergijski zlom (N=110)

Preiskovancem so odvzeli kri (za določitev koncentracije biokemičnih kazalcev kostne premene in analizo DNA), izmerili višino, telesno maso in izračunali ITM (indeks telesne mase). Z metodo DXA so jim izmerili MKG na področju vratu stegenice (*ang. femoral neck bone mineral density; MKG<sub>fn</sub>*), kolka (*ang. total hip bone mineral density; MKG<sub>tot</sub>*) in ledvenih vretenc (*ang. lumbar spine bone mineral density; MKG<sub>ls</sub>*). Na osnovi kriterijev SZO ter izmerjenih vrednosti MKG so preiskovancem postavili diagnozo.

Prav tako so jim izmerili biokemične kazalce kostne premene, in sicer RANKL, OPG, OC, CTX, BALP, DPYR in katepsin K. Testi za merjenje koncentracij posameznih biokemičnih kazalcev so podrobneje opisani v diplomski nalogi Luke Kurenta v poglavju 3.1 (30). Po začetnem merjenju MKG so 53 pomenopavznih preiskovank z osteoporozo začeli zdraviti z alendronatom (v odmerku 10 mg dnevno) in 56 pomenopavznih preiskovank z osteoporozo z raloksifenom (v odmerku 60 mg dnevno). Poleg tega so preiskovanke jemale tudi kalcij (500 mg dnevno ob terapiji z alendronatom in 1000 mg dnevno ob terapiji z raloksifenom) ter vitamin D (500 IU dnevno ob terapiji z alendronatom in 400 IU dnevno ob terapiji z raloksifenom). Po enem letu so preiskovankam ponovno izmerili MKG in vrednosti biokemičnih kazalcev kostne premene.

### **3.3 PRIPRAVA RAZTOPIN VZORČNIH DNA**

Genomska DNA je bila predhodno izolirana iz levkocitov periferne venske krvi z metodo izoliranja po Millerju. Iz osnovnih nerazredčenih raztopin smo najprej pripravili t.i. delovne raztopine, tako da smo redčili osnovne raztopine v razmerju 1:10 (5 $\mu$ l osnovne raztopine DNA + 45 $\mu$ l pufera tris-HCl). Za redčenje smo uporabili pufer tris-HCl (Buffer FG3 iz kompleta FlexiGene DNA Kit) s pH 8,5. Delovnim raztopinam smo izmerili koncentracije s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000, ki omogoča merjenje koncentracije nukleinskih kislin in proteinov v vzorcih z volumnom vsaj 1 $\mu$ l. Tako pripravljene delovne raztopine smo na osnovi izmerjenih koncentracij redčili do končne koncentracije 10 ng/ $\mu$ l. Končne raztopine vzorčnih DNA smo pripravili v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami. V prvo vdolbinico vsake ploščice smo odpipetirali le pufer tris-HCl, ki je služil kot negativna kontrola.

#### REAGENTI

- pufer tris-HCl (Buffer FG3, FlexiGene DNA Kit, QIAGEN, Düsseldorf, Nemčija)
- osnovne raztopina vzorčnih DNA
- ultračista voda

#### APARATURE IN PRIBOR:

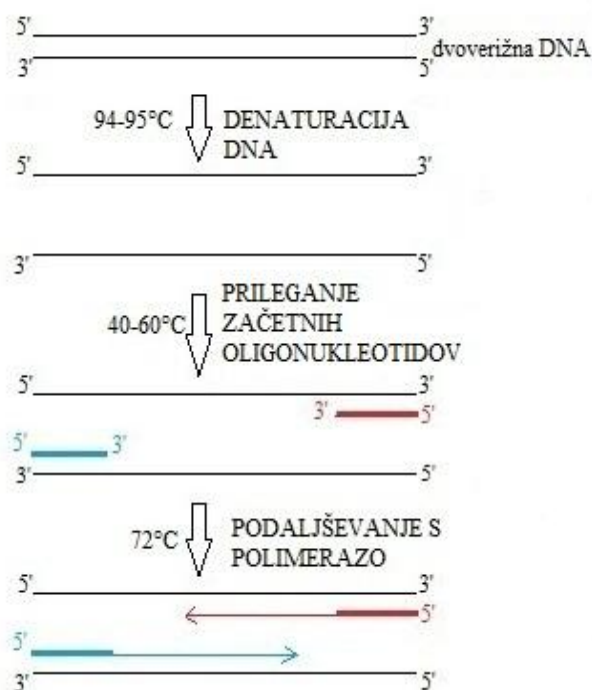
- polavtomatske pipete za različne volumne (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 0,5 in 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete brez filtra (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)



- mini centrifuga/vortex CombiSpin FVL-2400N (Biosan, Riga, Latvija)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA)

### 3.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, *ang. polymerase chain reaction*) je *in vitro* metoda, ki omogoča sintezo velikega števila kopij tarčnega odseka DNA v kratkem času. Reakcijsko zmes za PCR sestavljajo matrična DNA, dva začetna oligonukleotida, deoksinukleozidtrifosfati (dNTP), ki so gradniki nove verige,  $Mg^{2+}$  ioni, reakcijski pufer in termostabilna



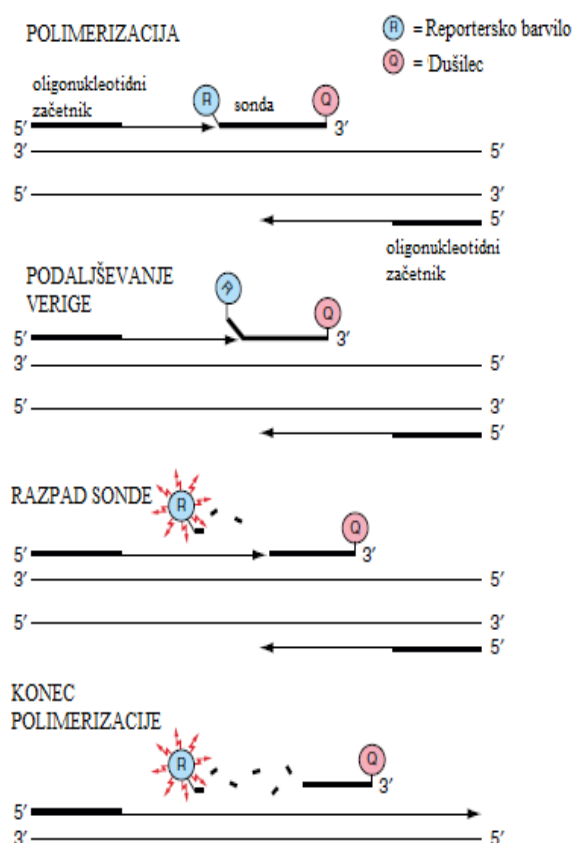
DNA-polimeraza. Reakcija poteka ciklično (ponavadi 20-40 ciklov) (31, 32). Posamezni cikel je sestavljen iz treh stopenj (*Slika 5*). Teoretično se v vsakem ciklu število kopij želenega odseka podvoji, vendar pa se v poznejših ciklih reakcija postopno upočasnjuje, dokler ne doseže platoja in število kopij produktov ne narašča več eksponentno kot v začetnih ciklih. Do upočasnitve reakcije pride zaradi kopičenja inhibitornih produktov, porabe reakcijske zmesi in manjše aktivnosti DNA-polimeraze (31, 32).

*Slika 5: Shematski prikaz enega cikla verižne reakcije s polimerazo.*

#### 3.4.1 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

PCR v realnem času ali kvantitativni PCR (qPCR) predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR, saj omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Pomnoževanje in detekcija produktov PCR potekata sočasno. Detekcija temelji na merjenju fluorescence (32). Spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči merjenje nastalega produkta v eksponentni fazi PCR reakcije, ko lahko iz količine produkta PCR zanesljivo sklepamo na začetno število kopij matrice v vzorcu (31).

Poznamo več načinov za detekcijo produktov PCR v realnem času, ki jih lahko razdelimo v nespecifične in specifične načine detekcije. Med **nespecifične** načine detekcije spadajo fluorescentna barvila (etidijev bromid, SYBR Green I), ki imajo v prosti obliki barvila nezaznavno fluorescenco. Barvila se nespecifično vgradijo v dvovertično DNA in začnejo po ekscitaciji močno fluorescirati, pri čemer je jakost fluorescence sorazmerna s količino nastale dvovertične DNA (31).



Slika 6: Detekcija produktov PCR s hidrolizirajočimi sondami (33).

#### Uporaba hidrolizirajočih sond TaqMan<sup>®</sup> za alelnu diskriminacijo

Vsaka sonda TaqMan<sup>®</sup> je sestavljena iz:

- reporterskega barvila na 5' koncu; barvili FAM in VIC emitirata svetlobo pri različnih valovnih dolžinah (FAM pri 465-510nm, VIC pri 533-580nm), kar nam omogoča alelnu diskriminacijo
- MGB molekule (*ang: minor groove binder*), ki poveča temperaturo tališča ( $T_m$ ) pri določeni dolžini sonde, kar omogoča oblikovanje krajših sond,
- dušilca na 3' koncu.

Pri **specifičnih** načinih detekcije uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide (sonde), ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Detekcija je osnovana na dveh fluoroforih (donorski in akceptorski), katerih ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata. Ko sta dovolj blizu, povzroči vzdraženje donorskega barvila emisijo svetlobe, ki vzdraži akceptorsko barvilo, to pa emitira svetlobo drugačne valovne dolžine. Lahko pa kot akceptor uporabimo molekulo, ki absorbira svetlobo donorske molekule, sama pa ne fluorescira. Glede na tip sonde ločimo hidrolizirajoče sonde (Slika 6), hibridizacijske sonde in molekularna svetila (31, 32).

Za alelnu diskriminacijo enega polimorfizma je potreben par oligonukleotidnih začetnikov in dve TaqMan<sup>®</sup> sondi. Sonde se razlikujeta po reporterskem barvilu vezanem na 5' koncu (barvilo VIC ali FAM) in v enem baznem paru, tako da ustreza ena sonda nemutiranemu zaporedju, druga pa mutiranemu zaporedju. Na 3' koncu imata obe vezan dušilec. Ko sta sonde intaktni, dušilec prepreči fluorescenco reporterskega barvila. Med podvojevanjem Taq DNA-polimeraza cepi sondo, ki je vezana na tarčno zaporedje, pri tem pride do porasta fluorescence reporterskega barvila, saj se poveča se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem (33).

### 3.5 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA Pro12Ala

Vzorčne raztopine DNA smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi 4°C, reagente pa v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C. Pred uporabo smo reagente odmrznili in jih dobro premešali ter na kratko centrifugirali. TaqMan<sup>®</sup> sonde smo pred svetlobo zaščitili z aluminijasto folijo in jih odmrznili tik pred uporabo. V PCR komori smo pripravili reakcijsko zmes (sestava je podana v Preglednica IV) brez dodatka vzorcev DNA, jo premešali in nanесли na mikrotitrsko ploščico (384). Z multikanalno pipeto smo nanесли vzorce DNA. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili z optično lepljivo folijo in jo centrifugirali pri 2100 obratih/min 5 minut.

**Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo polimorfizma Pro12Ala.**

Reagent	Volumen (µl) za en vzorec
5x HOT FIREPol <sup>®</sup> Probe qPCR Mix Plus (no ROX)	1,2
20x TaqMan <sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay Mix*	0,3
ultračista voda	1,65
vzorec DNA (c=3ng/ µl)	2,85
<b>Končni volumen</b>	<b>6</b>

Ploščico smo nato prenesli v ciklični pomnoževalnik Light Cycler<sup>®</sup> 480 Real-time PCR system, kjer je potekalo pomnoževanje in detekcija produktov pod reakcijskimi pogoji, opisanimi v Preglednica V.

**Preglednica V: Pogoji PCR v realnem času.**

Stopnja PCR	Temperatura	Čas
začetna denaturacija	95°C	15 min
denaturacija	90°C	20 s
prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje	60°C	90 s

## REAGENTI

- 5x HOT FIREPol<sup>®</sup> Probe qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonija), ki vsebuje HOT FIREPol<sup>®</sup> DNA-polimerazo, 5x Probe qPCR pufer, 15mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP, brez pasivne reference (ROX)
- 20x TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay Mix, C\_1129864\_10 (Applied Biosystems, Carlsbad, ZDA), ki vsebuje neozančena začetna oligonukleotida in TaqMan<sup>®</sup> MGB sonde (ena označena z barvilom VIC<sup>®</sup> in ena s FAM<sup>™</sup>)
- ultračista voda
- vzorčne raztopine DNA

## APARATURE IN PRIBOR

- polavtomatske pipete za različne volumne (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- polavtomatska 12-kanalna pipeta (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 0,5 in 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete brez filtra (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- sterilni nastavki za pipete s filtrom (do 10 µL) (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- mikrotitrne ploščice s 384 vdolbnicami (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija)
- optična lepljiva folija (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija)
- delovna komora z UV-lučko (Krom, Ljubljana, Slovenija)
- mini centrifuga/vortex CombiSpin FVL-2400N (Biosan, Riga, Latvija)
- ciklični pomnoževalnik LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-time PCR systems (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija)
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

### **3.6 ANALIZA TALILNIH KRIVULJ VISOKE LOČLJIVOSTI**

Analiza talilnih krivulj visoke ločljivosti (HRM, *ang. high resolution melting*) je enostavna post-PCR metoda za genotipizacijo znanih polimorfizmov in odkrivanje novih variacij. Princip HRM temelji na pomnoževanju tarčnega zaporedja v prisotnosti interkalirajočih fluorescenčnih barvil (npr. LCGreen<sup>®</sup>), ki se vgradijo v dvojno verigo po celotni dolžini produkta PCR in tudi v visokih koncentracijah ne inhibirajo reakcije. Prosta barvila imajo nizko fluorescenco, po vgraditvi v dvovertično DNA pa močno fluorescirajo. Pomnoževanju s PCR sledi denaturacija in hitra renaturacija produktov PCR, pri čemer

pride do navzkrižnega kombiniranja enoverižnih DNA. Sledi počasno dviganje temperature, pri tem pride do denaturacije dvoverižne DNA v enoverižno in s tem do padca fluorescence. Z merjenjem fluorescence v odvisnosti od temperature dobimo talilno krivuljo. Temperaturna stabilnost PCR produkta je določena z njegovim zaporedjem (vsebnost GC območja, dolžina). Posledica spremembe nukleotidnega zaporedja je sprememba v stabilnosti in drugačen talilni profil. Zaradi razlik v obliki in položaju talilnih krivulj je razlikovanje med homozigoti in heterozigoti enostavno. V primeru heterozigota nastanejo pri hitri renaturaciji homodupleksi (komplementarni verigi) in heterodupleksi (verigi se ne ujemata). Zaradi neujemanja verig se heterodupleksi talijo pri nižji temperaturi kot homodupleksi. Talilna krivulja heterozigota je tako kombinacija talilnih profilov homo- in heterodupleksov. Razlikovanje nemutiranih in mutiranih homozigotov na podlagi talilne krivulje pa je v nekaterih primerih, ko so talilne krivulje podobnih oblik, težje. Pomagamo si s t.i. spikingom, kjer k neznanim homozigotom po opravljeni analizi HRM dodamo določeno količino (10-20% volumna reakcijske zmesi) produkta PCR znanega nemutiranega homozigota, čemur sledi še druga analiza HRM (35, 36).

### 3.6.1 GENOTIPIZACIJA -2957A>G

Vzorčne raztopine DNA in MasterMix smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi +4°C, ostale reagente pa v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C.

Reakcijsko zmes smo najprej optimizirali. Po optimizaciji smo jo pripravljali brez dodatka vzorcev DNA po sestavi, ki je podana v *Preglednici VI*.

***Preglednica VI: Optimirana sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo polimorfizma -2957A>G.***

Reagent	Volumen (µl) za en vzorec
Master Mix, 2x konc.	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2
istosmerni začetni oligonukleotid (10 µM)	0,2
obratnosmerni začetni oligonukleotid (10 µM)	0,2
ultračista voda	2,4
vzorec DNA (c=10ng/µl)	1
<b>Končni volumen</b>	<b>10</b>

Pripravljeno reakcijsko zmes brez vzorcev DNA smo razdelili v vdolbinice na mikrotitrsko ploščico (384). Z multikanalno polavtomatsko pipeto smo v vdolbinice z reakcijsko zmesjo odpipetirali še vzorčne raztopine DNA. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili z optično

lepljivo folijo in centrifugirali pri 2100 obratih/min 5 minut in prenesli v ciklični pomnoževalnik Light Cycler<sup>®</sup> 480 Real-time PCR system, kjer je potekalo pomnoževanje in analiza HRM pod reakcijskimi pogoji, opisanimi v *Preglednici VII*.

***Preglednica VII: Pogoji PCR v realnem času in analize HRM.***

Stopnja		Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
<b>preinkubacija</b>		95	10 min	1
<b>pomnoževanje</b>	začetna denaturacija	95	10 s	50
	prileganje začetnih oligonukleotidov	65-55 (0,5°C/cikel)	15s	
	podaljševanje	72	10 s	
<b>HRM</b>	začetna denaturacija	95	1 min	
	renaturacija	40	1 min	
	talilni interval	70-90		1
<b>hlajenje</b>		40	10 s	1

S pomočjo programske opreme LightCycler<sup>®</sup> 480 Gene Scanning smo analizirali dobljene talilne krivulje in določili genotipe.

Za razlikovanje mutiranih in nemutiranih homozigotov smo vsem homozigotom dodali produkt PCR znanega nemutiranega homozigota (referenčni vzorec, nukleotidno zaporedje določeno s sekvenciranjem). V ta namen smo pri vsaki analizi poleg neznanih vzorcev pomnožili tudi ustrezno količino referenčnega vzorca. Mikrotitrsko ploščico (384) smo vzeli iz cikličnega pomnoževalnika in jo prenesli v post-PCR prostor, kjer smo odlepili optično folijo in k vsem homozigotom dodali 2 µl produkta PCR referenčnega vzorca. Ploščico smo pokrili z novo optično folijo, jo centrifugirali pri 2100 obratih/min, 5 minut in prenesli v ciklični pomnoževalnik Light Cycler<sup>®</sup> 480 Real-time PCR system, kjer smo ponovili stopnji HRM in hlajenje, katerih pogoji so opisani v *Preglednici VII*.

#### REAGENTI

- LightCycler<sup>®</sup> 480 High Resolution Master (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija):
  - Master Mix (2x konc.), ki ga sestavljajo FastStart Taq DNA-polimeraza, reakcijski pufer, dNTP (namesto dTTP vsebuje dUTP) in HRM barvilo
  - MgCl<sub>2</sub> (25mM)
  - ultračista voda

- raztopina oligonukleotidnih začetnikov (Sigma-Aldrich, St. Luis, ZDA):
  - istosmerni oligonukleotidni začetnik (PPARG2\_F),  $T_m=63,4$ ; nukleotidno zaporedje: 5'-ACCCTTCTGTCTCCAAAGTCC-3'
  - obratnosmerni oligonukleotidni začetnik (PPARG2\_R),  $T_m=60,4$ ; nukleotidno zaporedje: 5'-TACAGAGTGAGGAGGAGTGGT-3'

#### APARATURE IN PRIBOR

Glej APARATURE IN PRIBOR v poglavju 3.5

### **3.7 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA**

Visoko avtomatizirana metoda sekveneciranja po Sangerju za določanje nukleotidnega zaporedja temelji na modificirani PCR reakciji. Reakcijska zmes za razliko od klasične reakcije PCR vsebuje le en začetni oligonukleotid (pomnožuje se ena veriga) in dodatne dideksinukleotide (ddNTP), označene s štirimi različnimi fluorescenčnimi barvili. Po vstavitvi ddNTP v nastajajočo verigo se sinteza DNA prekine, saj ddNTP nima 3'-OH skupine na deoksiribozi. Ta proces se večkrat ponovi, pri tem pa nastane zmes različno dolgih fragmentov DNA, ki se vsi začnejo z enakim 5' koncem in končajo z ustreznim ddNTP na 3' koncu. Sledi ločevanje različno dolgih fragmentov s kapilarno elektroforezo in določitev fluoroforov, kar omogoča določitev nukleotidnega zaporedja (32).

#### **3.7.1 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA DNA IN ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR**

##### **3.7.1.1 REAKCIJA PCR**

Za potrjevanje genotipov polimorfizma -2957A>G, dobljenih na podlagi talilnih krivulj, smo na izbranih vzorcih (predstavniki različnih talilnih krivulj) določili nukleotidno zaporedje. Najprej smo s PCR reakcijo pomnožili 133 baznih parov dolg fragment DNA. Sestava reakcijske zmesi je podana v *Preglednici VIII*. Vse komponente reakcijske zmesi, razen Taq polimeraze, smo dobro premešali in centrifugirali.

Pripravljenemu reakcijsko zmes brez vzorca DNA smo razdelili v predhodno označene plastične epruvete s pokrovčkom. Nato smo dodali še vzorce DNA, jih premešali in centrifugirali ter dali v ciklični termostat, kjer je potekalo pomnoževanje tarčnega odseka (*Preglednica IX*). Vsak vzorec smo pripravili v dvojniku, po končanem pomnoževanju smo obe reakcijski zmesi združili.

**Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za reakcijo PCR.**

Reagent	Volumen ( $\mu$ l) za eno reakcijo
ultračista voda	17,15
10x pufer Gold	3,00
dNTP (2 mM)	3,00
istosmerni začetni oligonukleotid (10 $\mu$ m)	0,60
obratnosmerni začetni oligonukleotid (10 $\mu$ m)	0,60
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,00
5 U/ $\mu$ l Taq-polimeraza	0,15
vzorec DNA (c=10 ng/ $\mu$ l)	2,50
<b>Končni volumen</b>	<b>30</b>

**Preglednica IX: Pogoji reakcije PCR za pomnoževanje tarčnega DNA odseka.**

Stopnja	Temperatura (°C)	Čas
začetna denaturacija	95	10 min
denaturacija	95	20 s
prileganje začetnih oligonukleotidov	57	30 s
podaljševanje	72	30 s
končno podaljševanje	72	7 min
prekinitev reakcije	8	$\infty$

} 36 ciklov

**REAGENTI**

- ultračista voda
- raztopina dNTP, 2mM
- 25mM raztopina MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, Carlsbad, ZDA)
- 10x PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, Carlsbad, ZDA)
- AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polymerase, 5U/ $\mu$ l (Applied Biosystems, Carlsbad, ZDA)
- raztopina oligonukleotidnih začetnikov: glej REAGENTI v poglavju 3.6.1.

**APARATURE IN PRIBOR**

- polavtomatske pipete za različne volumne (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 0,5 in 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete brez filtra (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- delovna komora z UV-lučko (Krom, Ljubljana, Slovenija)
- mini centrifuga/vortex CombiSpin FVL-2400N (Biosan, Riga, Latvija)



- ciklični termostat MWG AG Biotech Primus 96<sup>Plus</sup> (MWG-Biotech, Ebersberg, Nemčija)

### 3.7.1.2 PREGLED USPEŠNOSTI REAKCIJE PCR NA AGAROZNEM GELU

Z agarozno elektroforezo smo preverili ali so v vseh epruветah nastali produkti, če je prišlo do nespecifičnega pomnoževanja ali do kontaminacije (slepi vzorec).

Ločevanje produktov PCR smo izvajali na 2% agaroznem gelu, na katerem smo jih detektirali s pomočjo interkalirajočega fluorescenčnega barvila SYBR<sup>®</sup> Safe. Pri pripravi 2% agaroznega gela in elektroforezni ločbi smo sledili navodilom in pogojem, opisanim v diplomski nalogi Tine Žuran v poglavju 3.5.3 (37), le da smo v našem primeru uporabili barvilo SYBR<sup>®</sup> Safe (7 $\mu$ l) in ne etidijevega bromida, ki je kancerogen. Elektroforeza je potekala 20 min pri konstantni napetosti 100V. Po končani elektroforezi smo gel prenesli v G:BOX sistem za detekcijo in analizo gelov (Syngene, Cambridge, Velika Britanija), kjer smo ga osvetlili z UV-svetlobo in tako detektirali ter fotografirali rezultate elektroforezne ločbe.

### 3.7.1.3 ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR

V naslednji fazi smo očistili dobljene produkte PCR s pomočjo GenElute<sup>™</sup> PCR Clean-Up Kit-a po navodilih proizvajalca (39). Odstranili smo komponente reakcije PCR, kot so prebitni začetni oligonukleotidi, nukleotidi, DNA polimeraza in soli, ki bi lahko motile določanje nukleotidnega zaporedja.

## 3.7.2 PRIPRAVA PRODUKTOV PCR ZA SEKVENCIRANJE

### 3.7.2.1 PRIPRAVA SEKVENČNE REAKCIJE

V PCR komori smo pripravili dve reakcijski zmesi brez dodatka produktov PCR, v eno smo dodali istosmerni in v drugo obratnosmerni začetni oligonukleotid. Pred pripravo reakcijske zmesi smo vse sestavine temeljito premešali in jih centrifugirali. Pripravljeni reakcijski zmesi (*Preglednica X*) brez dodanih PCR produktov smo dobro premešali in nato razdelili v 0,2 ml ustrezno označene plastične epruvete s pokrovčkom. Plastične epruvete z reakcijsko zmesjo smo prenesli v post-PCR prostor, kjer smo v vsako epruveto dodali pripravljene raztopine očiščenih produktov PCR ( $c = 2\text{ ng}/\mu\text{l}$ ).

**Preglednica X: Sestava reakcijske zmesi.**

Reagent	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) za eno reakcijo
visoko prečiščena voda	5,71
istosmerni ali obratnosmerni začetni oligonukleotid ( $5\mu\text{M}$ )	0,64
DTCS Quick Start MasterMix	2,00
PCR produkti ( $2\text{ng}/\mu\text{l}$ )	1,65
<b>Končni volumen</b>	<b>10,00</b>

Epruvete smo nato dobro premešali in centrifugirali ter jih dali v ciklični termostat. Za vsak vzorec smo v eni epruveti pomnožili pozitivno (s pomočjo istosmernega začetnega oligonukleotida) in v drugi negativno verigo (s pomočjo obratnosmernega začetnega oligonukleotida) produkta PCR. Pogoji reakcije PCR so podani v *Preglednici XI*.

**Preglednica XI: Pogoji PCR reakcije.**

Stopnja	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas
denaturacija	96	20 s
prileganje oligonukleotidnih začetnikov	57	20 s
podaljševanje	60	4 min
prekinitev reakcije	8	$\infty$

**REAGENTI**

- ultračista voda
- Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, Brea, ZDA):
  - dATP, dCTP, dTTP, dITP
  - ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP (WellRED label)
  - Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, reakcijski pufer - pH 8,9
  - Thermo Sequenase DNA Polymerase, pirofosfataza
- raztopina oligonukleotidnih začetnikov: glej REAGENTI v poglavju 3.6.1.

**APARATURE IN PRIBOR**

Glej APARATURE IN PRIBOR v poglavju 3.7.1.1.

**3.7.2.2 ETANOLNO OBARJANJE**

Sekvenčni reakciji je sledilo čiščenje produktov PCR z etanolnim obarjanjem. Najprej smo pripravili raztopino STOP (*Preglednica XII*) in jo razdelili v ustrezno označene plastične epruvete s pokrovčkom.

**Preglednica XII: Sestava raztopine STOP.**

Reagent	Volumen ( $\mu$ l) za en vzorec
3 M Na acetat (pH 5,2)	2
100 mM Na <sub>2</sub> -EDTA (pH 8,0)	2
20mg/ml glikogen	1
<b>Končni volumen</b>	<b>5</b>

Nato smo v epruvete prenesli celotni volumen sekvenčne reakcije in dobro premešali. Tej zmesi smo dodali 60  $\mu$ l 95% (v/v) raztopine etanola, ki smo ga vzeli iz zamrzovalnika (-20°C) tik pred uporabo, temeljito premešali in centrifugirali 15 min pri 14000 obratov/min in 4°C. Supernatant smo s pomočjo pipete previdno odstranili, pelete pa sprali še dvakrat z 200  $\mu$ l 70% (v/v) raztopine etanola, ki smo ga tik pred uporabo vzeli iz zamrzovalnika (-20°C). Po vsakem dodatku etanola, smo zmes centrifugirali najmanj 2 min pri 14000 obratov/min in 4°C. Pelete smo sušili na sobni temperaturi približno 20 min in nato resuspendirali v 40  $\mu$ l Sample loading solution.

REAGENTI

- ultračista voda
- 3 M Na acetat pH 5,2 (Sigma Aldrich, St. Luis, ZDA)
- 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA pH 8,0 – pripravljen iz 0,5 M Na<sub>2</sub>-EDTA (Sigma Aldrich, St. Luis, ZDA)
- 70 % (v/v) raztopina etanola, 95 % (v/v) raztopina etanola
- Genome Lab™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (Beckman Coulter, Brea, ZDA): glikogen (20 mg/ml), Sample loading solution

APARATURE IN PRIBOR

- polavtomatske pipete za različne volumne (Eppendorf)
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 0,5 in 1,5 ml (Sarstedt)
- avtoklavirani nastavki za pipete brez filtra (Sarstedt)
- mini centrifuga/vortex CombiSpin FVL-2400N (Biosan)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf)

## 3.7.2.3 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Resuspendirane vzorce smo prenesli na mikrotitrsko ploščico (96 vdolbinic). Vsak vzorec smo pokrili z eno kapljico mineralnega olja in analizirali s sistemom GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis (Beckman Coulter) s programom *Short PCR method*. Pogoji reakcije:

- $T_{\text{kapilare}}=50^{\circ}\text{C}$
- injiciranje: napetost 2,0 kV; trajanje: 10 s
- denaturacija:  $T=90^{\circ}\text{C}$ , trajanje: 120 s
- ločevanje: napetost 4,0 kV; trajanje: 45 min.

### 3.8 STATISTIČNI TESTI

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabljali program SPSS Statistics 17.0. Pri vseh analizah smo vrednost  $p < 0,05$  opredelili za statistično značilno. Povezanost polimorfizmov -2957A>G in Pro12Ala ter njihovih haplotipov z izbranimi spremenljivkami smo ugotavljali s pomočjo parametričnih in neparametričnih testov. S testom Kolmogorov-Smirnov oziroma Shapiro-Wilk (če je bilo manj kot 50 preiskovancev) smo preverili normalnost porazdelitve spremenljivk. V primeru normalne porazdelitve smo uporabili parametrične teste, in sicer T-test (za dve neodvisni spremenljivki) ali analizo variance (za več neodvisnih spremenljivk). Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med posameznimi podskupinami za več neodvisnih spremenljivk smo uporabili Scheffe post hoc test. Če smo s testom ANOVA odkrili statistično značilne razlike v starosti ali ITM med posameznimi podskupinami, smo uporabili analizo kovariance ANCOVO, za primerjavo posameznih podskupin pa Bonefferonijev post hoc test.

Če se spremenljivke niso porazdeljevale normalno, smo poskušali podatke transformirati z naravnim logaritmom. Če je transformacija dala normalno porazdelitev, smo uporabili parametrične teste po zgoraj opisanih kriterijih. Po opravljenem testu smo z antilogaritmiranjem srednje vrednosti dobili geometrično sredino, prav tako pa smo antilogaritmirali meje 95% intervala zaupanja ( $IZ_{95\%}$ ). V primeru nenormalne porazdelitve smo uporabili neparametrične teste, in sicer Mann Whitneyev test (za dve neodvisni spremenljivki) in Kruskal Wallisov test (za več neodvisnih spremenljivk).

Vpliv polimorfizmov in njihovih haplotipov na pojav nizkoenergijskega zloma smo ugotavljali s pomočjo binarne logistične regresije.

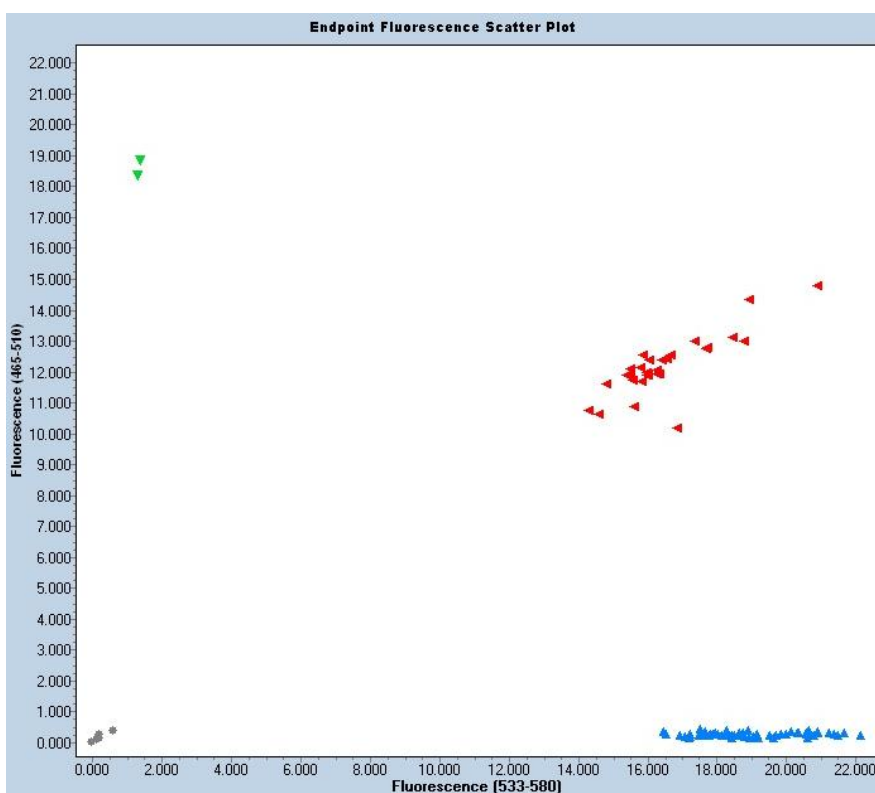
## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA Pro12Ala

Genotipizacijo polimorfizma Pro12Ala smo izvedli z metodo alelne diskriminacije s pomočjo hidrolizirajočih sond TaqMan<sup>®</sup>. Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo in pogoji za PCR v realnem času so bili predhodno določeni s strani proizvajalca in jih ni bilo potrebno optimizirati. Detekcija produktov PCR je potekala na podlagi porasta fluorescence po razpadu sonde vezane na komplementarno zaporedje. V *Preglednica XIII* je prikazana povezava med fluorescenčnimi signali in nukleotidnim zaporedjem tarčne DNA, *Slika 7* pa prikazuje rezultate genotipizacije za eno ploščico vzorcev.

*Preglednica XIII: Povezava med fluorescenčnim signalom in nukleotidnim zaporedjem DNA*

Porast fluorescenčnega signala	Genotip za polimorfizem Pro12Ala	
	samo za VIC <sup>®</sup>	homozigot za alel 1
samo za FAM <sup>™</sup>	homozigot za alel 2	GG
za VIC <sup>®</sup> in FAM <sup>™</sup>	heterozigot (oba alela)	GC



*Slika 7: Prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan<sup>®</sup>; modra barva: genotip CC, rdeča barva: genotip GC, zelena barva: genotip GG, siva barva: negativne kontrole in neuspeli vzorci.*

Vzorci DNA, kjer genotipizacija ni uspela, smo na novo razredčili in jih ponovili. Nekaterih vzorcev kljub temu nismo uspeli genotipizirati, zato smo jih izključili iz nadaljnje statistične analize. Razlog za neuspelo genotipizacijo bi lahko bil kontaminacija s proteini, prisotnost inhibitorjev reakcije PCR ali razpad vzorčne DNA.

## 4.2 GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA -2957A>G

### 4.2.1 OPTIMIZACIJA POGOJEV

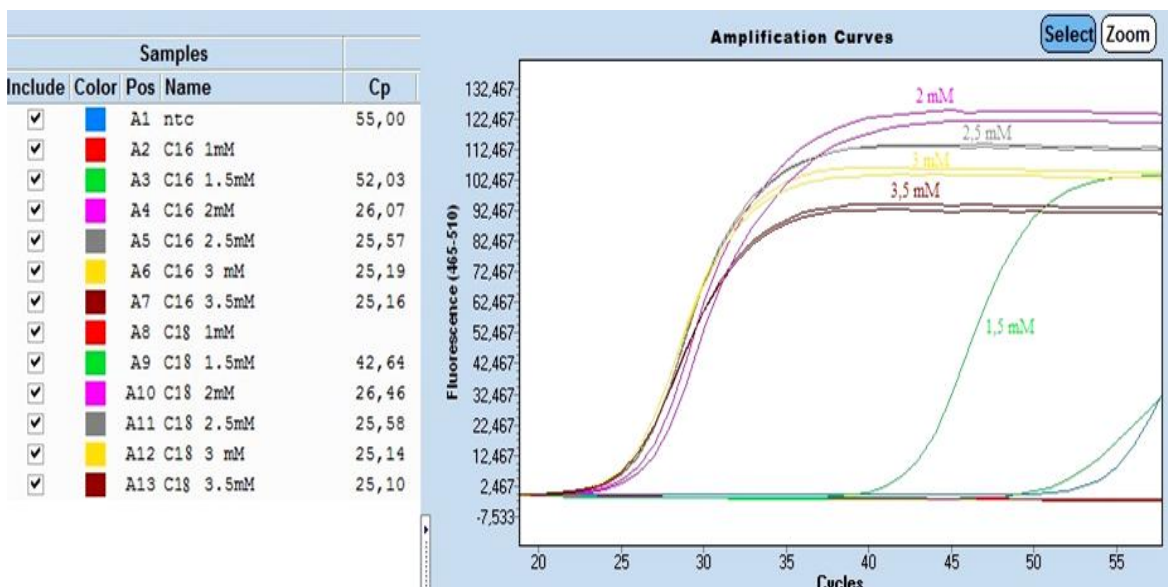
Polimorfizem -2957A>G se v literaturi pojavlja z različnimi oznakami npr. -2821C>T (28) in -2819A>G (29). Costa in sod. v italijanski populaciji polimorfizma -2821C>T niso našli, dva bazna para vstran pa so odkrili polimorfizem -2819A>G (29). Sami smo preverili pozicijo in vrsto teh dveh polimorfizmov in ugotovili, da gre za isti polimorfizem, ki smo ga označili kot -2957A>G, upoštevajoč pravila o poimenovanju enonukleotidnih polimorfizmov po navodilih Dunnen in sod. (38).

Genotipizacijo vzorcev za polimorfizem -2957A>G smo izvedli z analizo HRM. Sestavo reakcijske zmesi in pogoje smo določili na podlagi priporočil proizvajalcev reagentov (40) in na osnovi teoretičnega znanja o PCR.

Začetna oligonukleotida smo oblikovali s pomočjo programa Primer-BLAST, NCBI (41). Oblikovali smo ju tako, da imata podobno temperaturo tališča (okoli 60°C), njuni zaporedji nista komplementarni in ne tvorita nespecifičnih produktov in dimerov.

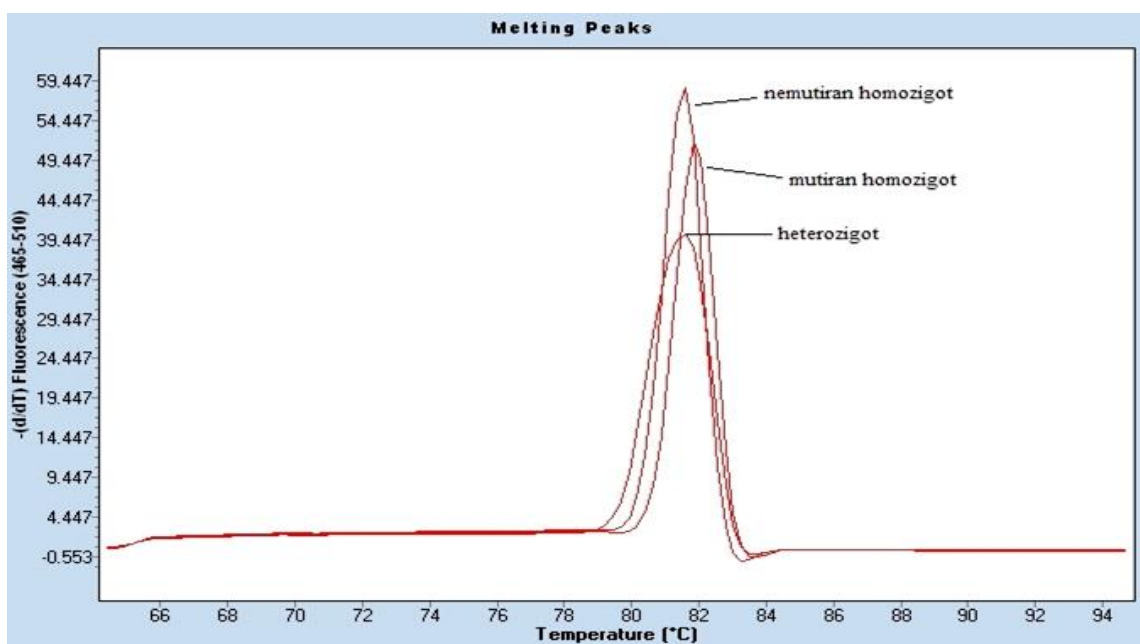
Za zagotovitev specifičnosti in učinkovitosti pomnoževanja tarčnega odseka, je potrebna tudi optimalna koncentracija MgCl<sub>2</sub>, ki je nujen za delovanje DNA polimeraze. Odločali smo se med koncentracijami 2,0, 2,5, 3,0, in 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> v reakcijski zmesi, in sicer s pomočjo krivulj pomnoževanja (Slika 8). Izbrali smo 3mM koncentracijo MgCl<sub>2</sub> zaradi ustrezno visokega platoja krivulje in nizke vrednosti c<sub>p</sub> (cikel, ko je presežena linija fluorescenčnega praga) ter ujemanja talilnih vrhov vzorcev z enakim genotipom. Specifičnost reakcije PCR smo preverili s pomočjo standardne talilne krivulje, saj v primeru pomnoževanja nespecifičnih produktov dobimo več talilnih vrhov.

Za večjo specifičnost pomnoževanja smo uporabili za t.i. 'touch-down' PCR, kjer se temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov med posameznimi cikli spreminja. V začetnih ciklih je bila tako uporabljena visoka temperatura prileganja, ki je zagotovila visoko specifičnost prileganja in pomnoževanja, v kasnejših ciklih pa se je temperatura prileganja znižala, s čimer smo zagotovili ustrezno količino PCR produkta.



Slika 8: Krivulja pomnoževanja dveh vzorcev (C16 in C18) pri različnih koncentracijah  $MgCl_2$ .

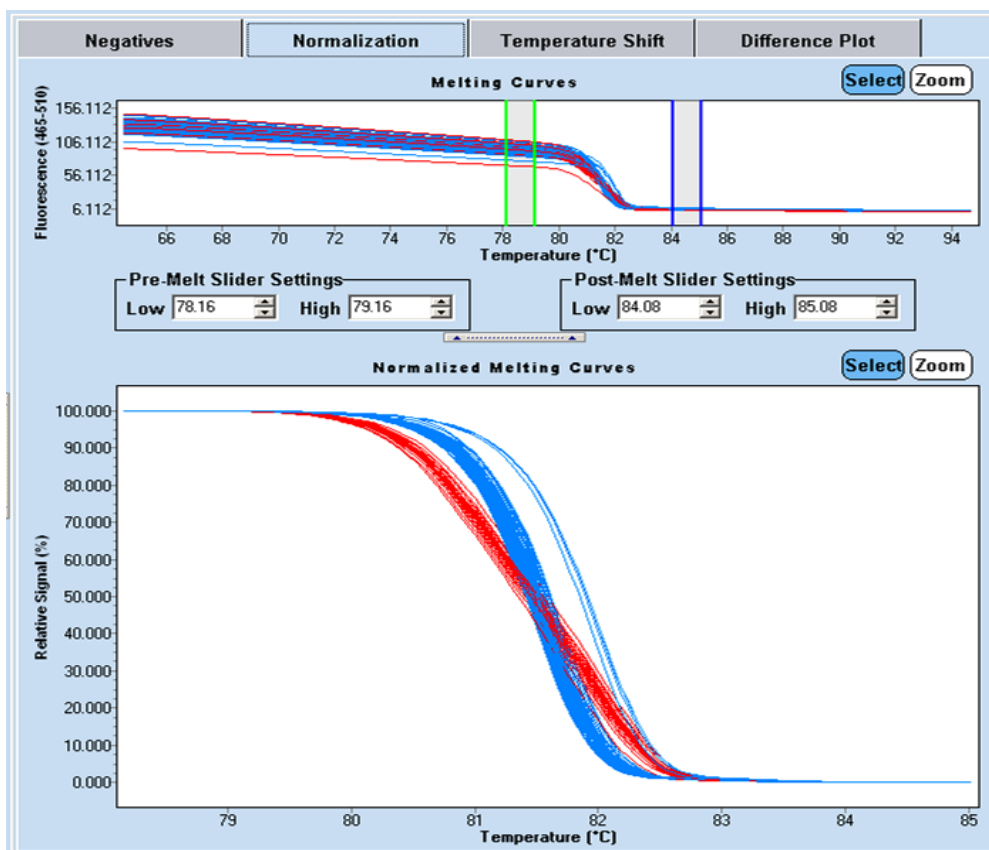
V stopnji HRM smo na začetku nastavili širok talilni interval (od  $65^{\circ}C$  do  $95^{\circ}C$ ), ko pa smo določili talilne temperature ( $T_m$ ) PCR produktov (Slika 9), smo talilni interval zožali (od  $70^{\circ}C$  do  $90^{\circ}C$ ), tako da se je začel in končal približno  $10^{\circ}C$  pred in po pričakovani  $T_m$ .



Slika 9: Prikaz talilnih vrhov za različne genotipe polimorfizma  $-2957A>G$ : nemutiran homozigot (AA), heterozigot (GA) in mutiran homozigot (GG). Pri mutiranem homozigotu pride do minimalnega zamika talilnega vrha v desno (večja  $T_m$ ), saj je za prekinitev treh vodikovih vezi med  $C \equiv G$  potrebna višja temperatura kot za prekinitev dveh vodikovih vezi  $A=T$ .

## 4.2.2 POTEK GENOTIPIZACIJE

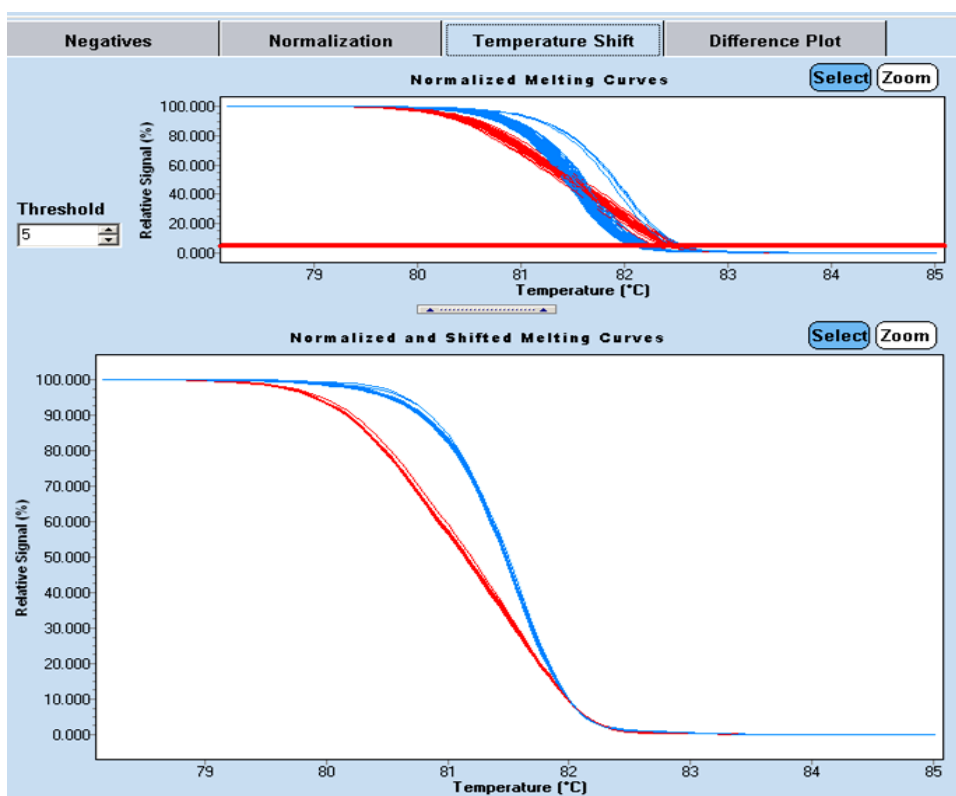
Analizirali smo 734 vzorcev. Na vsako ploščico smo poleg neznanih vzorcev vključili tudi vzorce z že določenim genotipom (nemutiran homozigot – AA, heterozigot – GA in mutiran homozigot – GG), ki so služili kot pozitivna kontrola, in negativno kontrolo. Dobljene rezultate smo analizirali z LightCycler® 480 Gene Scanning programsko opremo. Najprej smo pregledali krivulje pomnoževanja, in sicer so vsi vzorci morali doseči plato,  $c_p$  se med posameznimi vzorci ni smel razlikovati za več kot 5 in je moral biti manjši od 30, kar kaže na ustrezno količino produktov PCR in ustrezno učinkovitost pomnoževanja. Prav tako smo pregledali talilne vrhove za pojav nespecifičnih produktov. Talilne krivulje, ki jih pridobimo z analizo HRM, je potrebno obdelati. Tako smo v prvem koraku normalizirali neobdelane podatke z nastavitvijo začetne fluorescence (pre-melt) in končne fluorescence (post-melt) vseh vzorcev na enotne vrednosti (Slika 10).



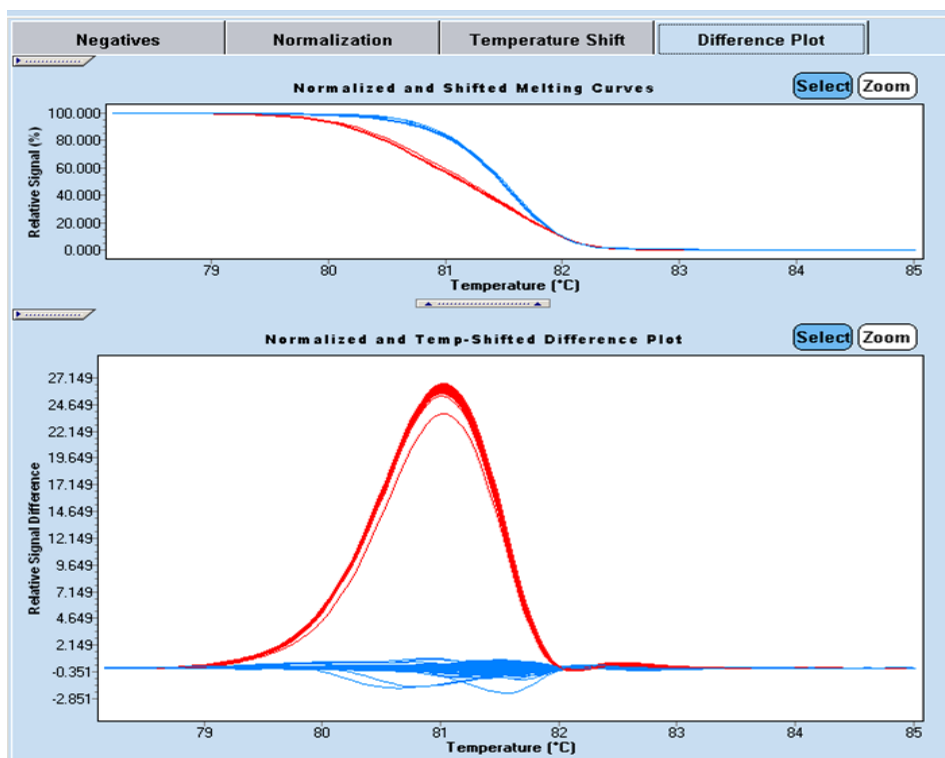
**Slika 10: Prikaz normalizacije osnovnih talilnih krivulj.** Gre za pretvorbo fluorescenčnega v relativni signal (v %), tako da določimo temperaturno območje, v katerem so v vseh vzorcih fragmenti DNA v dvovertični obliki (t.i. Pre-melt slider settings; relativni signal 100%) oziroma popolnoma denaturirani (t.i. Post-melt slider settings; relativni signal 0 %). Legenda: rdeča barva – heterozigoti (GA), modra barva – homozigoti (AA, GG).



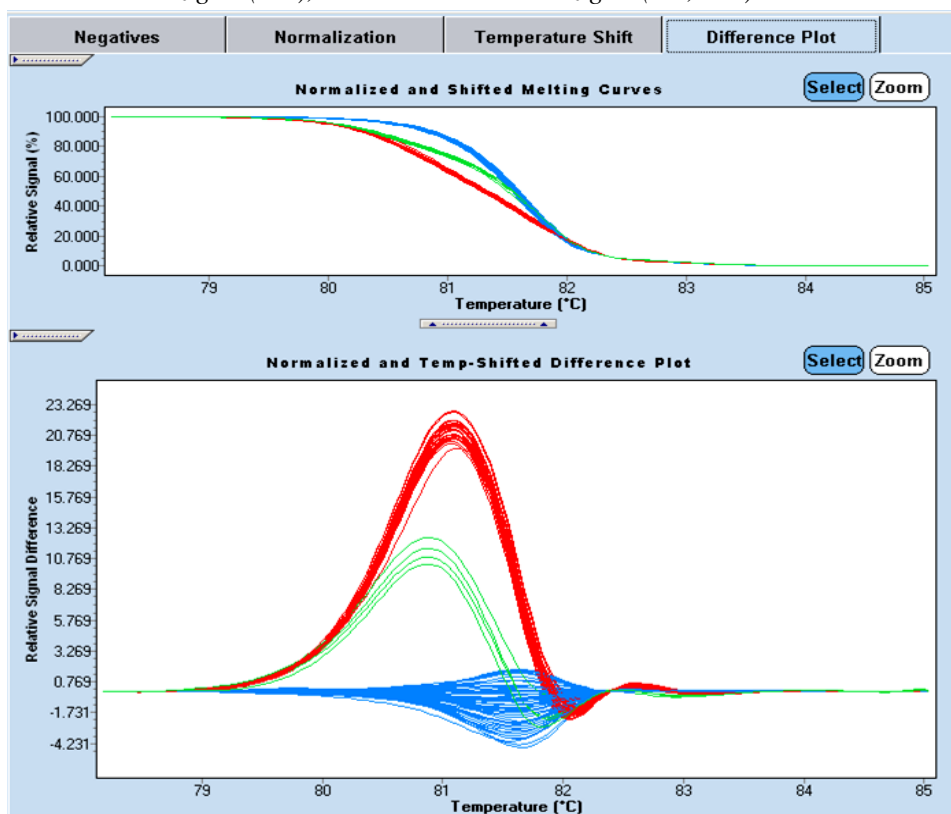
Nato je sledil temperaturni premik, ki premakne talilne krivulje po temperaturni osi do točke, v kateri so vse dvovijačne DNA v vsakem vzorcu popolnoma denaturirane (*Slika 11*). Tako kompenziramo razlike med vzorci, nastale zaradi temperaturnih razlik med vdolbincami na mikrotitrski ploščici, hkrati pa izničimo vsakršno potencialno diskriminatorno moč temperaturnih podatkov. V zadnjem koraku je računalnik od referenčne krivulje odštel normalizirane, premaknjene krivulje vzorcev. Tako smo dobili jasnejši prikaz razlik med oblikami talilnih krivulj v obliki diagrama razlik, ki je omogočal grupiranje glede na podobnost oblik talilnih krivulj (*Slika 12*). Ker ločitev nemutiranih in mutiranih homozigotov na podlagi dobljenih krivulj ni bila mogoča, smo se odločili za dodatek referenčnega nemutiranega homozigota vsem homozigotom in ponovili analizo HRM. Tako smo uspeli uspešno ločiti posamezne genotipe med seboj (*Slika 13*).



*Slika 11: Prikaz temperaturnega premika normaliziranih talilnih krivulj po temperaturni osi. Legenda: rdeča barva – heterozigoti (GA), modra barva – homozigoti (AA, GG).*



Slika 12: Prikaz končnih obdelanih talilnih krivulj v obliki diagrama razlik. Legenda: rdeča barva – heterozigoti (GA), modra barva – homozigoti (AA, GG).



Slika 13: Prikaz končnih obdelanih talilnih krivulj v obliki diagrama razlik po dodatku referenčnega nemutiranega homozigota.. Legenda: rdeča barva – heterozigoti (GA), modra barva – nemutirani homozigoti (AA), zelena barva – mutirani homozigoti (GG).

Vzorci DNA, kjer genotipizacija ni uspela, smo na novo razredčili in jih ponovili. Če je bil  $c_p$  vzorcev večji od 30 in genotipizacija ni uspela, smo sklepali na prisotnost inhibitorjev reakcije PCR, zato smo zmanjšali količino vzorca DNA v reakcijski zmesi (namesto 1,00  $\mu$ l vzorca smo dodali le 0,25  $\mu$ l). Nekaterih vzorcev kljub vsemu nismo uspeli genotipizirati, zato smo jih izključili iz nadaljnje statistične analize. Razlog za neuspelo genotipizacijo bi lahko bil v kontaminaciji s proteini, prisotnost inhibitorjev PCR reakcije ali razpad vzorčne DNA.

Nato smo izbrali naključne predstavnike različnih oblik talilnih krivulj in jim s sekvenciranjem določili nukleotidno zaporedje ter tako potrdili pravilnost genotipizacije. Nukleotidno zaporedje smo določili tudi vzorcem, ki se niso uvrstili v nobeno od omenjenih genotipskih skupin, ter tako preverili, če je mogoče vzrok za to prisotnost do sedaj še neodkrita polimorfizma.

### 4.3 UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMOV

Relativne frekvence polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G v slovenski populaciji smo izračunali na podlagi genotipov, ki smo jih dobili z genotipizacijo 734 vzorcev s sondami TaqMan<sup>®</sup> in analizo HRM. Relativne frekvence genotipov za polimorfizem -2957A>G v celotni skupini preiskovancev so 70,3 % : 27,6 % : 2,1 % za genotipe AA : GA : GG, relativne frekvence v preiskovanih skupinah pa so podane v *Preglednici XIV*.

***Preglednica XIV: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem -2957A>G v preiskovanih skupinah.***

Skupina	N	AA (%)	GA (%)	GG (%)
Moški	117	71,1	27,2	1,8
Pomenopavzne preiskovanke	478	68,4	29,2	2,4
Osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	245	67,7	29,7	2,6
Zdrave pomenopavzne preiskovanke	233	69,1	28,7	2,2
Osteoporozne preiskovanke, zdravljene z alendronatom	53	60,8	35,3	3,9
Osteoporozne preiskovanke, zdravljene z raloksifenom	56	68,6	27,5	3,9
Premenopavzne preiskovanke	59	70,2	28,1	1,8
Preiskovanci z nizkoenergijskim zlomom	110	82,1	17,0	0,9

Relativne frekvence genotipov za polimorfizem Pro12Ala v celotni skupini preiskovancev pa so 69,1 % : 26,6 % : 4,3 % za genotipe CC : GC : GG, relativne frekvence v preiskovanih skupinah pa so podane v *Preglednici XV*.

**Preglednica XV: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem Pro12Ala v preiskovanih skupinah.**

Skupina	N	CC (%)	GC (%)	GG (%)
Moški	117	69,6	25,2	5,2
Pomenopavzne preiskovanke	478	67,8	28,2	4,0
Osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	245	64,2	30,8	5,0
Zdrave pomenopavzne preiskovanke	233	71,6	25,4	3,0
Osteoporozne preiskovanke, zdravljene z alendronatom	53	66,7	33,3	/
Osteoporozne preiskovanke, zdravljene z raloksifenom	56	66,0	30,2	3,8
Premenopavzne preiskovanke	59	70,2	24,6	5,3
Preiskovanci z nizkoenergijskim zlomom	110	67,6	26,9	5,6

Za vsako skupino priskovancev in za vsak polimorfizem smo s testom  $\chi^2$  za dva neodvisna vzorca preverili, če so frekvence genotipov v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Hardy-Weinbergovo načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja in velja za razmerje genotipov v velikih populacijah, kjer se osebkii naključno razmnožujejo, kjer ni naravne selekcije in dodatnih mutacij ter migracij (42). Ugotovili smo, da so vse frekvence genotipov v preiskovanih skupinah za oba polimorfizma v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

#### 4.4 IZRAČUN IN ANALIZA HAPLOTIPOV

Haplotip je kombinacija alelov, ki se nahajajo na istem kromosomu. Glede na položaj so v genskem zapisu običajno blizu skupaj in se skupaj dedujejo. Za napovedovanje haplotipov smo uporabili program PHASE (43). Vključili smo le vzorce, za katere smo imeli podatke o genotipih za oba polimorfizma, ostale smo izključili iz analize. Program PHASE nam za vsak vzorec izračuna možne pare haplotipov, verjetnost, da je določen haplotip prisoten na alelu in frekvence posameznih haplotipov, ki so predstavljene v *Preglednici XVI*.

**Preglednica XVI: Frekvence napovedanih haplotipov (AC, AG, GC, GG).**

Haplotip	Frekvenca (%)
AC	66,6
AG	17,5
GC	15,7
GG	0,17

Prisotnost vezavnega neravnovesja med aleli obeh polimorfizmov smo ugotavljali s programom EMLD (44). Vezavno neravnovesje pomeni nenaključno povezanost alelov na različnih lokusih. Večja kot je povezanost med aleloma, večja je možnost, da se dedujeta skupaj (45). V izračun parametrov vezavnega neravnovesja smo vključili samo vzorce s

podatki o genotipih za oba polimorfizma, ostale pa smo izključili iz analize. Program je izračunal parametre vezavnega neravnovesja, ki so podani v *Preglednica XVII*.

***Preglednica XVII: Prikaz parametrov vezavnega neravnovesja.***

D	D'	r <sup>2</sup>
-0,0281	0,9999	0,0405

Parameter D je koeficient vezavnega neravnovesja in je različen od 0, kar nakazuje na prisotnost vezavnega neravnovesja. Parameter D' je zelo blizu ena, kar nam pove, da sta lokusa, na katerih se nahajata alela, odvisna drug od drugega in se z veliko verjetnostjo dedujeta skupaj. Parameter r<sup>2</sup> je indikator korelacije obeh alelov. Če je njegova vrednost enaka ena, lahko na podlagi informacij o enem alelu sklepamo o lastnostih drugega alela. Vrednost parametra r<sup>2</sup> je blizu nič, kar nakazuje na odsotnost korelacije.

#### **4.5 OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV Pro12Ala IN -2957A>G TER NJUNIH HAPLOTIPOV Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE**

V statistično obdelavo smo vključili 734 preiskovancev (117 moških in 617 žensk), ki smo jih razdelili na že omenjene skupine. V *Preglednici XVIII* in *Preglednici XIX* so prikazane povprečne vrednosti izmerjenih osnovnih parametrov kot so starost, višina, masa, ITM, pričetek menopavze in trajanje menopavze za posamezne skupine in podskupine preiskovancev. Posamezne skupine preiskovancev smo za oba polimorfizma razdelili na tri genotipske podskupine (CC, GC, GG za Pro12Ala in AA, GA in GG za -2957A>G). Ker pa je relativna frekvenca genotipa GG pri obeh polimorfizmih zelo nizka, smo združili podskupini heterozigozov in mutiranih homozigotov. Posamezne skupine preiskovancev smo razdelili tudi glede na število kopij posameznega haplotipa, ki jih ima posameznik (0 – nobene kopije, 1 – eno kopijo, 2 – dve kopiji). Frekvence haplotipa GG je zelo nizka, zato smo ga izključili iz nadaljne analize. V okviru statistične analize smo tako primerjali povprečne vrednosti spremenljivk glede na prisotnost mutiranega oz. nemutiranega alela za oba polimorfizma ter glede na prisotnost števila kopij posameznega haplotipa pri posamezniku z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene.

**Preglednica XVIII: Povprečne vrednosti in SD izmerjenih parametrov v skupini moških, premenopavznih in pomenopavznih preiskovank.**

	Moški	Premenopavzne preiskovanke	Pomenopavzne preiskovanke	Osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	Zdrave pomenopavzne preiskovanke
Število preiskovancev	117	59	478	245	233
starost	67,6 ± 6,1	45,6 ± 4,8	63,0 ± 8,4	64,4 ± 8,2	61,6 ± 8,3
višina (m)	1,71 ± 0,06	1,64 ± 0,06	1,60 ± 0,06	1,58 ± 0,06	1,61 ± 0,06
masa (kg)	81,7 ± 12,8	65,4 ± 11,6	69,7 ± 12,2	66,0 ± 10,0	73,6 ± 13,0
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	27,5 ± 3,8	24,3 ± 4,0	27,3 ± 4,6	26,2 ± 3,8	28,4 ± 5,1
Starost ob menopavzi	/	/	49,5 ± 4,2	48,8 ± 4,5	49,8 ± 4,1
Trajanje menopavze (leta)	/	/	12,2 ± 9,2	15,3 ± 9,4	10,4 ± 8,7

**Preglednica XIX: Povprečne vrednosti in SD izmerjenih parametrov za pomenopavzne osteoporozne preiskovanke, zdravljene z alendronatom ali raloksifenom, in preiskovancev z nizkoenergijskim zlomom.**

	Zdravljenje z alendronatom	Zdravljenje z raloksifenom	Preiskovanci z nizkoenergijskim zlomom
Število preiskovancev	53	56	110
starost	65,1 ± 6,6	60,6 ± 5,6	75,2 ± 9,5
višina (m)	1,57 ± 0,05	1,60 ± 5,5	1,61 ± 0,08
masa (kg)	65,9 ± 9,7	65,5 ± 8,1	69,7 ± 13,1
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	26,6 ± 3,6	25,7 ± 3,3	26,7 ± 4,2

#### 4.5.1 MOŠKI PREISKOVANCI

V skupini moških preiskovancev smo ocenili povezanost polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G in njihovih haplotipov z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene. V to skupino smo vključili 117 moških preiskovancev, katerih osnovne lastnosti so predstavljene v *Preglednici XVIII*. V *Preglednicah XX do XXV* so podane vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave za polimorfizma Pro12Ala in -2957A>G ter za njune haplotipe.

**Preglednica XX: Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	OPG [pmol/l]
<b>alel</b>	0,812	1,021*	1,051	0,16	8,66	2146	4,98*
<b>A</b>	(0,771 do 0,853) N=60	(0,980 do 1,064) N=60	(1,012 do 1,090) N=80	(0,10 do 0,22) N=13	(6,68 do 10,65) N=13	(1138 do 3154) N=9	(4,29 do 5,79) N=13
<b>alel</b>	0,816	0,993*	1,077	0,19	10,17	1815	5,88*
<b>G</b>	(0,749 do 0,882) N=27	(0,933 do 1,096) N=27	(1,012 do 1,143) N=33	(0,10 do 0,28) N=10	(5,17 do 15,17) N=10	(1069 do 2562) N=9	(4,88 do 7,08) N=10
<b>p</b>	0,919	0,448	0,477	0,522	0,540	0,553	0,134

\*geometrična sredina, \*\*Mann-Whitney test, brez oznak – t-test

**Preglednica XXI: Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	OPG [pmol/l]
<b>alel</b>	0,796*	1,026	1,051	0,18	9,63	1872*	5,10*
<b>C</b>	(0,760 do 0,833) N=66	(0,984 do 1,068) N=66	(1,013 do 1,088) N=79	(0,12 do 0,24) N=19	(6,99 do 12,27) N=19	(1469 do 2386) N=16	(4,53 do 5,77) N=19
<b>alel</b>	0,792*	1,008	1,068	0,18	9,74	1282*	6,05*
<b>G</b>	(0,728 do 0,862) N=22	(0,949 do 1,068) N=22	(0,999 do 1,136) N=35	(0,04 do 0,32) N=5	(3,70 do 15,78) N=5	(311 do 5282) N=4	(4,03 do 9,10) N=5
<b>p</b>	0,917	0,657	0,643	0,986	0,968	0,235	0,225

\*geometrična sredina

**Preglednica XXII: Vpliv števila kopij haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

AC	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	OPG** [pmol/l]
<b>0</b>	0,817*	1,011	1,089	0,14	8,08	1950	6,70
	(0,718 do 0,932) N=10	(0,917 do 1,104) N=10	(0,975 do 1,200) N=15	(-0,03 do 0,31) N=5	(2,28 do 13,88) N=5	(-100 do 4001) N=5	(4,91 do 8,48) N=5
<b>1</b>	0,792*	1,004	1,061	0,20	11,38	2013	5,77
	(0,740 do 0,849) N=35	(0,950 do 1,058) N=35	(1,005 do 1,117) N=46	(0,10 do 0,30) N=8	(5,32 do 17,43) N=8	(994 do 3031) N=6	(4,12 do 7,42) N=8
<b>2</b>	0,790*	1,036	1,045	0,17	8,43	1974	4,76
	(0,746 do 0,837) N=41	(0,981 do 1,091) N=41	(0,999 do 1,090) N=51	(0,08 do 0,25) N=9	(6,11 do 10,76) N=9	(1036 do 2911) N=7	(4,21 do 5,31) N=9
<b>p</b>	0,782	0,828	0,683	0,597	0,430	0,918	<b>0,040</b>

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, brez oznake - ANCOVA (kovariata: starost)

**Preglednica XXIII: Prikaz rezultatov Mann Whitneyevega testa za primerjavo srednjih vrednosti OPG med posameznimi skupinami glede na število kopij haplotipa AC. Če je  $p < 0,0167$ , je razlika statistično značilna.**

število kopij haplotipa AC	število kopij haplotipa AC	p
0	1	0,284
	2	<b>0,002</b>
1	2	0,481

**Preglednica XXIV: Vpliv števila kopij haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških: Prikaz srednjih vrednosti in  $IZ_{95\%}$  ter rezultatov statistične obdelave.**

AG	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>is</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL <sup>***</sup> [pmol/l]	OC <sup>**</sup> [µg/l]	OPG <sup>***</sup> [pmol/l]
0	0,795* (0,758 do 0,833) N=64	1,024 (0,981 do 1,067) N=64	1,052 (1,014 do 1,090) N=77	0,17 (0,11 do 0,23) N=17	9,32 (6,51 do 12,15) N=17	5,35 (4,61 do 6,09) N=17
1	0,765* (0,695 do 0,841) N=18	0,992 (0,920 do 1,063) N=18	1,058 (0,985 do 1,131) N=29	0,23 (0,09 do 0,38) N=3	10,83 (-2,40 do 24,07) N=3	5,37 (1,73 do 9,02) N=3
2	0,927* (0,860 do 0,998) N=4	1,083 (1,061 do 1,106) N=4	1,113 (0,867 do 1,358) N=6	/	/	/
p	0,184	0,552	0,729	0,305	0,666	0,765

\*geometrična sredina, \*\* t-test, \*\*\* Mann-Whitney test, brez oznake - ANOVA

**Preglednica XXV: Vpliv števila kopij haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri moških: Prikaz srednjih vrednosti in  $IZ_{95\%}$  ter rezultatov statistične obdelave.**

GC	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>is</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	OPG [pmol/l]
0	0,791* (0,754 do 0,831) N=59	1,015* (0,975 do 1,057) N=59	1,049 (1,009 do 1,088) N=79	0,16 (0,09 do 0,23) N=12	8,80 (6,65 do 10,95) N=12	2145 (1137 do 3153) N=9	4,99* (4,23 do 5,88) N=12
1	0,811* (0,751 do 0,875) N=25	1,006* (0,947 do 1,069) N=25	1,087 (1,019 do 1,155) N=31	0,21 (0,12 do 0,30) N=9	10,72 (5,20 do 16,24) N=9	1720 (890 do 2550) N=8	5,90* (4,78 do 7,29) N=9
p	0,587	0,807	0,312	0,298	0,473	0,468	0,169

\*geometrična sredina, brez oznake - t-test

Statistična obdelava rezultatov pri moških preiskovancih je pokazala statistično značilno povezavo števila kopij haplotipa AC s srednjimi vrednostmi OPG ( $p=0,040$ ) (Preglednica XXII). Z dodatnim Mann Whitneyevim testom smo ugotovili, da so srednje vrednosti OPG



pri skupini z dvema kopijama AC statistično značilno nižje ( $p=0,002$ ) od vrednosti pri skupini z nobeno kopijo AC, medtem ko med skupinama z eno in nobeno kopijo AC ter eno in dvema kopijama ni statistično značilnih razlik (*Preglednica XXIII*). Tako alel A v primeru polimorfizma -2957A>G kot tudi alel C v primeru polimorfizma Pro12Ala povzročita povečano aktivnost PPAR $\gamma$ , kar ima za posledico manjše število osteoblastov in s tem zmanjšano sintezo OPG. Nižje koncentracije OPG, ki preko vezave RANKL zavira osteoklastogenezo, pomenijo povečano tveganje za razvoj osteoporoze in z njo povezanih zapletov.

V skupini moških preiskovancev smo odkrili vpliv števila kopij haplotipa AC na koncentracijo OPG, vendar končnega učinka na kostno maso nismo ugotovili. Ker je skupina preiskovancev majhna, ima pokazan vpliv števila kopij haplotipa AC na koncentracijo OPG pri moških preiskovancih majhen pomen, zato bi bilo potrebno rezultate preveriti na večjem številu preiskovancev.

Preostali rezultati statistične obdelave podatkov moških preiskovancev niso pokazali vpliva polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njihovih haplotipov (AC, AG, GC) na MKG in biokemične kazalce kostne premene.

#### 4.5.2 PREMENOPAVZNE PRISKOVANKE

V skupini premenopavznih preiskovank smo ocenili povezanost polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G in njihovih haplotipov z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene. V statistično obdelavo smo vključili 59 premenopavznih preiskovank, katerih osnovne lastnosti so predstavljene v *Preglednici XVIII*. Vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave podatkov iz skupine premenopavznih preiskovank so prikazani v *Preglednicah XXVI do XXX*.

V skupini premenopavznih preiskovank nismo ugotovili statistično značilnih vplivov polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njihovih haplotipov na MKG in biokemične kazalce kostne premene. Tako kot mi tudi Rhee in sod. v raziskavi, v katero je bilo vključenih 239 korejskih žensk (114 premenopavznih in 125 pomenopavznih žensk), niso ugotovili nobene povezave polimorfizma Pro12Ala z MKG ter biokemičnimi kazalci kostne premene pri premenopavznih preiskovankah (26).

**Preglednica XXVI: Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

	MKG <sub>fn</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katapsin K [pmol/l]
<b>alel</b> <b>A</b>	0,775 (0,755 do 0,795) N=40	0,911 (0,888 do 0,935) N=40	0,981 (0,949 do 1,014) N=40	0,47 (0,36 do 0,57) N=40	10,33* (8,89 do 12,01) N=40	2953 (2474 do 3431) N=40	7,61* (6,68 do 8,67) N=38	3,81 (3,56 do 4,06) N=40	2,74* (1,73 do 4,34) N=36
<b>alel</b> <b>G</b>	0,785 (0,732 do 0,838) N=17	0,926 (0,865 do 0,987) N=16	1,030 (0,967 do 1,092) N=17	0,58 (0,25 do 0,91) N=17	9,61* (8,06 do 11,46) N=17	2274 (1689 do 2859) N=17	7,83* (6,46 do 9,49) N=17	4,32 (3,74 do 4,90) N=17	3,75* (1,33 do 10,55) N=15
<b>p</b>	0,715	0,571	0,127	0,775	0,518	0,098	0,803	0,056	0,506

\*geometrična sredina, \*\*Mann-whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica XXVII: Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

	MKG <sub>fn</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katapsin K [pmol/l]
<b>alel</b> <b>C</b>	0,778 (0,754 do 0,802) N=40	0,917 (0,888 do 0,946) N=39	0,995 (0,962 do 1,027) N=40	0,54 (0,38 do 0,69) N=40	10,23* (8,99 do 11,63) N=40	2247* (1861 do 2712) N=40	7,48* (6,64 do 8,41) N=39	4,00 (3,70 do 4,30) N=40	2,70* (1,69 do 4,65) N=36
<b>alel</b> <b>G</b>	0,778 (0,738 do 0,819) N=17	0,912 (0,874 do 0,951) N=17	0,998 (0,933 do 1,064) N=17	0,41 (0,25 do 0,56) N=17	9,85* (7,55 do 12,83) N=17	2726* (2023 do 3673) N=16	8,20* (6,49 do 10,37) N=16	3,87 (3,42 do 4,33) N=17	3,56* (1,48 do 8,60) N=15
<b>p</b>	0,988	0,854	0,905	0,066	0,790	0,265	0,423	0,645	0,609

\*geometrična sredina, \*\*Mann-whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica XXVIII: Vpliv števila kopij haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

AC	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K [pmol/l]
<b>0</b>	0,796 (0,691 do 0,900) N=8	0,944 (0,849 do 1,038) N=8	1,020 (0,908 do 1,132) N=8	0,45 (0,19 do 0,71) N=8	11,47* (7,33 do 17,94) N=8	2461* (1431 do 4232) N=8	8,22* (5,30 do 12,77) N=7	4,22 (3,51 do 4,92) N=8	5,72* (1,05 do 31,23) N=7
<b>1</b>	0,774 (0,745 do 0,802) N=22	0,906 (0,870 do 0,942) N=21	1,005 (0,952 do 1,057) N=22	0,50 (0,24 do 0,77) N=22	9,05* (7,52 do 10,44) N=22	2413* (1909 do 3049) N=21	7,80* (6,69 do 9,10) N=22	4,00 (3,50 do 4,49) N=22	2,47* (1,16 do 5,29) N=19
<b>2</b>	0,777 (0,750 do 0,803) N=27	0,915 (0,882 do 0,948) N=27	0,981 (0,944 do 1,018) N=27	0,51 (0,38 do 0,65) N=27	10,66* (8,91 do 12,75) N=27	2320* (1807 do 2979) N=27	7,44* (6,32 do 8,76) N=26	3,86 (3,55 do 4,17) N=27	2,91* (1,65 do 5,15) N=25
<b>p</b>	0,779	0,582	0,603	0,327	0,292	0,958	0,812	0,624	0,460

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, brez oznake – ANOVA

**Preglednica XXIX: Vpliv števila kopij haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

AG	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP**** [µg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K*** [pmol/l]
<b>0</b>	0,778 (0,754 do 0,802) N=40	0,917 (0,888 do 0,946) N=39	0,995 (0,962 do 1,027) N=40	0,54 (0,38 do 0,69) N=40	10,23* (8,99 do 11,63) N=40	2247* (1861 do 2712) N=40	7,97 (7,02 do 8,93) N=39	4,00 (3,70 do 4,30) N=40	2,80* (1,69 do 4,65) N=36
<b>1</b>	0,788 (0,740 do 0,836) N=14	0,914 (0,868 do 0,961) N=14	1,009 (0,933 do 1,085) N=14	0,41 (0,22 do 0,60) N=14	9,26* (7,01 do 12,25) N=14	2522* (1760 do 3614) N=13	9,18 (7,15 do 11,21) N=14	3,87 (3,34 do 4,41) N=14	3,28* (1,19 do 8,99) N=13
<b>2</b>	0,734 (0,642 do 0,826) N=3	0,904 (0,776 do 1,031) N=3	0,950 (0,668 do 1,232) N=3	0,40 (-0,26 do 1,06) N=3	13,09* (2,44 do 70,34) N=3	3820* (2903 do 5029) N=3	/	3,89 (1,93 do 5,84) N=3	/
<b>p</b>	0,546	0,965	0,699	0,178	0,446	0,291	0,230	0,900	0,754

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, \*\*\*t-test, \*\*\*\*Mann Whitney test, brez oznake – ANOVA

**Preglednica XXX: Vpliv števila kopij haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri premenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

GC	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>is</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [µg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K [pmol/l]
<b>0</b>	0,775 (0,755 do 0,795) N=40	0,912 (0,888 do 0,935) N=40	0,981 (0,949 do 1,014) N=40	0,47 (0,36 do 0,57) N=40	10,33* (8,89 do 12,01) N=40	2953 (2474 do 3431) N=39	7,61* (6,68 do 8,67) N=38	3,81 (3,56 do 4,06) N=40	2,74* (1,73 do 4,34) N=36
<b>1</b>	0,774 (0,724 do 0,824) N=16	0,915 (0,855 do 0,976) N=15	1,025 (0,959 do 1,091) N=16	0,59 (0,24 do 0,95) N=16	9,50* (7,89 do 11,45) N=16	2228 (1611 do 2846) N=16	7,78* (6,33 do 9,55) N=16	4,31 (3,69 do 4,94) N=16	4,40* (1,53 do 12,65) N=14
<b>p</b>	0,952	0,881	0,177	0,690	0,523	0,086	0,857	0,067	0,322

\*geometrična sredina, \*\*Mann Whitney test, brez oznake – t-test

#### 4.5.3 POMENOPAVZNE PREISKOVANKE

Ocenili smo povezanost polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njunih haplotipov z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene v skupini pomenopavznih preiskovank. V to skupino smo vključili 478 pomenopavznih preiskovank, katerih osnovne lastnosti so predstavljene v *Preglednici XVIII*. Vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati obdelave podatkov iz skupine pomenopavznih preiskovank so prikazani v *Preglednicah XXXI do XXXVI*.

Statistična obdelava podatkov pri pomenopavznih preiskovankah je pokazala statistično značilno povezavo ( $p=0,011$ ) polimorfizma -2957A>G z RANKL, in sicer so srednje vrednosti RANKL v primeru vsaj ene kopije alela G višje od srednjih vrednosti pri preiskovankah z alelom A (*Preglednica XXXI*).

Prav tako smo s Kruskal Wallisovim testom ugotovili statistično značilno razliko ( $p=0,013$ ) med srednjimi vrednostmi RANKL glede na število prisotnih kopij haplotipa GC (*Preglednica XXXV*). Z Mann Whitneyevim testom smo primerjali po dve podskupini med seboj in ugotovili, da so srednje vrednosti RANKL pri preiskovankah z nobeno kopijo GC statistično značilno nižje od vrednosti pri preiskovankah z eno kopijo GC ( $p=0,004$ ), med skupinami z eno in dvema kopijama GC ter dvema in nobeno kopijo GC ni statistično značilnih razlik (*Preglednica XXXVI*). Ti rezultati niso zanesljivi, saj so v skupini z dvema

kopijama GC le štiri preiskovanke, zato bi bilo potrebno rezultate preveriti na večjem številu preiskovank.

Iz zgornjih ugotovitev lahko sklepamo, da prisotnost polimorfizma -2957A>G na enem alelu statistično značilno vpliva na koncentracije RANKL, saj so le-te pri nosilkah vsaj enega alela G višje kot pri tistih z alelom A, prav tako pa so višje pri nosilkah ene kopije haplotipa GC v primerjavi s preiskovankami brez GC. Prisotnost alela G zmanjša aktivnost PPAR $\gamma$ , kar posledično pomeni večje število osteoblastov in s tem večjo sintezo RANKL. Višje koncentracije RANKL lahko pomenijo povečano diferenciacijo osteoklastov in njihovo aktivacijo in s tem povečano razgradnjo kostnine z osteoklasti, kar poveča tveganje za osteoporozo.

**Preglednica XXXI: Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> <sup>**</sup> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL <sup>**</sup> [pmol/l]	OC <sup>**</sup> [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP <sup>**</sup> [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K [pmol/l]
<b>alel A</b>	0,679* (0,666 do 0,692) N=309	0,818* (0,803 do 0,833) N=307	0,859 (0,840 do 0,877) N=309	0,30 (0,21 do 0,39) N=105	22,07 (20,08 do 24,06) N=129	3922 (3559 do 4285) N=108	12,74 (11,64 do 13,84) N=101	5,57 (5,26 do 5,87) N=133	2,01 (1,27 do 3,19) N=33
<b>alel G</b>	0,690* (0,671 do 0,710) N=143	0,834* (0,811 do 0,858) N=143	0,850 (0,823 do 0,877) N=141	0,43 (0,31 do 0,54) N=51	22,37 (19,43 do 25,30) N=64	4204 (3529 do 4879) N=47	11,64 (10,41 do 12,86) N=51	5,78 (5,31 do 6,25) N=62	2,39 (1,34 do 4,27) N=12
<b>p</b>	0,364	0,253	0,820	<b>0,011</b>	0,953	0,428	0,358	0,435	0,674

\*geometrična sredina, \*\*Mann-Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica XXXII: Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

	MKG <sub>fn</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP** [μg/l]	OPG** [pmol/l]	katepsin K [pmol/l]
<b>alel C</b>	0,685* (0,672 do 0,698) N=320	0,825* (0,809 do 0,841) N=319	0,860 (0,842 do 0,879) N=318	0,39 (0,28 do 0,50) N=108	20,16* (18,42 do 22,08) N=129	4059 (3650 do 4469) N=105	12,04 (11,14 do 12,94) N=103	5,61 (5,30 do 5,91) N=135	2,45* (1,61 do 3,74) N=30
<b>alel G</b>	0,673* (0,654 do 0,692) N=152	0,812* (0,792 do 0,833) N=151	0,845 (0,820 do 0,869) N=152	0,32 (0,22 do 0,42) N=56	17,64* (14,85 do 20,96) N=68	4162 (3593 do 4731) N=55	13,09 (11,38 do 14,80) N=52	5,78 (5,36 do 6,19) N=70	1,65* (0,83 do 3,30) N=16
<b>p</b>	0,295	0,345	0,387	0,274	0,134	0,771	0,638	0,575	0,292

\*geometrična sredina, \*\*Mann-Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica XXXIII: Vpliv števila kopij haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

AC	MKG <sub>fn</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC** [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP** [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K [pmol/l]
<b>0</b>	0,684 (0,659 do 0,710) N=58	0,828 (0,796 do 0,861) N=57	0,844 (0,805 do 0,882) N=58	0,39 (0,20 do 0,57) N=25	23,77 (18,83 do 28,71) N=24	4325 (3295 do 5355) N=23	13,29 (10,11 do 16,48) N=17	5,59 (4,90 do 6,28) N=28	0,99* (0,32 do 3,07) N=5
<b>1</b>	0,695 (0,677 do 0,714) N=201	0,837 (0,816 do 0,858) N=201	0,852 (0,829 do 0,874) N=199	0,33 (0,25 do 0,41) N=67	21,58 (19,14 do 24,02) N=94	4234 (3694 do 4774) N=66	12,34 (11,12 do 13,57) N=75	5,83 (5,46 do 6,20) N=88	2,33* (1,33 do 4,08) N=20
<b>2</b>	0,693 (0,676 do 0,710) N=193	0,834 (0,814 do 0,854) N=192	0,864 (0,840 do 0,888) N=193	0,34 (0,21 do 0,47) N=64	22,39 (19,84 do 24,93) N=75	3670 (3259 do 4080) N=66	12,14 (10,90 do 13,37) N=60	5,43 (5,02 do 5,84) N=79	2,30* (1,29 do 4,11) N=20
<b>p</b>	0,773	0,899	0,738	0,819	0,917	0,201	0,956	0,344	0,334

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, brez oznake – ANOVA

**Preglednica XXXIV: Vpliv števila kopij haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

AG	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL <sup>**</sup> [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP <sup>**</sup> [μg/l]	OPG <sup>**</sup> [pmol/l]	katapsin K [pmol/l]
<b>0</b>	0,686* (0,673 do 0,699) N=307	0,827* (0,811 do 0,843) N=306	0,861 (0,842 do 0,880) N=305	0,36 (0,27 do 0,45) N=103	19,99* (18,25 do 21,89) N=127	3926 (3538 do 4314) N=102	11,98 (11,08 do 12,89) N=102	5,57 (5,25 do 5,89) N=129	2,45* (1,61 do 3,74) N=30
<b>1</b>	0,677* (0,656 do 0,698) N=126	0,816* (0,794 do 0,839) N=127	0,840 (0,813 do 0,867) N=127	0,31 (0,19 do 0,44) N=44	16,80* (13,90 do 20,30) N=59	3920 (3295 do 4546) N=45	12,69 (10,69 do 14,42) N=46	5,83 (5,38 do 6,29) N=56	1,80* (0,77 do 4,20) N=12
<b>2</b>	0,665* (0,618 do 0,714) N=18	0,804* (0,748 do 0,865) N=17	0,878 (0,802 do 0,955) N=18	0,24 (0,16 do 0,31) N=9	24,62* (16,14 do 37,57) N=7	5528 (3829 do 7227) N=8	18,45 (3,76 do 33,13) N=4	5,30 (4,0 do 6,59) N=10	0,89* (0,03 do 26,16) N=3
<b>p</b>	0,605	0,631	0,390	0,418	0,089	0,093	0,235	0,357	0,335

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, brez oznake – ANOVA

**Preglednica XXXV: Vpliv števila kopij haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

GC	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL <sup>**</sup> [pmol/l]	OC <sup>**</sup> [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP <sup>**</sup> [μg/l]	OPG <sup>**</sup> [pmol/l]	katapsin K <sup>***</sup> [pmol/l]
<b>0</b>	0,689 (0,676 do 0,703) N=309	0,818* (0,803 do 0,833) N=307	0,859 (0,840 do 0,877) N=309	0,30 (0,21 do 0,39) N=105	22,07 (20,07 do 24,06) N=129	3922 (3559 do 4285) N=108	12,74 (11,64 do 13,84) N=101	5,57 (5,26 do 5,87) N=133	2,01* (1,27 do 3,19) N=33
<b>1</b>	0,702 (0,679 do 0,724) N=132	0,835* (0,810 do 0,860) N=132	0,852 (0,823 do 0,881) N=130	0,44 (0,32 do 0,56) N=47	21,76 (18,68 do 24,85) N=59	4224 (3549 do 4898) N=43	11,50 (10,22 do 12,78) N=47	5,77 (5,25 do 6,29) N=56	2,39 (1,34 do 4,27) N=12
<b>2</b>	0,683 (0,631 do 0,735) N=11	0,826* (0,758 do 0,901) N=1	0,832 (0,736 do 0,927) N=11	0,33 (-0,52 do 1,18) N=4	29,46 (18,17 do 40,75) N=5	3989 (-1892 do 9869) N=4	13,21 (6,48 do 19,94) N=4	5,89 (4,78 do 7,00) N=6	/
<b>p</b>	0,880	0,512	0,855	<b>0,013</b>	0,211	0,713	0,481	0,698	0,674

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, \*\*\*t-test, brez oznake – ANOVA

**Preglednica XXXVI: Prikaz rezultatov Mann Whitneyevega testa za primerjavo srednjih vrednosti RANKL med posameznimi skupinami glede na število kopij haplotipa GC. Če je  $p < 0,0167$ , je razlika statistično značilna.**

število kopij haplotipa GC	število kopij haplotipa GC	p
0	1	<b>0,004</b>
	2	0,506
1	2	0,251

V skupini pomenopavznih preiskovank smo odkrili vpliv polimorfizma -2957A>G na koncentracijo RANKL, vendar končnega učinka na kostno gostoto nismo odkrili. Preostali rezultati niso pokazali vpliva polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njihovih haplotipov na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah. Rhee in sod. so z razliko od nas pri pomenopavznih korejskih preiskovankah odkrili statistično značilen vpliv polimorfizma Pro12Ala na koncentracijo OPG, med tem ko vpliva na MKG tako kot mi niso ugotovili (26).

Skupino pomenopavznih preiskovank smo nadalje razdelili na dve skupini glede na T-vrednost na zdrave in osteoporozne pomenopavzne preiskovanke. V obeh podskupinah smo želeli oceniti povezanost polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njihovih haplotipov z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene.

#### 4.5.3.1 ZDRAVE PREISKOVANKE

V statistično obdelavo smo vključili 233 zdravih pomenopavznih preiskovank s T-vrednostjo večjo od -2,5 SD. Vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave podatkov iz skupine zdravih pomenopavznih preiskovank so prikazani v *Preglednicah XXXVII do XLII*.

Statistična obdelava podatkov v skupini zdravih pomenopavznih preiskovank je pokazala statistično značilne razlike ( $p=0,012$ ) v srednjih vrednostih osteokalcina glede na različno število kopij haplotipa AG (*Preglednica XL*). Bonfferonijev post hoc test je pokazal statistično značilno ( $p=0,028$ ) višje vrednosti osteokalcina pri zdravih preiskovankah z dvema kopijama AG v primerjavi s z zdravimi preiskovankami z eno kopijo AG (*Preglednica XLI*). Med skupinami z eno in nobeno kopijo AG ter dvema in nobeno kopijo AG ni statistično značilnih razlik. Koncentracije osteokalcina v serumu so sorazmerne s stopnjo kostne tvorbe. Manjše koncentracije osteokalcina so tako kazalec manjše kostne tvorbe in s tem povečanega tveganja za osteoporozo. Ti rezultati imajo omejen pomen, saj



so v skupini z dvema kopijama AG le tri preiskovanke, zato bi bilo potrebno rezultate preveriti na večjem številu preiskovank.

**Preglednica XXXVII: Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	MKG <sub>fn</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K [pmol/l]
<b>alel</b> <b>A</b>	0,749* (0,732 do 0,766) N=154	0,908 (0,889 do 0,928) N=153	0,963* (0,941 do 0,984) N=154	0,36 (0,24 do 0,48) N=69	14,81 (13,25 do 16,37) N=48	3890 (3435 do 4344) N=65	11,95 (10,38 do 13,52) N=29	5,07 (4,71 do 5,44) N=69	2,20 (1,29 do 3,73) N=26
<b>alel</b> <b>G</b>	0,768* (0,739 do 0,798) N=69	0,932 (0,893 do 0,970) N=69	0,969* (0,940 do 0,998) N=68	0,45 (0,29 do 0,60) N=31	15,41 (12,70 do 18,12) N=22	3894 (3082 do 4706) N=30	11,88 (9,62 do 14,13) N=13	5,40 (4,75 do 6,05) N=31	2,50 (1,32 do 4,71) N=11
<b>p</b>	0,252	0,215	0,754	0,063	0,678	0,992	0,957	0,342	0,769

\*geometrična sredina, \*\*Mann-Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica XXXVIII: Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	MKG <sub>fn</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP [μg/l]	OPG [pmol/l]	katepsin K [pmol/l]
<b>alel</b> <b>C</b>	0,753* (0,736 do 0,771) N=166	0,914 (0,892 do 0,936) N=165	0,962* (0,941 do 0,983) N=165	0,41 (0,29 do 0,54) N=69	16,05 (14,57 do 17,52) N=49	3868 (3405 do 4331) N=65	11,69 (10,31 do 13,07) N=30	5,10 (4,72 do 5,49) N=69	2,82* (1,91 do 4,15) N=27
<b>alel</b> <b>G</b>	0,757* (0,730 do 0,785) N=66	0,917 (0,889 do 0,945) N=66	0,971* (0,944 do 0,999) N=66	0,31 (0,19 do 0,43) N=33	12,96 (10,34 do 15,57) N=23	4066 (3307 do 4825) N=32	12,18 (9,39 do 14,98) N=13	5,39 (4,84 do 5,94) N=33	1,43* (0,51 do 4,00) N=11
<b>p</b>	0,575	0,806	0,945	0,239	0,057	0,421	0,507	0,622	0,188

\*geometrična sredina, \*\*Mann-Whitney test, brez oznake – ANCOVA (kovariata: ITM)

**Preglednica XXXIX: Vpliv haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

AC	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL <sup>**</sup> [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP <sup>***</sup> [µg/l]	OPG [pmol/l]	katapsin K <sup>***</sup> [pmol/l]
<b>0</b>	0,760* (0,720 do 0,802) N=22	0,913* (0,863 do 0,965) N=22	0,972* (0,923 do 0,976) N=22	0,32 (0,05 do 0,59) N=14	13,70 (6,05 do 21,34) N=7	2996* (1843 do 4870) N=14	/	5,58 (4,66 do 6,50) N=14	/
<b>1</b>	0,762* (0,738 do 0,788) N=99	0,914* (0,887 do 0,942) N=99	0,967* (0,946 do 0,994) N=98	0,38 (0,28 do 0,48) N=42	15,03 (12,99 do 17,07) N=33	3656* (3107 do 4301) N=40	12,23 (10,38 do 14,09) N=22	5,23 (4,73 do 5,74) N=42	2,23 (1,19 do 4,18) N=18
<b>2</b>	0,746* (0,727 do 0,767) N=101	0,898* (0,874 do 0,922) N=101	0,958* (0,930 do 0,987) N=102	0,41 (0,22 do 0,59) N=44	15,28 (13,50 do 17,06) N=30	3268* (2779 do 3844) N=41	11,42 (9,57 do 13,26) N=18	4,99 (4,51 do 5,47) N=44	2,84 (1,66 do 4,86) N=17
<b>p</b>	0,576	0,634	0,776	0,261	0,801	0,468	0,523	0,463	0,540

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, \*\*\*t-test, brez oznake – ANOVA

**Preglednica XL: Vpliv haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

AG	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> <sup>**</sup> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL <sup>**</sup> [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP <sup>***</sup> [µg/l]	OPG [pmol/l]	katapsin K <sup>***</sup> [pmol/l]
<b>0</b>	0,762 (0,744 do 0,780) N=160	0,915 (0,892 do 0,937) N=159	0,962* (0,941 do 0,984) N=159	0,42 (0,29 do 0,55) N=68	15,90 (14,43 do 17,38) N=48	3824 (3362 do 4286) N=64	11,69 (10,31 do 13,07) N=30	5,09 (4,70 do 5,48) N=68	2,82* (1,91 do 4,15) N=27
<b>1</b>	0,766 (0,734 do 0,798) N=57	0,919 (0,889 do 0,950) N=57	0,964* (0,935 do 0,994) N=57	0,32 (0,17 do 0,47) N=27	11,83 (9,38 do 14,28) N=19	3702 (2884 do 4520) N=26	12,12 (8,99 do 15,24) N=11	5,42 (4,76 do 6,07) N=27	1,59* (0,49 do 5,12) N=9
<b>2</b>	0,761 (0,660 do 0,863) N=6	0,907 (0,785 do 1,028) N=6	1,020* (0,885 do 1,176) N=6	0,25 (0,18 do 0,31) N=5	20,63 (0,24 do 41,03) N=3	5729 (3214 do 8244) N=5	/	5,07 (3,92 do 6,23) N=5	/
<b>p</b>	0,772	0,942	0,554	0,474	<b>0,012</b>	0,060	0,762	0,657	0,199

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, \*\*\*t-test, brez oznake – ANCOVA (kovariata:ITM)

**Preglednica XLI: Prikaz rezultatov Bonferroni post hoc testa za OC kot odvisno spremenljivko in število kopij haplotipa AG kot neodvisno spremenljivko.**

število kopij haplotipa AG	število kopij haplotipa AG	p
0	1	0,080
	2	0,277
1	2	<b>0,028</b>

**Preglednica XLII: Vpliv haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

GC	MKG <sub>fin</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL**** [pmol/l]	OC*** [μg/l]	CTX*** [pmol/l]	BALP*** [μg/l]	OPG*** [pmol/l]	katapsin K*** [pmol/l]
0	0,749* (0,732 do 0,766) N=154	0,908 (0,888 do 0,927) N=153	0,963* (0,941 do 0,984) N=154	0,36 (0,24 do 0,48) N=69	14,81 (13,25 do 16,37) N=48	3890 (3435 do 4344) N=65	11,95 (10,38 do 13,52) N=29	5,08 (4,71 do 5,44) N=69	2,20* (0,77 do 3,73) N=26
1	0,770* (0,739 do 0,802) N=64	0,935 (0,895 do 0,975) N=64	0,970* (0,940 do 1,000) N=63	0,45 <sup>1</sup> (0,29 do 0,60) N=31	15,41 (12,70 do 18,12) N=22	3894 <sup>1</sup> (3082 do 4891) N=30	11,88 (9,62 do 14,13) N=13	5,40 <sup>1</sup> (4,75 do 6,05) N=31	2,50* (1,32 do 4,71) N=11
2	0,737* (0,642 do 0,845) N=5	0,891 (0,717 do 1,064) N=5	0,949* (0,818 do 1,101) N=5	/	/	/	/	/	/
p	0,420	0,463	0,896	0,063	0,678	0,992	0,957	0,342	0,769

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, \*\*\*t-test, \*\*\*\*Mann Whitney test, brez oznake – ANOVA

<sup>1</sup>V primeru RANKL, CTX in BALP sta bili samo 2 preiskovanki v podskupini 2, zato smo ju združili s podskupino 1.

V skupini zdravih pomenopavznih preiskovank smo odkrili vpliv števila kopij haplotipa AG na koncentracijo osteokalcina, vendar imajo rezultati omejen pomen zaradi majhnega števila vključenih preiskovank. Preostali rezultati niso pokazali vpliva polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njunih haplotipov na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah.

#### 4.5.3.2 OSTEOPOROZNE PREISKOVANKE

V statistično obdelavo smo vključili podatke 245 pomenopavznih preiskovank, obolelih za osteoporozo (T-vrednost < -2,5 SD). Vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne

premene ter rezultati statistične obdelave podatkov iz skupine osteoporoznih pomenopavznih preiskovank so prikazani v Preglednicah XLIII do XLVII.

**Preglednica XLIII: Vpliv polimorfizma -2957A>G na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	MKG <sub>fn</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP** [μg/l]	OPG [pmol/l]
<b>alel</b> <b>A</b>	0,622 (0,608 do 0,636) N=155	0,750 (0,734 do 0,766) N=154	0,746 (0,732 do 0,759) N=155	0,23* (0,16 do 0,33) N=22	26,37 (23,73 do 29,01) N=81	3970 (3348 do 4593) N=43	13,05 (11,63 do 14,48) N=72	6,10 (5,63 do 6,56) N=64
<b>alel</b> <b>G</b>	0,628 (0,612 do 0,645) N=74	0,767 (0,745 do 0,788) N=74	0,733 (0,711 do 0,755) N=73	0,28* (0,17 do 0,48) N=18	26,01 (22,14 do 29,88) N=42	4750 (3478 do 6022) N=17	11,55 (10,05 do 13,06) N=38	6,16 (5,46 do 6,86) N=31
<b>p</b>	0,591	0,233	0,584	0,458	0,875	0,212	0,291	0,876

\*geometrična sredina, \*\*Mann-Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica XLIV: Vpliv polimorfizma Pro12Ala na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	MKG <sub>fn</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX [pmol/l]	BALP** [μg/l]	OPG [pmol/l]
<b>alel</b> <b>C</b>	0,618* (0,605 do 0,632) N=154	0,756 (0,740 do 0,771) N=154	0,740 (0,726 do 0,754) N=153	0,35 (0,14 do 0,55) N=39	27,08 (24,32 do 29,84) N=80	4371 (3584 do 5158) N=40	12,18 (11,03 do 13,34) N=73	6,13 (5,68 do 6,59) N=66
<b>alel</b> <b>G</b>	0,615* (0,597 do 0,633) N=86	0,749 (0,729 do 0,769) N=85	0,743 (0,724 do 0,762) N=86	0,34 (0,14 do 0,53) N=23	25,88 (22,16 do 29,60) N=45	4296 (3368 do 5223) N=23	13,39 (11,25 do 15,54) N=39	6,12 (5,50 do 6,74) N=37
<b>p</b>	0,752	0,606	0,941	0,900	0,606	0,903	0,682	0,967

\*geometrična sredina, \*\*Mann-Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica XLV: Vpliv haplotipa AC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

AC	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>is</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP** [µg/l]	OPG [pmol/l]
<b>0</b>	0,635 (0,615 do 0,654) N=36	0,771 (0,741 do 0,801) N=35	0,761 (0,729 do 0,793) N=36	0,38* (0,23 do 0,67) N=10	22,92 (22,56 do 33,28) N=17	5037 (3306 do 6769) N=9	13,32 (9,74 do 16,90) N=15	5,60 (4,44 do 6,75) N=14
<b>1</b>	0,620 (0,604 do 0,636) N=102	0,752 (0,734 do 0,770) N=102	0,730 (0,713 do 0,747) N=101	0,21* (0,13 do 0,36) N=17	25,13 (21,83 do 28,42) N=61	4395 (3410 do 5380) N=26	12,39 (10,79 do 13,98) N=53	6,38 (5,87 do 6,89) N=46
<b>2</b>	0,625 (0,606 do 0,644) N=91	0,754 (0,731 do 0,776) N=91	0,747 (0,729 do 0,764) N=91	0,22* (0,13 do 0,37) N=13	27,13 (23,66 do 30,60) N=45	3675 (2950 do 4399) N=25	12,44 (10,83 do 14,06) N=42	5,98 (5,29 do 6,67) N=35
<b>p</b>	0,644	0,601	0,573	0,216	0,583	0,223	0,997	0,338

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, brez oznake – ANOVA

**Preglednica XLVI: Vpliv haplotipa AG na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

AG	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>is</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL** [pmol/l]	OC [µg/l]	CTX [pmol/l]	BALP** [µg/l]	OPG [pmol/l]
<b>0</b>	0,619* (0,605 do 0,633) N=147	0,758 (0,741 do 0,774) N=147	0,741 (0,726 do 0,755) N=146	0,25 (0,15 do 0,35) N=35	26,73 (24,02 do 29,44) N=79	4099 (3380 do 4817) N=38	12,10 (10,94 do 13,27) N=72	6,12 (5,62 do 6,61) N=61
<b>1</b>	0,617* (0,597 do 0,637) N=70	0,750 (0,728 do 0,772) N=70	0,733 (0,714 do 0,753) N=70	0,30 (0,07 do 0,52) N=17	24,76 (20,94 do 28,58) N=40	4219 (3170 do 5267) N=19	12,88 (10,75 do 15,00) N=35	6,22 (5,58 do 6,85) N=29
<b>2</b>	0,623* (0,582 do 0,667) N=12	0,760 (0,704 do 0,817) N=11	0,804 (0,739 do 0,868) N=12	0,23 (-0,01 do 0,46) N=4	31,53 (10,97 do 52,09) N=4	5193 (-883 do 11269) N=3	18,93 (-8,99 do 46,84) N=3	5,52 (2,39 do 8,64) N=5
<b>p</b>	0,965	0,860	0,053	0,853	0,474	0,707	0,492	0,743

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, brez oznake – ANOVA

**Preglednica XLVII: Vpliv haplotipa GC na MKG in biokemične kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave.**

GC	MKG <sub>in</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> ** [kg/m <sup>2</sup> ]	RANKL*** [pmol/l]	OC [μg/l]	CTX*** [pmol/l]	BALP** [μg/l]	OPG [pmol/l]
<b>0</b>	0,622 (0,608 do 0,636) N=155	0,750 (0,734 do 0,766) N=154	0,746 (0,732 do 0,759) N=155	0,23* (0,16 do 0,33) N=22	26,37 (23,73 do 29,01) N=81	3970 (3348 do 4593) N=43	13,05 (11,63 do 14,48) N=72	6,10 (5,63 do 6,56) N=64
<b>1</b>	0,628 (0,610 do 0,646) N=68	0,765 (0,742 do 0,788) N=68	0,734 (0,710 do 0,758) N=67	0,26* (0,15 do 0,47) N=16	25,54 (21,27 do 29,82) N=37	4524 (3231 do 5818) N=15	11,36 (9,74 do 12,97) N=34	6,19 (5,40 do 6,99) N=27
<b>2</b>	0,636 (0,616 do 0,656) N=6	0,784 (0,756 do 0,812) N=6	0,729 (0,668 do 0,790) N=6	/	29,46 (18,17 do 40,75) N=5	/	13,21 (6,48 do 19,94) N=4	5,94 (4,20 do 7,67) N=4
<b>p</b>	0,844	0,444	0,836	0,607	0,785	0,384	0,430	0,956

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis test, \*\*\*t-test, brez oznake – ANOVA

V skupini osteoporoznih preiskovank nismo odkrili statistično značilnih vplivov polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njihovih haplotipov na MKG in biokemične kazalce kostne premene. Tako kot mi tudi Harsløf in sod. v študiji AROS, ki je vključevala 462 preiskovancev (moških in žensk) obolelih za osteoporozo, niso ugotovili povezave polimorfizmov -2957A>G in Pro12Ala z MKG (46).

#### **4.6 VPLIV POLIMORFIZMOV PRO12ALA IN -2957A>G TER NJUNIH HAPLOTIPOV NA POJAV NIZKOENERGIJSKEGA ZLOMA**

Ocenili smo vpliv polimorfizmov -2957A>G in Pro12Ala ter njihovih haplotipov na pojav nizkoenergijskega zloma. S tem namenom smo v statistično obdelavo vključili 163 preiskovancev brez dokumentiranega nizkoenergijskega zloma (kontrolna skupina) in 110 preiskovancev z dokumentiranim nizkoenergijskim zlomom. Z metodo binarne logistične regresije, s katero pojasnjujemo rezultate v binarni odvisni spremenljivki z nizom neodvisnih spremenljivk, smo s pomočjo statističnega programa SPSS sestavili model za ocenjevanje vpliva posameznih parametrov na pojav nizkoenergijskih zlomov. Odvisno spremenljivko je v vseh primerih predstavljal podatek o prisotnosti/odsotnosti kateregakoli

nizkoenergijskega zloma, neodvisne spremenljivke oz. napovedni parametri pa so bili starost, spol, ITM in polimorfizem -2957A>G, polimorfizem Pro12Ala, haplotip AC, haplotip AG ali haplotip GC.

#### 4.6.1 VPLIV POLIMORFIZMA -2957A>G

Z metodo binarne logistične regresije smo ocenili vpliv polimorfizma -2957A>G, spola, starosti in ITM na tveganje za pojav nizkoenergijskega zloma (*Preglednica XLVIII*). Model je bil statistično značilen ( $p < 0,001$ ) in je v 78,2 % pravilno napovedal pojav nizkoenergijskega zloma. Obeti za nizkoenergijski zlom pri nosilcih alela G so 2,3x manjši kot obeti za zlom pri nosilcih alela A ( $p = 0,025$ ). Obeti za zlom so večji pri ženskah ( $p = 0,005$ ) in se večajo s starostjo ( $p < 0,001$ ).

***Preglednica XLVIII: Ocena vpliva polimorfizma -2957A>G ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo.***

	B	p-vrednost	Razmerje obetov	IZ <sub>95%</sub> za razmerje obetov	
				spodnji	zgornji
starost	0,12	<b>&lt;0,001</b>	1,13	1,09	1,17
spol	0,97	<b>0,005</b>	2,63	1,33	5,21
ITM	-0,05	0,256	0,96	0,88	1,03
-2957A>G	-0,83	<b>0,025</b>	0,44	0,21	0,90

Harsløf in sod. so v študiji AROS, ki je vključevala 454 žensk in 120 moških, heterozigote za polimorfizem -2957A>G povezali z vertebralnimi zlomi (46). V naši študiji na 273 preiskovancih smo ugotovili povezanost polimorfizma -2957A>G z nizkoenergijskimi zlomi, vendar je v nasprotju z ugotovitvami Harsløfa in sod. prisotnost mutiranega alela zmanjšala obete za pojav nizkoenergijskih zlomov.

#### 4.6.2 VPLIV POLIMORFIZMA PRO12ALA

Z metodo binarne logistične regresije smo ocenili vpliv polimorfizma Pro12Ala, spola, starosti in ITM na verjetnost za pojav nizkoenergijskega zloma (*Preglednica XLIX*). Model, je bil statistično signifikanten ( $p < 0,001$ ) in je v 74,5 % pravilno napovedal pojav nizkoenergijskega zloma. Obeti za zlom so večji pri ženskah ( $p = 0,007$ ) in se večajo s starostjo ( $p < 0,001$ ).

**Preglednica XLIX: Ocena vpliva polimorfizma Pro12Ala ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo.**

	B	p-vrednost	Razmerje obetov	IZ <sub>95%</sub> za razmerje obetov	
				spodnji	zgornji
starost	0,11	<0,001	1,11	1,08	1,16
spol	0,93	0,007	2,53	1,30	4,96
ITM	-0,03	0,373	0,97	0,90	1,04
Pro12Ala	0,23	0,459	1,26	0,68	2,33

#### 4.6.3 VPLIV HAPLOTIPA AC

Z metodo logistične regresije smo ocenili vpliv števila kopij haplotipa AC, spola, starosti in ITM na verjetnost za pojav nizkoenergijskega zloma (*Preglednica L*). Model je bil statistično signifikanten ( $p < 0,001$ ) in je v 76,2 % pravilno napovedal pojav nizkoenergijskega zloma. Obeti za zlom so večji pri ženskah ( $p = 0,007$ ) in se večajo s starostjo ( $p = 0,007$ ).

**Preglednica L: Ocena vpliva števila kopij haplotipa AC ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo.**

	B	p-vrednost	Razmerje obetov	IZ <sub>95%</sub> za razmerje obetov	
				spodnji	zgornji
starost	0,12	<0,001	1,13	1,09	1,17
spol	0,95	0,007	2,58	1,30	5,13
ITM	-0,05	0,184	0,95	0,88	1,03
hap AC (1)	0,49	0,372	1,64	0,55	4,85
hap AC (2)	0,64	0,245	1,90	0,64	5,63

#### 4.6.4 VPLIV HAPLOTIPA AG

Z metodo logistične regresije smo ocenili vpliv števila kopij haplotipa AG, spola, starosti in ITM na tveganje za pojav nizkoenergijskega zloma (*Preglednica LI*). Model je bil statistično značilen ( $p < 0,001$ ) in je v 74,6 % pravilno napovedal pojav nizkoenergijskega zloma. Obeti za zlom so večji pri ženskah ( $p = 0,004$ ) in se večajo s starostjo ( $p < 0,001$ ).



**Preglednica LI: Ocena vpliva števila kopij haplotipa AG ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo.**

	B	p-vrednost	Razmerje obetov	IZ <sub>95%</sub> za razmerje obetov	
				spodnji	zgornji
starost	0,12	<0,001	1,13	1,09	1,17
spol	1,01	0,004	2,74	1,38	5,45
ITM	-0,05	0,200	0,95	0,88	1,03
hap AG(1)	0,20	0,563	1,22	0,63	2,36
hap AG(2)	0,47	0,526	1,60	0,38	6,81

#### 4.6.5 VPLIV HAPLOTIPA GC

Z metodo logistične regresije smo ocenili vpliv števila kopij haplotipa GC, spola, starosti in ITM na tveganje za pojav nizkoenergijskega zloma (*Preglednica LII*). Model je bil statistično signifikanten ( $p < 0,001$ ) in je v 78,6 % pravilno napovedal pojav nizkoenergijskega zloma. Obeti za nizkoenergijski zlom pri nosilcih ene kopije haplotipa GC so 2,1x manjši kot obeti za zlom pri preiskovancih brez GC ( $p = 0,025$ ). Obeti za zlom so večji pri ženskah ( $p = 0,006$ ) in se večajo s starostjo ( $p < 0,001$ ).

**Preglednica LII: Ocena vpliva števila kopij haplotipa GC ter spola, starosti in ITM na pojav zlomov z logistično regresijo.**

	B	p-vrednost	Razmerje obetov	IZ <sub>95%</sub> za razmerje obetov	
				spodnji	zgornji
starost	0,12	<0,001	1,13	1,09	1,17
spol	0,97	0,006	2,64	1,33	5,24
ITM	-0,05	0,263	0,96	0,88	1,03
hap GC(1)	-0,76	0,042	0,47	0,22	0,97
hap GC(2)	-1,87	0,162	0,15	0,01	2,13

## 4.7 OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV PRO12ALA IN -2957A>G TER NJUNIH HAPLOTIPOV Z ODZIVNOSTJO NA ZDRAVLJENJE

V našo raziskavo je bilo vključenih 109 osteoporoznih pomenopavznih žensk, ki so se zdravile z alendronatom (53 preiskovank) ali raloksifenom (56 preiskovank). Želeli smo ugotoviti ali polimorfizma Pro12Ala in -2957A>G ter njuni haplotipi vplivajo na odzivnost zdravljenja z alendronatom ali raloksifenom.

## 4.7.1 ZDRAVLJENJE Z ALENDRONATOM

V statistično obdelavo smo vključili 53 osteoporoznih pomenopavznih preiskovank (osnovne lastnosti so podane v *Preglednici XIX*), ki so se zdravile z alendronatom. V *Preglednicah LIII do LVI* so podane vrednosti sprememb MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene po enem letu zdravljenja in rezultati statistične obdelave.

**Preglednica LIII: Vpliv polimorfizma -2957A>G na odzivnost na zdravljenje z alendronatom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	dMKG <sub>tot</sub> [%]	dMKG <sub>ls</sub> [%]	dOC [%]	dBALP [%]	dDPYR [%]
<b>alel A</b>	3,97* (3,02 do 1,92) N=27	5,60* (4,62 do 6,77) N=27	52,19* (45,58 do 59,76) N=28	37,69* (32,96 do 43,10) N=24	65,51* (55,36 do 77,52) N=30
<b>alel G</b>	3,15* (2,27 do 4,37) N=15	8,07* (6,17 do 10,55) N=15	52,46* (42,23 do 65,17) N=17	43,56* (27,53 do 68,92) N=10	62,31* (49,82 do 77,94) N=17
<b>p</b>	0,284	<b>0,024</b>	0,965	0,382	0,713

\*geometrična sredina, brez oznake – t-test

Statistična obdelava podatkov pri preiskovankah, zdravljenih z alendronatom, je pokazala vpliv polimorfizma -2957A>G na spremembo vrednosti MKG ledvenih vretenc po enem letu (*Preglednica LIII*). MKG ledvenih vretenc se je po enem letu statistično značilno bolj povečala (p=0,024) pri preiskovankah z vsaj eno kopijo alela G kot pri preiskovankah z alelom A.

**Preglednica LIV: Vpliv polimorfizma Pro12Ala na odzivnost na zdravljenje z alendronatom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	dMKG <sub>tot</sub> [%]	dMKG <sub>ls</sub> [%]	dOC [%]	dBALP** [%]	dDPYR [%]
<b>alel C</b>	3,81* (2,99 do 4,85) N=28	7,32 (5,80 do 8,84) N=31	53,68* (45,92 do 62,75) N=31	43,68 (29,56 do 57,81) N=23	64,99* (55,21 do 76,49) N=31
<b>alel G</b>	3,37* (2,191 do 5,17) N=14	5,07 (2,17 do 7,98) N=14	49,35* (43,44 do 56,06) N=14	44,56 (33,58 do 55,53) N=11	63,10* (49,68 do 80,14) N=16
<b>p</b>	0,575	0,123	0,389	0,308	0,831

\*geometrična sredina, \*\*Mann-Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica LV: Vpliv haplotipa AC na odzivnost na zdravljenje z alendronatom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

AC	dMKG <sub>tot</sub> [%]	dMKG <sub>ls</sub> [%]	dOC [%]	dBALP** [%]	dDPYR** [%]
<b>0</b>	2,66* (1,92 do 3,70) N=6	6,18 (0,17 do 12,19) N=6	50,36* (34,92 do 72,62) N=6	57,20 (4,32 do 110,08) N=3	54,43 (35,42 do 73,42) N=6
<b>1</b>	3,61* (2,48 do 5,24) N=19	6,90 (4,49 do 9,32) N=21	52,85* (45,09 do 61,95) N=21	46,13 (24,40 do 67,86) N=15	75,68 (61,26 do 90,11) N=23
<b>2</b>	4,145* (3,051 do 5,631) N=17	6,44 (4,89 do 7,99) N=18	52,31* (42,32 do 64,64) N=18	39,45 (32,22 do 46,68) N=16	69,64 (54,66 do 84,62) N=18
<b>p</b>	0,377	0,923	0,963	0,219	0,359

\*geometrična sredina, \*\*Kruskal Wallis, brez oznake – ANOVA

**Preglednica LVI: Vpliv haplotipa AG na odzivnost na zdravljenje z alendronatom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

AG	dMKG <sub>tot</sub> [%]	dMKG <sub>ls</sub> [%]	dOC [%]	dBALP** [%]	dDPYR [%]
<b>0</b>	3,81* (2,99 do 4,85) N=28	7,32 (5,80 do 8,84) N=31	53,68 (45,92 do 62,75) N=31	43,68 (29,56 do 57,81) N=23	64,99 (55,21 do 76,49) N=31
<b>1</b>	3,37* (2,19 do 5,17) N=14	5,07 (2,17 do 7,98) N=14	49,35 (43,44 do 56,06) N=14	44,56 (33,58 do 55,53) N=11	63,10 (49,68 do 80,14) N=16
<b>p</b>	0,575	0,123	0,389	0,308	0,831

\*geometrična sredina, \*\*Mann Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica LVII: Vpliv haplotipa GC na odzivnost na zdravljenje z alendronatom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

GC	dMKG <sub>tot</sub> [%]	dMKG <sub>ls</sub> [%]	dOC [%]	dBALP** [%]	dDPYR** [%]
<b>0</b>	3,97* (3,01 do 5,22) N=27	5,60* (4,62 do 6,77) N=27	52,19* (45,58 do 59,76) N=28	37,69* (32,96 do 43,10) N=24	65,51* (60,58 do 77,52) N=30
<b>1</b>	3,15* (2,27 do 4,37) N=15	8,07* (6,17 do 10,55) N=15	52,46* (42,23 do 65,17) N=17	43,56* (27,53 do 68,92) N=10	62,31* (49,82 do 77,94) N=17
<b>p</b>	0,284	<b>0,024</b>	0,965	0,382	0,713

\*geometrična sredina, brez oznake - t-test

Statistična obdelava je pokazala vpliv števila kopij haplotipa GC na spremembo vrednosti MKG ledvenih vretenc po enem letu zdravljenja z alendronatom (Preglednica LVII). MKG ledvenih vretenc se je statistično značilno bolj povečala ( $p=0,024$ ) pri preiskovankah z eno kopijo GC kot pri preiskovankah z nobeno kopijo GC. V obeh primerih se vrednost MKG ledvenih vretenc po enem letu bolj poveča pri preiskovankah s prisotnim alelom G. Sklepamo lahko, da prisotnost vsaj enega alela G v primeru polimorfizma -2957A>G

poveča odzivnost na zdravljenje z alendronatom. Rezultate bi bilo potrebno preveriti na večjem številu preiskovancev.

Preostali rezultati statistične obdelave niso pokazali statistično značilnega vpliva polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njihovih haplotipov na spremembe vrednosti MKG kolka in biokemičnih kazalcev kostne premene po enem letu zdravljenja z alendronatom.

#### 4.7.2 ZDRAVLJENJE Z RALOKSIFENOM

V statistično obdelavo smo vključili 56 osteoporoznih pomenopavznih preiskovank osnovne lastnosti so podane v *Preglednici XIX*, ki so se zdravile z raloksifenom. V *Preglednicah LVIII do LXII* so podane vrednosti sprememb MKG in biokemičnih kazalcev kostne gostote po enem letu zdravljenja z raloksifenom in rezultati statistične obdelave podatkov.

**Preglednica LVIII: Vpliv polimorfizma -2957A>G na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	dMKG <sub>tot</sub> <sup>**</sup> [%]	dMKG <sub>ls</sub> <sup>**</sup> [%]	dMKG <sub>fn</sub> <sup>**</sup> [%]	dOC [%]	dBALP [%]
<b>alel A</b>	1,57 (-1,25 do 4,39) N=35	1,30 (-0,41 do 3,01) N=35	1,12 (-0,74 do 2,99) N=35	-23,26 (-29,88 do -16,63) N=35	-23,70 (-32,22 do -15,18) N=29
<b>alel G</b>	-6,24 (-19,57 do 7,10) N=16	3,43 (1,65 do 5,21) N=16	2,22 (-0,67 do 5,11) N=16	-28,15 (-35,47 do -20,83) N=15	-27,00 (-36,06 do -17,94) N=15
<b>p</b>	0,570	0,054	0,490	0,376	0,617

<sup>\*\*</sup> Mann Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica LIX: Vpliv polimorfizma Pro12Ala na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

	dMKG <sub>tot</sub> <sup>**</sup> [%]	dMKG <sub>ls</sub> <sup>**</sup> [%]	dMKG <sub>fn</sub> [%]	dOC [%]	dBALP [%]
<b>alel C</b>	-1,33 (-7,86 do 5,20) N=35	2,22 (0,61 do 3,84) N=35	1,30 (-0,34 do 2,93) N=35	-26,32 (-33,06 do -19,58) N=34	-22,36 (-30,21 do -14,51) N=31
<b>alel G</b>	0,69 (-0,52 do 1,89) N=18	1,71 (-0,43 do 3,85) N=18	2,15 (-1,05 do 5,35) N=18	-24,04 (-31,50 do -16,57) N=18	-29,87 (-38,96 do -20,79) N=15
<b>p</b>	0,625	0,940	0,587	0,664	0,238

<sup>\*\*</sup> Mann Whitney test, brez oznake – t-test

**Preglednica LX: Vpliv haplotipa AC na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

AC	dMKG <sub>tot</sub> ** [%]	dMKG <sub>ls</sub> ** [%]	dMKG <sub>fn</sub> [%]	dOC** [%]	dBALP [%]
<b>0</b>	2,25 (-1,57 do 6,07) N=5	4,05 (1,48 do 6,64) N=5	1,57 (-2,57 do 5,71) N=5	-27,05 (-39,62 do -14,49) N=4	-24,90 (-54,49 do 4,69) N=3
<b>1</b>	-3,97 (-11,57 do 3,63) N=27	2,10 (0,43 do 3,78) N=27	2,20 (-0,36 do 4,75) N=27	-25,52 (-31,45 do -19,58) N=27	-29,97 (-36,92 do -23,01) N=25
<b>2</b>	2,68 (-2,61 do 7,97) N=19	1,23 (-1,42 do 3,88) N=19	0,40 (-1,55 do 2,36) N=19	-23,11 (-34,02 do -12,20) N=19	-16,78 (-29,91 do -3,64) N=16
<b>p</b>	0,368	0,132	0,551	0,792	0,130

\*\*Kruskal Wallis, brez oznake – ANOVA

**Preglednica LXI: Vpliv haplotipa AG na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

AG	dMKG <sub>tot</sub> ** [%]	dMKG <sub>ls</sub> ** [%]	dMKG <sub>fn</sub> [%]	dOC [%]	dBALP [%]
<b>0</b>	-1,52 (-8,24 do 5,19) N=34	2,18 (0,52 do 3,85) N=34	1,24 (-0,44 do 2,93) N=34	-25,63 (-32,43 do -18,83) N=33	-21,98 (-30,07 do -13,89) N=30
<b>1</b>	0,40 (-0,71 do 1,52) N=17	1,54 (-0,70 do 3,79) N=17	1,91 (-1,45 do 5,28) N=17	-22,97 (-30,56 do -15,38) N=17	-30,92 (-40,44 do -21,39) N=14
<b>p</b>	0,675	0,905	0,681	0,620	0,179

\*\*Mann Whitney, brez oznake – t-test

**Preglednica LXII: Vpliv haplotipa GC na odzivnost na zdravljenje z raloksifenom: Prikaz srednjih vrednosti in IZ<sub>95%</sub> ter rezultatov statistične obdelave .**

GC	dMKG <sub>tot</sub> ** [%]	dMKG <sub>ls</sub> ** [%]	dMKG <sub>fn</sub> ** [%]	dOC [%]	dBALP [%]
<b>0</b>	1,57 (-1,25 do 4,39) N=35	1,30 (-0,41 do 3,01) N=35	1,12 (-0,74 do 2,99) N=45	-23,26 (-29,88 do -16,63) N=35	-23,70 (-32,22 do -15,18) N=29
<b>1</b>	-6,24 (-19,57 do 7,10) N=16	3,43 (1,65 do 5,21) N=16	2,22 (-0,67 do 5,11) N=16	-28,15 (-35,47 do -20,83) N=15	-27,00 (-36,06 do -17,94) N=15
<b>p</b>	0,570	0,054	0,490	0,376	0,617

\*\*Mann Whitney, brez oznake – t-test

Rezultati statistične obdelave niso pokazali statistično značilnega vpliva polimorfizmov Pro12Ala in -2957A>G ter njihovih haplotipov na spremembe vrednosti MKG kolka in vratu stegenice ter biokemičnih kazalcev kostne premene po enem letu zdravljenja z raloksifenom.

## 5 SKLEP

V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti povezanost polimorfizmov -2957A>G in Pro12Ala ter njunih haplotipov z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene in pojavnostjo nizkoenergijskih zlomov. Ugotoviti smo poskušali tudi njihov vpliv na odzivnost zdravljenja z alendronatom in raloksifenom. V raziskavo smo vključili 734 preiskovancev, ki smo jim določili genotip za polimorfizem -2957A>G s pomočjo analize HRM in genotip za polimorfizem Pro12Ala z metodo alelne diskriminacije.

Dokazali smo povezanost polimorfizma -2957A>G s koncentracijo RANKL pri pomenopavznih preiskovankah, in sicer so srednje vrednosti RANKL statistično značilno višje v primeru prisotnosti vsaj enega mutiranega alela ( $p=0,011$ ). Za ostale biokemične kazalce kostne kostote in MKG nismo dokazali statistično značilne povezanosti s polimorfizmom -2957A>G. Ugotovili smo vpliv polimorfizma -2957A>G na pojav nizkoenergijskega zloma, in sicer prisotnost mutiranega alela zmanjša obete za pojav nizkoenergijskega zloma ( $p=0,025$ ). Ugotovili smo tudi vpliv polimorfizma -2957A>G na odzivnost na zdravljenje z alendronatom. MKG ledvenih vretenc se je po enoletnem zdravljenju z alendronatom pri statistično značilno povečala ( $p=0,024$ ) pri pomenopavznih preiskovankah s prisotnim vsaj enim alelom G. Prav tako smo ugotovili statistično značilno povečanje ( $p=0,024$ ) MKG ledvenih vretenc po enoletnem zdravljenju pri pomenopavznih preiskovankah z eno kopijo haplotipa GC v primerjavi s preiskovankami z nobeno kopijo GC.

Za polimorfizem Pro12Ala nismo dokazali statistično značilne povezanosti z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene. Prav tako polimorfizma Pro12Ala nismo uspeli povezati s pojavnostjo nizkoenergijskega zloma in odzivnostjo na zdravljenje z alendronatom ali raloksifenom.

Povezanost haplotipov (AC, AG in GC) z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene smo ugotovili v naslednjih primerih:

- pri moških preiskovancih smo ugotovili statistično značilno povezavo ( $p=0,040$ ) števila kopij haplotipa AC s srednjimi vrednostmi osteoprotegerina, in sicer so bile vrednosti

osteoprotegerina v skupini z dvema kopijama AC statistično značilno ( $p=0,002$ ) nižje od vrednosti pri skupini z nobeno kopijo AC;

- pri pomenopavznih preiskovankah smo ugotovili statistično značilno povezavo ( $p=0,013$ ) števila kopij haplotipa GC s srednjimi vrednostmi RANKL, le-te so višje pri preiskovankah z eno kopijo GC v primerjavi s preiskovankami z nobeno kopijo GC ( $p=0,004$ );
- pri zdravih pomenopavznih preiskovankah smo ugotovili statistično značilno povezavo ( $p=0,012$ ) števila kopij haplotipa AG s srednjimi vrednostmi osteokalcina, le-te so bile višje pri preiskovankah z dvema kopijama AG v primerjavi s preiskovankami z eno kopijo AG ( $p=0,028$ );

Medtem ko polimorfizma Pro12Ala nismo uspeli povezati z osteoporoznim fenotipom in odzivnostjo na zdravljenje z zdravili, smo pri polimorfizmu -2957A>G ugotovili pomembno povezavo z odzivnostjo na zdravljenje z alendronatom kot tudi z obeti za pojav nizkoenergijskega zloma, vendar pa bi bilo naše ugotovitve potrebno potrditi na večjem številu preiskovancev. Naši rezultati predstavljajo majhen prispevek k pojasnjevanju številnih genetskih vplivov na nastanek osteoporoze. V prihodnosti bi bilo smiselno ovrednotiti tudi druge polimorfizme v genu za PPAR $\gamma$ , študije pa bi bilo potrebno razširiti še na druge etnične skupine.

## 6 LITERATURA

1. Kocijančič A: Presnovne bolezni kosti V: Kocijančič A, Mrevlje F: Interna medicina. EWO d.o.o. in DZS d.d., Ljubljana, 1998: 711-736.
2. Hammett-Stabler CA: Osteoporosis, from pathophysiology to treatment: special topics in diagnostic testing. AACCPress, 2004: 1-19.
3. Manolagas SC: Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 115-137.
4. WHO Scientific Group: Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group. WHO technical report series, Geneva, 2000: 1-176.
5. Raisz LE: Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; 45(8B): 1353-1358.
6. Kocijančič A: Osteoporoza. 1. natis, Posebne edicije Feniks, Ljubljana 1989.
7. Mednarodno združenje za osteoporozo. Dostopno na: <http://www.iofbonehealth.org> (avg 2010)
8. Žorž G: Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. *ISIS* 2006; XV (3): 34-37.
9. Franič D: Novi vidiki diagnostike in zdravljenja osteoporoze. *Zdrav Vestn* 2009; 78: I-143-50.
10. Ralston SH: Genetic control of susceptibility of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2460-2466.
11. Ralston SH, Crombrughe B: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Gen & Dev* 2006; 20: 2432-2506.
12. Kocijančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. *Zdrav Vestn* 2002; 71: 571-3.
13. Guglielmi G, Scalzo G: Accurate and reproducible methods of quantifying bone density can help predict fracture risk, determine therapeutic intervention and monitor response. Dostopno na: <http://www.diagnosticimaging.com/display/article/113619/1565165?pageNumber=1> , (avg 2010)
14. Eastell R, Hannon RA: Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc* 2008; 67: 157-162.



15. Seibel MJ: Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 2005; 26: 97-122.
16. Garnero P: Advances in bone turnover assesment with biochemical markers. *Medicographia* 2008; 30(4): 339-49.
17. Zieleniak A, Wojcik M, Wozniak LA: Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Arch Immunol Ther Exp* 2008; 56: 331-345.
18. Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr Rew* 20(5): 649-688.
19. Knouff C, Auwerx J: Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  calls for activation in moderation: Lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev* 25(6):899-918.
20. Dostopno na: [http://nrresource.org/drawings/ppargamma\\_pathway.html](http://nrresource.org/drawings/ppargamma_pathway.html) (nov 2010)
21. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ: Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66: 236-253.
22. Lecka-Czernik B, Suva LJ: Resolving two "bony" faces of PPAR $\gamma$ . *Hindawi Publishing Corporation PPAR Research, Volume 2006: 1-9.*
23. Ackert-Bicknell C, Rosen C: The genetics of PPARG and the skeleton. *Hindawi Publishing Corporation, Volume 2006: 1-8.*
24. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H: PPAR $\gamma$  insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113(6): 846-855.
25. Grey A: Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporos Int* 2008; 19: 129-137.
26. Rhee EJ, Oh KW, Yun EJ, Jung CH, Park CY, Lee WY, Oh ES, Baek KH, Kang MI, Park SW, Kim SW: The association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene with serum osteoprotegerin levels in healthy Korean women. *Exp Mol Med* 2007; 39(6): 696-704.
27. Tamaki J, Iki M, Morita A, Ikeda Y, Sato Y, Kajita E, Kagamimori S, Kagawa Y, Yoneshima H: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphism is related to peak bone mass: the JPOS study. *Osteoporos Int* 2010; 21: 321-329.

28. Muller YL, Bogardus C, Beamer BA, Schuldiner AR, Baier LJ: A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 2003; 52: 1864-1871.
29. Costa V, Casamassimi A, Esposito K, Villani A, Capone M, Iannella R, Schisano B, Ciotola M, Di Palo C, Corrado Capone F, Santangelo F, Giugliano D, Ciccodicola A: Characterization of a novel polymorphism in PPAR $\gamma$  regulatory region associated with type 2 diabetes and diabetic retinopathy in Italy. *J Biomed Biotechnol* 2009, 126917.
30. Kurent L: Povezanost polimorfizmov -1227C>T in -1734C>T v promotorju gena za pleiotropin z mineralno kostno gostoto in biokemijskimi kazalci kostne premene. *Diplomska naloga*, Ljubljana 2010.
31. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215-220.
32. Slanc P: Genska informacija in kako do nje V: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 25-66.
33. TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays Reference Manual, ABI Applied Biosystems 2007. Part number 4371304 Rev. B. Dostopno na: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042798.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042798.pdf) (dec 2010)
34. TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix Protocol, ABI Applied Biosystems 2002. Part number 4304449 Rev. D. Dostopno na: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042996.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042996.pdf) (dec 2010)
35. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT: High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007; 8(6): 597-608.
36. LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System Technical Note No. 1: High resolution melting: Optimization strategies. Roche Diagnostics GmbH 2008. Dostopno na: [https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/htc/htc\\_docs/LC480\\_Technical%20Note%201\\_HRM.pdf](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/htc/htc_docs/LC480_Technical%20Note%201_HRM.pdf) (dec 2010)
37. Žuran T: Povezanost polimorfizma 245T>G v genu za osteoprotegerin z mineralno kostno gostoto in biokemijskimi kazalci kostne premene. *Diplomska naloga*, Ljubljana 2009.

38. Dunnen JT, Antonarakis SE: Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *Hum Mut* 2000; 15: 7-12.
39. GenElute™ PCR Clean-Up Kit Technical Bulletin, Sigma Aldrich. Product Code NA1020. Dostopno na: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/na1020bul.Par.0001.File.tmp/na1020bul.pdf> (dec 2010)
40. LightCycler® 480 High Resolution Melting Master, Roche Applied Science 2009. Cat. No. 04 909 631 001. Dostopno na: <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/4909631a.pdf> (dec 2010)
41. Primer-BLAST program za načrtovanje začetnih oligonukleotidov. NCBI. Dostop na: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=NcbiHomeAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=NcbiHomeAd)
42. Hamilton MB: Population genetics. Wiley-Blackwell, 2009: 9-28
43. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P: PHASE: software for haplotype reconstruction and recombination rate estimation from population data, version 2.1. Seattle 2004. Dostopno na: <http://stephenslab.uchicago.edu/software.html> (dec 2010)
44. Program EMLD, dostopno na: <https://cge.mdanderson.org/~qhuang/Software/pub.htm>
45. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M: Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature reviews* 2002; 3: 299-309.
46. Harsløf T., Tofteng CL, Husted LB, Nyegaard M, Børglum A, Carstens M, Stenkjær L, Brixen K, Eiken P, Jensen JB, Mosekilde L, Rejnmark L, Langdahl BL: Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  gene are associated with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2010; DOI 10.1007/s00198-010-1491-z: 1-12.

## 7 PRILOGE

## 7.1 REZULTATI GENOTIPIZACIJE

Številka vzorca	Oznaka študije	Genotip za polimorfizem	
		Pro12Ala	-2957A>G
587	ralo	CG	AA
588	ralo	CC	AA
589	ralo	CG	AA
591	ralo	CC	AA
592	ralo	CC	X
593	ralo	CC	AA
594	ralo	CC	AG
595	ralo	CC	AG
596	ralo	CC	AG
597	ralo	CG	AG
598	ralo	CG	AA
600	ralo	CG	AA
601	ralo	CC	AG
602	ralo	CG	AA
603	ralo	CC	AG
604	ralo	CC	AA
605	ralo	CC	AG
606	ralo	CC	AG
607	ralo	CC	AA
608	ralo	CC	AA
609	ralo	CC	AA
610	ralo	CG	AA
611	ralo	CC	AA
612	ralo	CC	AA
613	ralo	CG	AA
615	ralo	CC	AG
616	ralo	CC	AA
617	ralo	CG	AA
618	ralo	CC	AA
619	ralo	CC	AG
620	ralo	GG	AA
621	ralo	CC	AG
623	ralo	CC	AA
624	ralo	CG	AA
625	ralo	CG	AA

626	ralo	CG	AA
627	ralo	CC	AA
628	ralo	CC	GG
629	ralo	CC	AG
630	ralo	CC	AG
631	ralo	CC	AA
632	ralo	X	X
633	ralo	CC	AA
634	ralo	CG	X
635	ralo	CC	GG
636	ralo	CC	AG
637	ralo	CC	AA
639	ralo	CC	AA
659	ralo	CG	AA
660	ralo	X	X
661	ralo	X	X
662	ralo	CG	AA
663	ralo	CC	AA
664	ralo	CC	AA
666	prev.OP	CG	AA
666	ralo	GG	AA
667	prev.OP	CC	AG
667	ralo	CG	AA
669	prev.OP	CG	AG
670	prev.OP	GG	AA
671	prev.OP	CC	AA
673	prev.OP	CC	AA
674	prev.OP	CC	AA
675	prev.OP	CC	X
676	prev.OP	CC	AA
677	prev.OP	GG	AA
678	prev.OP	CC	AG
679	prev.OP	CC	AG
681	prev.OP	CC	AA
682	prev.OP	CG	AA
684	prev.OP	CC	AA
685	prev.OP	CG	AG
687	prev.OP	CC	AG

<b>688</b>	prev.OP	CC	AA
<b>690</b>	prev.OP	CC	AA
<b>691</b>	prev.OP	CC	AA
<b>695</b>	prev.OP	CC	AA
<b>696</b>	prev.OP	CG	AA
<b>697</b>	prev.OP	CC	AA
<b>698</b>	prev.OP	CG	AA
<b>701</b>	prev.OP	CC	AG
<b>703</b>	prev.OP	CC	AA
<b>704</b>	prev.OP	CG	AA
<b>705</b>	prev.OP	CC	AA
<b>706</b>	prev.OP	CC	AA
<b>708</b>	prev.OP	CG	AG
<b>709</b>	prev.OP	CC	AG
<b>710</b>	prev.OP	CC	AG
<b>711</b>	prev.OP	CC	AA
<b>713</b>	prev.OP	CG	AA
<b>715</b>	prev.OP	CC	AG
<b>717</b>	prev.OP	CG	AG
<b>718</b>	prev.OP	CC	AA
<b>719</b>	prev.OP	CC	AG
<b>720</b>	prev.OP	CG	AA
<b>721</b>	prev.OP	CC	AA
<b>722</b>	prev.OP	CC	AA
<b>723</b>	prev.OP	CC	AG
<b>725</b>	prev.OP	CG	AG
<b>726</b>	prev.OP	CC	AA
<b>727</b>	prev.OP	CC	GG
<b>728</b>	prev.OP	CC	AG
<b>729</b>	prev.OP	CG	AA
<b>730</b>	prev.OP	CC	AA
<b>732</b>	prev.OP	CC	AG
<b>733</b>	prev.OP	CC	AA
<b>734</b>	prev.OP	GG	AA
<b>738</b>	prev.OP	CC	AA
<b>741</b>	prev.OP	CG	AA
<b>743</b>	prev.OP	CC	GG
<b>744</b>	prev.OP	CC	AG
<b>745</b>	prev.OP	CC	AA
<b>747</b>	prev.OP	CC	AA
<b>748</b>	prev.OP	CC	AA
<b>749</b>	prev.OP	CC	AA

<b>750</b>	prev.OP	CC	AG
<b>752</b>	prev.OP	CC	AA
<b>753</b>	prev.OP	CG	AG
<b>754</b>	prev.OP	CG	AA
<b>755</b>	prev.OP	CG	X
<b>756</b>	prev.OP	CC	AG
<b>757</b>	prev.OP	CC	X
<b>758</b>	prev.OP	CC	AA
<b>759</b>	prev.OP	CG	AA
<b>761</b>	prev.OP	CC	AA
<b>763</b>	prev.OP	CC	AA
<b>764</b>	prev.OP	CC	X
<b>766</b>	prev.OP	CC	AA
<b>768</b>	prev.OP	CC	X
<b>769</b>	prev.OP	CG	AA
<b>770</b>	prev.OP	CC	AA
<b>771</b>	prev.OP	CG	AA
<b>772</b>	prev.OP	CC	AG
<b>774</b>	prev.OP	CC	AG
<b>775</b>	prev.OP	CC	AA
<b>777</b>	prev.OP	CC	X
<b>778</b>	prev.OP	CG	AA
<b>781</b>	prev.OP	CC	AA
<b>782</b>	prev.OP	CC	AA
<b>783</b>	prev.OP	CC	AA
<b>785</b>	prev.OP	CC	AA
<b>787</b>	prev.OP	CC	AA
<b>788</b>	prev.OP	CG	X
<b>789</b>	prev.OP	CC	X
<b>790</b>	prev.OP	GG	X
<b>793</b>	prev.OP	CC	AA
<b>794</b>	prev.OP	CC	AA
<b>795</b>	prev.OP	CC	AG
<b>796</b>	prev.OP	CG	AA
<b>797</b>	prev.OP	CC	AA
<b>798</b>	prev.OP	CG	AA
<b>801</b>	prev.OP	CC	AG
<b>802</b>	prev.OP	CC	AA
<b>808</b>	prev.OP	CG	AA
<b>809</b>	prev.OP	CG	AA
<b>811</b>	prev.OP	CC	AA
<b>812</b>	prev.OP	CC	AG

<b>813</b>	prev.OP	CC	AG
<b>815</b>	prev.OP	CC	AA
<b>816</b>	prev.OP	CG	AA
<b>817</b>	prev.OP	CC	AA
<b>818</b>	prev.OP	CG	AG
<b>819</b>	prev.OP	CC	AA
<b>820</b>	prev.OP	CC	AG
<b>822</b>	prev.OP	CC	AG
<b>824</b>	prev.OP	CC	AG
<b>827</b>	prev.OP	CG	AA
<b>920</b>	prev.OP	CC	AG
<b>921</b>	prev.OP	CC	AG
<b>923</b>	prev.OP	CC	AA
<b>927</b>	prev.OP	CC	AG
<b>928</b>	prev.OP	CC	AA
<b>929</b>	prev.OP	CC	AA
<b>930</b>	prev.OP	CG	AG
<b>936</b>	prev.OP	CC	AA
938	prev.OP	CC	AA
947	prev.OP	CG	AA
950	prev.OP	CG	AA
955	prev.OP	CG	AA
956	prev.OP	CC	AG
960	prev.OP	CC	AG
961	prev.OP	CC	AG
962	prev.OP	CC	AG
964	prev.OP	CG	AA
966	prev.OP	CG	AA
967	prev.OP	CC	AA
969	prev.OP	CC	AA
970	prev.OP	CC	AA
971	prev.OP	CC	AG
977	prev.OP	CC	AG
983	prev.OP	CG	AA
987	prev.OP	CC	AA
<b>988</b>	prev.OP	CG	AG
<b>990</b>	prev.OP	CG	AA
<b>991</b>	prev.OP	CC	AG
<b>995</b>	prev.OP	CC	AA
<b>997</b>	prev.OP	CC	AA
<b>999</b>	prev.OP	CC	X
<b>1000</b>	prev.OP	CC	AA

<b>1001</b>	opg	CG	AA
<b>1002</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1004</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1004</b>	opg	CC	AA
<b>1005</b>	opg	CC	AA
<b>1005</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1006</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1006</b>	opg	CC	AA
<b>1009</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1010</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1011</b>	opg	CG	AA
<b>1012</b>	prev.OP	CC	AA
1012	opg	CG	AG
<b>1013</b>	opg	GG	AA
<b>1014</b>	opg	CC	AG
<b>1014</b>	prev.OP	CG	AG
<b>1015</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1015</b>	opg	GG	AA
1016	prev.OP	CC	AG
1016	opg	CC	AA
1017	opg	CC	AA
1018	opg	CC	AA
1020	prev.OP	CC	AA
1020	opg	CC	AG
1021	prev.OP	CG	AA
1021	opg	CC	AA
1022	prev.OP	CG	AA
1023	prev.OP	GG	AA
1024	opg	CC	AA
1025	prev.OP	CC	AA
1025	opg	CC	AA
1026	prev.OP	CC	AA
1026	opg	CC	AG
1027	prev.OP	CC	AA
<b>1028</b>	opg	CC	AA
<b>1029</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1030</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1032</b>	opg	CC	AG
<b>1033</b>	prev.OP	CC	GG
<b>1035</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1035</b>	opg	CG	AA
<b>1036</b>	opg	CC	AA

1038	prev.OP	CC	AG
1039	opg	CC	AA
1041	prev.OP	CC	AA
1042	prev.OP	CC	AG
1042	opg	CC	AA
1043	prev.OP	CC	AA
1044	prev.OP	CC	AA
1045	prev.OP	CC	AG
1045	opg	CG	AA
1046	prev.OP	GG	AA
1047	prev.OP	CC	AA
1048	opg	CG	AG
1049	opg	CC	AA
1050	prev.OP	CC	AG
1050	opg	GG	AA
1052	opg	CC	AA
1053	opg	CG	AA
1054	prev.OP	CG	AA
1054	opg	CG	AA
1055	prev.OP	CC	AA
1057	prev.OP	GG	AA
1058	prev.OP	CC	AA
1059	prev.OP	GG	AA
1060	prev.OP	CC	AA
1060	opg	CC	AG
1061	prev.OP	CC	AA
1061	opg	CC	AA
1062	prev.OP	CC	AA
1064	prev.OP	CC	AA
1064	opg	CC	AA
1065	prev.OP	CC	AG
1065	opg	CC	AG
1066	prev.OP	CC	AG
1067	prev.OP	CC	GG
1070	prev.OP	CC	AG
1070	opg	GG	AA
1071	prev.OP	CG	AG
1072	prev.OP	CC	AA
1072	opg	CC	AG
1073	opg	CC	AG
1076	opg	CC	AA
1077	opg	CG	AG

1079	opg	CC	AA
1080	opg	CC	AA
1080	prev.OP	CC	AA
1081	opg	CG	AA
1083	opg	CG	AA
1084	prev.OP	CG	AA
1086	opg	CG	AA
1087	prev.OP	CG	AG
1087	opg	CC	AA
1088	prev.OP	CC	AA
1088	opg	CC	AG
1089	opg	CC	AG
1089	prev.OP	CC	AG
1090	opg	CC	AA
1091	opg	CC	AA
1092	prev.OP	CC	AA
1092	opg	CG	AA
1093	prev.OP	X	X
1093	opg	CG	X
1095	opg	CC	AG
1095	prev.OP	GG	AA
1096	prev.OP	GG	AA
1097	prev.OP	CG	AA
1098	prev.OP	CC	AA
1099	prev.OP	CG	AA
1100	prev.OP	CC	AA
1101	opg	CC	AG
1101	prev.OP	CC	AA
1102	opg	CG	AA
1103	prev.OP	CC	AA
1103	opg	CG	AA
1104	prev.OP	CG	AA
1107	prev.OP	CC	AA
1110	prev.OP	CC	AA
1111	prev.OP	GG	AA
1112	prev.OP	CC	AA
1113	opg	CC	AA
1113	prev.OP	CC	AA
1115	prev.OP	CC	AG
1116	prev.OP	CG	AA
1117	prev.OP	CG	AA
1118	prev.OP	CG	AA

<b>1121</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1123</b>	prev.OP	GG	AA
<b>1126</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1127</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1128</b>	prev.OP	CC	X
<b>1129</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1130</b>	prev.OP	CC	AG
<b>1131</b>	prev.OP	CC	AG
<b>1132</b>	prev.OP	CC	AG
<b>1133</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1134</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1135</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1138</b>	prev.OP	CC	AG
<b>1140</b>	prev.OP	CC	AG
<b>1141</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1142</b>	prev.OP	CC	AA
<b>1145</b>	prev.OP	CG	AG
<b>1146</b>	prev.OP	CC	AG
<b>1149</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1150</b>	prev.OP	CG	AA
<b>1002Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1003Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1004Z</b>	ZIT	CC	X
<b>1005Z</b>	ZIT	CG	AG
<b>1006Z</b>	ZIT	CC	X
<b>1007Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1008Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1009Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>100f</b>	Fosamax	CC	GG
<b>1010Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1011Z</b>	ZIT	CG	X
<b>1012Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>101f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>1021Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1028Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>102f</b>	Fosamax	X	X
<b>1030Z</b>	ZIT	CC	X
<b>1031Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1032Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1033Z</b>	ZIT	CC	GG
<b>1034Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1035Z</b>	ZIT	CC	AG

<b>1036Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1037Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1038Z</b>	ZIT	CG	AG
<b>1039Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>103f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>1040Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1041Z</b>	ZIT	CC	GG
<b>1042Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1043Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1045Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1049Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1051Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1052Z</b>	ZIT	CG	AG
<b>1053Z</b>	ZIT	GG	AA
<b>1054Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1055Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1056Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1057Z</b>	ZIT	CG	AG
<b>1058Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1059Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1060Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1061Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1062Z</b>	ZIT	CC	X
<b>1064Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1065Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1066Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1067Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1068Z</b>	ZIT	GG	AA
<b>1069Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>106f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>1070Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1071Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1072Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1074Z</b>	ZIT	CC	GG
<b>1075Z</b>	ZIT	CG	AG
<b>1076Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1077Z</b>	ZIT	CG	AG
<b>1078Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1079Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1081Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1082Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1083Z</b>	ZIT	CC	AG



<b>1085Z</b>	ZIT	CG	AG
<b>1087Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1088Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1089Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>108f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>1090Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1091Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1092Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1093Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1094Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1095Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1097Z</b>	ZIT	CG	X
<b>1098Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1099Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>109f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>1100Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1101Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1102Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1103Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1104Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>1105Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1106Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>1107Z</b>	ZIT	CC	AG
<b>1108Z</b>	ZIT	CG	AA
<b>110f</b>	Fosamax	CG	AG
<b>1110Z</b>	ZIT	CC	AA
<b>111f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>112f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>113f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>115f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>117f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>118f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>119f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>120f</b>	Fosamax	CG	AG
<b>121f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>122f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>123f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>124f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>125f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>126f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>131f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>134f</b>	Fosamax	CC	AG

<b>135f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>136f</b>	Fosamax	CC	GG
<b>138f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>139f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>140f</b>	Fosamax	CG	AG
<b>141f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>142f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>148f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>149f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>155f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>156f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>158f</b>	Fosamax	CG	AG
<b>159f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>160f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>161f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>163f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>167f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>168f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>170f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>171f</b>	Fosamax	X	X
<b>174f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>175f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>176f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>93f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>94f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>95f</b>	Fosamax	CG	AG
<b>96f</b>	Fosamax	CC	AA
<b>97f</b>	Fosamax	CG	AA
<b>98f</b>	Fosamax	CC	AG
<b>1002</b>	opg	CC	AA
<b>1003</b>	opg	CC	AA
<b>1007</b>	opg	CG	AG
<b>1008</b>	opg	CC	AA
<b>1009</b>	opg	CC	AA
<b>1010</b>	opg	CG	AA
<b>1019</b>	opg	CG	AG
<b>1022</b>	opg	CC	GG
<b>1023</b>	opg	CC	AA
<b>1027</b>	opg	CC	AA
<b>1029</b>	opg	CC	AA
<b>1030</b>	opg	CC	AA
<b>1031</b>	opg	CG	AA

1034	opg	CC	AA
1037	opg	CC	AA
1038	opg	CC	AG
1041	opg	CC	AG
1043	opg	CC	AA
1044	opg	CC	AG
1046	opg	CG	AA
1047	opg	CC	AG
1051	opg	CC	AG
1055	opg	CC	AA
1056	opg	CG	AA
1057	opg	CG	AG
1058	opg	CC	AG
1059	opg	CC	AA
1062	opg	CC	AA
1063	opg	CC	AG
1066	opg	CC	AA
1067	opg	CC	AA
1068	opg	CC	AA
1069	opg	CG	AA
1071	opg	CC	AA
1074	opg	GG	AA
1075	opg	CC	AA
1078	opg	CC	AG
1082	opg	X	X
1084	opg	GG	AA
1085	opg	CC	AA
1094	opg	CC	AA
1097	opg	CC	AA
1099	opg	CG	AA
1100	opg	CG	AA
1104	opg	CC	AA
1105	opg	CC	AA
1106	opg	CC	AG
1107	opg	CC	AG
1108	opg	CC	AA
1109	opg	X	X
1110	opg	CG	AA
1111	opg	CG	AG
1112	opg	CC	AG
1114	opg	CG	AA
1115	opg	CG	AA

1116	opg	CC	AA
1117	opg	CC	AG
668	prev.OP	CC	AA
672	prev.OP	CC	AA
680	prev.OP	CC	AA
683	prev.OP	CC	AA
686	prev.OP	CC	AA
689	prev.OP	CC	AA
692	prev.OP	CC	AA
693	prev.OP	CG	AA
694	prev.OP	CG	AA
699	prev.OP	CC	AG
700	prev.OP	CG	AA
702	prev.OP	CC	AA
707	prev.OP	CC	AA
712	prev.OP	CG	AA
714	prev.OP	CC	AA
716	prev.OP	CC	AG
731	prev.OP	CC	AG
735	prev.OP	CC	AA
736	prev.OP	CG	AA
737	prev.OP	CC	AA
739	prev.OP	CG	AA
740	prev.OP	CC	AA
742	prev.OP	CC	AA
746	prev.OP	CG	AA
751	prev.OP	GG	AA
760	prev.OP	CC	AA
762	prev.OP	CC	AG
765	prev.OP	CC	AG
773	prev.OP	CG	AA
784	prev.OP	X	X
786	prev.OP	CC	AA
792	prev.OP	CG	AA
799	prev.OP	CC	AG
805	prev.OP	CC	AA
806	prev.OP	CC	AG
807	prev.OP	CG	AG
814	prev.OP	CG	AA
821	prev.OP	CG	AG
823	prev.OP	CC	AA
913	prev.OP	CC	AA

914	prev.OP	CG	AG
919	prev.OP	CC	AA
922	prev.OP	GG	AA
924	prev.OP	CG	AG
935	prev.OP	CG	AA
937	prev.OP	CG	AA
940	prev.OP	CC	AA
941	prev.OP	CC	AA
943	prev.OP	CG	AG
944	prev.OP	CG	AA
946	prev.OP	CG	AA
948	prev.OP	CG	AA
951	prev.OP	CC	AA
952	prev.OP	CC	AG
953	prev.OP	CC	AG
957	prev.OP	CC	AA
958	prev.OP	CC	AA
965	prev.OP	CC	AA
972	prev.OP	CC	AA
973	prev.OP	CC	AA
974	prev.OP	CC	AG
975	prev.OP	GG	AA
979	prev.OP	CC	AA
980	prev.OP	CG	AA
981	prev.OP	CG	AA
984	prev.OP	CG	AA
985	prev.OP	CG	AA
986	prev.OP	CC	AG
992	prev.OP	CC	AA
993	prev.OP	CG	AA
994	prev.OP	CC	AA
996	prev.OP	CC	AG
998	prev.OP	CC	AG
1001	prev.OP	CC	GG
1003	prev.OP	GG	AA
1011	prev.OP	CC	AA
1013	prev.OP	CC	AG
1017	prev.OP	CC	AG
1024	prev.OP	CG	AA
1028	prev.OP	CC	AG
1032	prev.OP	CC	AG
1034	prev.OP	CC	AA

1036	prev.OP	CC	AA
1037	prev.OP	CC	AA
1040	prev.OP	CC	AA
1048	prev.OP	CC	AA
1049	prev.OP	CG	AA
1051	prev.OP	CC	X
1052	prev.OP	CC	AG
1053	prev.OP	X	AA
1056	prev.OP	CC	AG
1063	prev.OP	CC	AA
1068	prev.OP	CC	AA
1069	prev.OP	CC	AA
1073	prev.OP	CG	AG
1074	prev.OP	CG	AG
1077	prev.OP	CC	AG
1078	prev.OP	CC	AG
1082	prev.OP	GG	AA
1083	prev.OP	CC	AA
1090	prev.OP	CC	AA
1091	prev.OP	CC	AG
1094	prev.OP	CC	AA
1102	prev.OP	CC	AA
1105	prev.OP	CC	AA
1106	prev.OP	CC	AA
1108	prev.OP	CC	AA
1109	prev.OP	CC	AA
1114	prev.OP	CC	X
1119	prev.OP	CC	AA
1120	prev.OP	CC	AG
1122	prev.OP	CC	GG
1124	prev.OP	GG	AA
1125	prev.OP	CC	AG
1137	prev.OP	CC	AA
1144	prev.OP	CC	AA
1148	prev.OP	CC	AA
31	Komadina-Darja	CC	AA
32	Komadina-Darja	X	X
35	Komadina-Darja	CC	AA
36	Komadina-Darja	CC	AA
37	Komadina-Darja	CG	AA

38	Komadina-Darja	CG	AA
39	Komadina-Darja	CC	AA
40	Komadina-Darja	CC	AA
41	Komadina-Darja	CG	AA
42	Komadina-Darja	CC	AA
43	Komadina-Darja	CG	AG
44	Komadina-Darja	CC	AG
45	Komadina-Darja	CG	AA
46	Komadina-Darja	GG	AA
47	Komadina-Darja	CC	AG
48	Komadina-Darja	CC	AA
49	Komadina-Darja	CC	AG
50	Komadina-Darja	GG	AA
51	Komadina-Darja	CC	AG
52	Komadina-Darja	CC	AA
53	Komadina-Darja	CG	AA
54	Komadina-Darja	CC	AA
55	Komadina-Darja	CC	AA
56	Komadina-Darja	GG	AA
57	Komadina-Darja	CG	AA
58	Komadina-Darja	CC	AA
60	Komadina-Darja	CC	AG
61	Komadina-Darja	CC	AA
62	Komadina-Darja	CG	AA
63	Komadina-Darja	CC	AG
64	Komadina-Darja	CC	AG
66	Komadina-Darja	CG	AG
67	Komadina-Darja	CC	AA

68	Komadina-Darja	CC	X
69	Komadina-Darja	CG	AA
70	Komadina-Darja	CC	AG
71	Komadina-Darja	CG	AA
72	Komadina-Darja	CC	AG
73	Komadina-Darja	CC	AA
74	Komadina-Darja	CC	AG
75	Komadina-Darja	CC	AA
76	Komadina-Darja	CC	AA
77	Komadina-Darja	CC	GG
78	Komadina-Darja	CC	AA
79	Komadina-Darja	CC	AA
80	Komadina-Darja	CC	AG
81	Komadina-Darja	CC	AG
82	Komadina-Darja	CC	AA
83	Komadina-Darja	CG	AA
84	Komadina-Darja	CC	AG
85	Komadina-Darja	CC	AG
86	Komadina-Darja	X	X
87	Komadina-Darja	CC	AG
88	Komadina-Darja	CG	AA
89	Komadina-Darja	CC	AA
90	Komadina-Darja	CG	AA
91	Komadina-Darja	CC	AA
92	Komadina-Darja	CG	AA
93	Komadina-Darja	CC	AA
94	Komadina-Darja	CG	AA
95	Komadina-Darja	CG	AG

96	Komadina-Darja	CC	AA
97	Komadina-Darja	CC	AA
99	Komadina-Darja	CC	AA
100	Komadina-Darja	CC	AG
101	Komadina-Darja	CC	AA
102	Komadina-Darja	CC	AA
103	Komadina-Darja	CC	AA
104	Komadina-Darja	CC	AA
105	Komadina-Darja	CC	AA
106	Komadina-Darja	CC	AA
107	Komadina-Darja	CC	AG
108	Komadina-Darja	CC	AA
109	Komadina-Darja	CC	AA
110	Komadina-Darja	CC	AG
111	Komadina-Darja	X	X
112	Komadina-Darja	CC	GG
114	Komadina-Darja	CG	AA
1	Vindišar	CC	AA
2	Vindišar	CG	AA
3	Vindišar	CC	AA
4	Vindišar	CG	AA
5	Vindišar	CG	AA
6	Vindišar	CG	AA
7	Vindišar	GG	AA
8	Vindišar	CC	AA
9	Vindišar	CC	AA
10	Vindišar	CC	AA
11	Vindišar	CC	AA
12	Vindišar	CG	AA
13	Vindišar	CG	AA
14	Vindišar	CC	AA
15	Vindišar	CC	AA
16	Vindišar	CC	AA
17	Vindišar	CC	AA

18	Vindišar	GG	AA
19	Vindišar	CC	AA
20	Vindišar	CC	AA
21	Vindišar	CC	AA
22	Vindišar	CC	AA
23	Vindišar	CG	AA
24	Vindišar	CG	AA
25	Vindišar	CC	AG
26	Vindišar	CC	AA
27	Vindišar	CC	AA
28	Vindišar	CC	AA
29	Vindišar	CC	AA
30	Vindišar	CC	AA
31	Vindišar	CC	AG
32	Vindišar	CC	AA
33	Vindišar	CG	AA
34	Vindišar	CC	AA
35	Vindišar	CC	AG
36	Vindišar	CC	AG
37	Vindišar	CC	AA
38	Vindišar	CC	AA
39	Vindišar	CC	AG
41	Vindišar	CC	AA
42	Vindišar	CC	AA
43	Vindišar	CC	AA
44	Vindišar	CG	AA
45	Vindišar	CC	AG
49	Vindišar	CC	AA
50	Vindišar	CG	AA
51	Vindišar	CC	AA
52	Vindišar	CC	AA
53	Vindišar	CC	AG
54	Vindišar	CG	AG
55	Vindišar	CC	AA
56	Vindišar	CC	AA
57	Vindišar	CC	AA
61	Vindišar	CC	AA
62	Vindišar	CC	AA
65	Vindišar	CC	AA
66	Vindišar	CC	AG
101	Komadina	CC	AA
102	Komadina	CC	AG

<b>103</b>	Komadina	CC	AA
<b>104</b>	Komadina	GG	AA
<b>105</b>	Komadina	CG	AA
<b>106</b>	Komadina	CG	AA

<b>107</b>	Komadina	CC	AA
<b>108</b>	Komadina	CC	AA
<b>109</b>	Komadina	CG	AG
<b>110</b>	Komadina	CC	AA