

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANJA REHAR

DIPLOMSKA NALOGA

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV V GENIH ZA TIOREDOKSIN IN
TIOREDOKSINSKO REDUKTAZO 2 Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO**
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANJA REHAR

DIPLOMSKA NALOGA

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV V GENIH ZA TIOREDOKSIN IN
TIOREDOKSINSKO REDUKTAZO 2 Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO**

**RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISMS OF THIOREDOXIN AND
THIOREDOXIN REDUCTASE GENES AND BONE MINERAL DENSITY**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem izdelala na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. Meritve mineralne kostne gostote so opravili na UKC Ljubljana, UKC Maribor in v SB Celje. Meritve koncentracij biokemičnih kazalcev so izvedli v laboratoriju Klinike za nuklearno medicino, UKC Ljubljana.

Zahvala

V prvi vrsti se želim zahvaliti mentorju doc. dr. Matjažu Jerasu za strokovno pomoč in koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Zahvala gre tudi dr. Simoni Jurković Mlakar za skrbno vodenje skozi laboratorijsko delo, pomoč pri vrednotenju rezultatov in vzpodbudne besede tekom pisanja diplomske naloge. Prav tako se želim zahvaliti preostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za prijaznost in pomoč pri delu v laboratoriju.

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

Še enkrat hvala vsem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

Ljubljana, junij 2011

Sanja Rehar

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

Član diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

VSEBINA

<i>VSEBINA</i>	<i>i</i>
<i>SEZNAM OKRAJŠAV</i>	<i>iv</i>
<i>POVZETEK</i>	<i>vi</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>vii</i>
<i>KAZALO SLIK</i>	<i>ix</i>
<i>KAZALO PREGLEDNIC</i>	<i>x</i>
<i>KAZALO GRAFOV</i>	<i>xv</i>
1. UVOD	1
1.1. Vloga kosti	1
1.1.1. Zgradba in sestava kosti	1
1.1.2. Kostna premena	2
1.2. Osteoporoza	4
1.2.1. Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze	5
1.2.2. Klinična slika	7
1.2.3. Diagnostika	8
1.2.4. Zdravljenje	11
1.3. Oksidativni stres in antioksidativni obrambni sistem	13
1.3.1. Tiorredoksinski sistem	15
1.3.2. Vpliv oksidativnega stresa na razvoj osteoporoze	19
2. NAMEN DELA	24
3. MATERIALI IN METODE	25
3.1. Preiskovanci	25
3.2. Določitev vrednosti mineralne kostne gostote in biokemijskih kazalcev kostne remodelacije	25
3.3. Opis vzorcev DNA	26
3.4. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	26
3.4.1. Priprava reakcijske zmesi	27
3.4.2. Pogoji reakcije PCR	28
3.4.3. Preverjanje uspešnosti reakcije PCR	29
3.4.4. Reagenti in oprema	30

3.5. Denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	32
3.5.1. Priprava vzorcev	34
3.5.2. Potek analize DHPLC	36
3.5.3. Reagenti in oprema.....	36
3.6. Sekvenčna analiza.....	37
3.7. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (q-PCR).....	38
3.7.1. Pomnoževanje odsekov DNA	41
3.7.2. Priprava reakcijske zmesi.....	41
3.7.3. Priprava vzorcev	42
3.7.4. Potek reakcije	43
3.7.5. Reagenti in oprema.....	43
3.8. Statistične metode.....	45
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	46
4.1. Tioredoksinska reduktaza	46
4.1.1. Optimizacija pogojev verižne reakcije s polimerazo (PCR).....	46
4.1.2. Optimizacija pogojev analize z metodo DHPLC in sekvenčna analiza	47
4.1.3. Ugotavljanje vpliva polimorfizma Ala66Ser v genu za TXNRD2 na mineralno kostno gostoto in koncentracijo biokemičnih označevalcev kostne premene	48
4.1.4. Genotipska frekvenca polimorfizma Ala66Ser v genu za TXNRD2	50
4.1.5. Statistična obravnava rezultatov analize polimorfizma Ala66Ser	51
4.1.6. Ocena morebitnih kliničnih vplivov polimorfizma Ala66Ser v genu za tioredoksinsko reduktazo 2	58
4.2. Tioreodoksin.....	59
4.2.1. Optimizacija pogojev verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)	59
4.2.2. Analiza rezultatov genotipizacije	59
4.2.3. Ugotavljanje morebitnega kliničnega pomena polimorfizmov 12496C>T in -759A>G v genu za tioredoksin.....	63
4.2.4. Genotipske frekvence polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v slovenski populaciji	63
4.2.5. Vpliv polimorfizmov TXNa in TXNb na mineralno kostno gostoto in koncentracijo biokemičnih označevalcev kostne premene	64
4.2.6. Statistična obdelava rezultatov v okviru polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v genu za tioreodoksin.....	65

4.2.7. Potencialni vplivi preiskovanih polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v populacijah preiskovancev	86
5. SKLEP	89
6. LITERATURA.....	93
7. PRILOGE	I
7.1. Priloga 1: Rezultati genotipizacije.....	I
7.2. Priloga 2: Rezultati statistične obdelave.....	X
7.2.1. Ženska populacija.....	X
7.2.2. Zdrave ženske	XVII
7.2.3. Ženske s potrjeno osteoporozo	XXII
7.2.4. Moška populacija	XXVII

SEZNAM OKRAJŠAV

- ANCOVA – analiza kovarianc
- ANOVA – analiza varianc
- AP-1 – protein aktivator 1 (*ang. activator protein 1*)
- APE – (*ang. apurinic/apyrimidinic endonuclease*)
- ASK-1 – (*ang. apoptosis signal regulating kinase-1*)
- BALP – kostna alkalna fosfataza (*ang. bone alkaline phosphatase*)
- BMDfn – mineralna kostna gostota vratu stegenice
- BMDls – mineralna kostna gostota ledvenih vretenc
- BMDtot – mineralna kostna gostota celotnega kolka
- CTX – karboksi terminalni prečno povezani telopeptid
- DEXA – dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (*ang. dual-energy X-ray absorptiometry*)
- DHPLC – denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
- DNA – deoksiribonukleinska kislina
- dNTP – deoksiribonukleotid trifosfat
- FAD – flavin adenin dinukleotid
- I κ B – inhibitor κ B
- ITM – indeks telesne mase
- MKG – mineralna kostna gostota
- NADPH-oksidadza – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat-oksidadza
- NF- κ B – transkripcijski jedrni dejavnik kapa-B
- NTX – aminoterminalni prečnopovezani telopeptid
- OC – osteokalcin
- OPG – osteoprotegerin
- PCR – verižna reakcija s polimerazo
- PI3K – fosfatidilinozitolna 3-kinaza
- PICP – prokolagen tip I C propeptid
- PINP – prokolagen tip I N propeptid
- PTH – parathormon
- RANKL – receptorski ligand za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B

- Ref-1 – *ang. redox factor 1*
- RNS – reaktivne dušikove spojine
- ROS – reaktivne kisikove spojine
- RT-PCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času
- SD – standardna deviacija
- SZO – Svetovna zdravstvena organizacija
- TEAA – trietilamonijev acetat
- T_m – temperatura prileganja
- TRX – tioredoksin
- TrxR – tioredoksinska reduktaza
- TXNRD – gen, ki kodira tioredoksinsko reduktazo
- t_{fn} – t-vrednost vratu stegenice
- t_{ls} – t-vrednost ledvenih vretenc
- t_{tot} – t-vrednost celotnega kolka

POVZETEK

POVEZANOST POLIMORFIZMOV V GENIH ZA TIOREDOKSIN IN TIOREDOKSINSKO REDUKTAZO 2 Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO

Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, ki postaja, zaradi zapletov v obliki osteoporotičnih zlomov, eden od zdravstvenih problemov razvitih družb. Pomemben dejavnik tveganja za njen nastanek, povezan s staranjem, je učinkovitost mehanizmov za obvladovanje oksidativnega stresa. Telo se zoper škodljivo delovanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS) brani z antioksidativnimi mehanizmi, med katere sodi tudi tioredoksinski sistem. Eden izmed učinkov oksidativnega stresa je tudi zmanjšana mineralna kostna gostota, ki lahko vodi v pojav osteoporoze. V okviru diplomske naloge smo s pomočjo 721 preiskovancev, od katerih je bilo 606 žensk in 115 moških, preučevali frekvence polimorfizmov 12496C>T in -759A>G v genih za tioredoksin (TXN) ter Ala66Ser v genu za tioredoksinsko reduktazo 2 (TxnR2) in ugotavljali njihov morebiten klinično relevanten pomen. Genotipizacijo omenjenih polimorfizmov smo izvedli z uporabo različnih metod. Tako smo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) specifično pomnožili definirane odseke v posamezni DNA, osamljeni iz vzorcev periferne krvi preiskovancev, nato pa z denaturacijsko tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (DHPLC) določili genotipe. V ta namen smo uporabili tudi metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času.

Ugotovili smo, da ima v okviru polimorfizma Ala66Ser (gen TxnR2) genotip GG 56 %, GT 43 % in TT 10 % preiskovancev. S preučevanjem polimorfizma 12496C>T (gen TXN) smo odkrili, da ima genotip CC 32 %, CT 48 % in TT 20 % preiskovancev, v primeru polimorfizma -795A>G, pa določili naslednje genotipske frekvence: AA 29 %, AG 52 % in GG 19 %. Vsi omenjeni genotipi so porazdeljeni v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem. S statističnimi analizami smo ugotovili, da je polimorfizem Ala66Ser statistično značilno povezan tako s povprečnimi vrednostmi spremenljivke t_{tot} , ki označuje kostno gostoto kolka ($p_{t_{tot}} = 0,047$), v celotni ženski populaciji kot tudi s povprečnimi vrednostmi koncentracij sOPG ($p_{OPG} = 0,012$), biokemičnega označevalca kostne premene, v podskupini zdravih preiskovank. Polimorfizem 12496C>T je bil prav tako statistično značilno povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracij OPG, in sicer v celokupni skupini preiskovank ($p_{OPG} = 0,086$), polimorfizem -795A>G pa s povprečnimi vrednostmi spremenljivk t povezanih z mineralno kostno gostoto (MKG), in sicer tako v podskupini preiskovank s potrjeno osteoporozo ($p_{t_{tot}} = 0,036$; $p_{BMD_{tot}} = 0,035$) kot v primeru preiskovancev ($p_{BMD_{fn}} = 0,009$; $p_{t_{fn}} = 0,052$; $p_{BMD_{tot}} = 0,035$; $p_{BMD_{ls}} = 0,003$; $p_{t_{ls}} = 0,014$). Nadalje smo s haplotipsko študijo ugotovili statistično značilno različne povprečne vrednosti tako koncentracij različnih biokemičnih označevalcev kot tudi vrednosti raznovrstnih MKG, in sicer v skupini zdravih preiskovank z aleloma T in G ($p_{BALP} = 0,043$; $p_{OPG} = 0,072$; $p_{OC} = 0,072$) in med tistimi preiskovanci moškega spola, ki so imeli bodisi alela T in A ($p_{OPG} = 0,012$; $p_{BMD_{fn}} = 0,098$; $p_{BMD_{ls}} = 0,010$; $p_{t_{ls}} = 0,016$) ali pa T in G ($p_{BMD_{fn}} = 0,020$; $p_{BMD_{tot}} = 0,012$; $p_{t_{fn}} = 0,088$; $p_{t_{tot}} = 0,080$).

Na osnovi naših izsledkov lahko zaključimo, da lahko gena TXN in TxnR uvrstimo med tiste polimorfne dedne dejavnike, ki vplivajo na razvoj bolezni kosti, torej tudi na nastanek osteoporoze. Pri tem pa menimo, da bi bilo našo raziskavo smiselno ponoviti na večjem številu preiskovancev, s čimer bi lahko razjasnili mehanizme vplivov polimorfizmov obeh preučevanih genov na MKG in vrednosti biokemičnih označevalcev kostne premene.

ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISMS OF THIOREDOXIN AND THIOREDOXIN REDUCTASE GENES AND BONE MINERAL DENSITY

Osteoporosis is a systemic skeletal disease, which has become one of the major clinical problems of the modern world, due to complications being caused by osteoporotic fractures. Human organism possesses various antioxidant systems, such as thioredoxin, which can neutralise harmful effects of reactive oxygen species (ROS). Oxidative stress has an important impact on development of osteoporosis, as it can reduce bone mineral density. Within the scope of our work we determined the frequencies of the 12496C>T and the -759A>G polymorphisms present in the thioredoxin gene (TXN) and that of the Ala66Ser in the thioredoxin reductase 2 gene (TxnR2). For that purpose 721 volunteers, 606 women and 115 men, were recruited in the study. Their blood samples were drawn and processed to isolate DNA. Afterwards, we used polymerase chain reaction (PCR) to specifically multiply DNA fragments. The resulting PCR products were subsequently analysed by denaturation high performance liquid chromatography (DHPLC) in order to determine the present genotypes. We also used real-time PCR for allelic discriminations. The genotype frequencies of the Ala66Ser polymorphism within the TxnR2 gene were found as follows: the GG genotype 56 %, the GT genotype 43 % and the TT genotype 10 % . Within the TXN gene, the genotype frequencies determined within the 12496C>T polymorphism were: 32 % for the CC, 48 % for the CT and 20 % for the TT genotype. Finally, by analysing the -759A>G polymorphism, the following genotype frequencies were determined: 29 % of the AA, 52 % of the AG and 19 % of the GG genotype. All determined genotypes were distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium. Based on the results obtained by extensive statistical analyses, the Ala66Ser polymorphism was statistically significant in relation to t-values for the total hip bone densities and concentrations of the OPG, the biochemical marker of the bone remodeling, in both, women ($p_{t_tot} = 0,047$) and in the subgroup of healthy women ($p_{OPG} = 0,012$). A statistically significant relationship was determined between the 12496C>T polymorphism and the concentrations of the OPG in a group of women ($p_{OPG} = 0,086$). Statistical significance between the -795A>G polymorphism, the bone mineral density values and concentrations of the OPG were also determined in the subgroup of women with osteoporosis ($p_{t_tot} = 0,036$; $p_{BMD_{tot}} = 0,035$) and the group of men ($p_{BMD_{fn}} = 0,009$; $p_{t_fn} = 0,052$; $p_{BMD_{tot}} = 0,035$; $p_{BMD_{ls}} = 0,003$; $p_{t_ls} = 0,014$). Furthermore, we discovered, by carrying out a haplotype study that a presence of at least one T and one G allele in conjunction with the polymorphisms studied, has a statistically significant influence on the concentrations of different biochemical markers of bone remodulation in a subgroup of healthy women ($p_{BALP} = 0,043$; $p_{OPG} = 0,072$; $p_{OC} = 0,072$). In addition, statistically significant influence within the same subgroup was also determined for the presence of the T and A alleles in relation to the OPG concentrations and values of different types of bone mineral densities ($p_{OPG} = 0,012$; $p_{BMD_{fn}} = 0,098$; $p_{BMD_{ls}} = 0,010$; $p_{t_ls} = 0,016$). In the group of men the presence of T and G alleles influenced the values of bone mineral densities ($p_{BMD_{fn}} = 0,020$; $p_{BMD_{tot}} = 0,012$; $p_{t_fn} = 0,088$; $p_{t_tot} = 0,080$). Therefore, based on our findings, we can conclude that TXN and TxnR2 genes can be classified as those, importantly implicated in the development of various bone diseases, including osteoporosis. However we think that it would be reasonable to repeat this kind of

a study on a wider range of volunteers to clarify the mechanisms and impacts the TXN and TxnR genes are exerting on the bone mineral density and biochemical markers of the bone turnover.

KAZALO SLIK

Slika 1: Kostna premena.	3
Slika 2: Vpliv starosti na izgubo mineralne kostne gostote	6
Slika 3: Mikroarhitekturna struktura zdrave in osteoporotične kosti.	7
Slika 4: Smernice za odkrivanje, preprečevanje in zdravljenje osteoporoze v Republiki Sloveniji	12
Slika 5: Tioredoksinški redoks sistem	16
Slika 6: Položaj gena, ki kodira za tioredoksin na človeškem kromosomu 9	18
Slika 7: Položaj gena, ki kodira tioredoksin reduktazo D2 na človeškem kromosomu 22 .	19
Slika 8: Delovanje RANKL-a in OPG.....	21
Slika 9: Signalne poti pri delovanju ROS	22
Slika 10: Princip delovanja metode DHPLC.	33
Slika 11: Shematski prikaz aparature DHPLC sistema WAVE®	34
Slika 12: Shema poteka analize z metodo DHPLC.	35
Slika 13: Stopnje čiščenja produktov PCR.....	38
Slika 14: Shematski prikaz poteka kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času.	40
Slika 15: Detekcija produktov PCR na agrozem gelu.....	47
Slika 16: Rezultat sekvenciranja vzorca 672 z istosmernima začetnima oligonukleotidoma (genotip G/G).....	47
Slika 17: Rezultat sekvenciranja vzorca 680 z istosmernima začetnima oligonukleotidoma (genotip G/T).	47
Slika 18: Referenčni kromatografski vrhovi, ki so nam pomagali pri določanju genotipa posameznega preiskovanega vzorca.....	48
Slika 19: Razporeditve genotipov po skupkih za TXNa (12496C>T).	60
Slika 20: Primer krivulj pomnoževanja.	60
Slika 21: Krivulji, ki dokazujeta prisotnost alela T.	61
Slika 22: Krivulji, ki dokazujeta prisotnost alela C.	61
Slika 23: Krivulja, ki prikazuje prisotnost alela C in T.	62
Slika 24: Razporeditve genotipov znotraj proučevanih polimorfizmov gena TXNb (-759A>G).	62

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: Dejavniki, ki vplivajo na proces premene.</i>	3
<i>Preglednica II: Izsledki meritev MKG ter prevalenca osteopenije in osteoporoze.</i>	6
<i>Preglednica III: Definicija osteoporoze na osnovi merjenja MKG z DEXA.</i>	8
<i>Preglednica IV: Proteinske tarče reduciranega tioredoksina in njegov učinek.</i>	17
<i>Preglednica V: Razdelitev preiskovancev v dve osnovni skupini in znotraj teh v ustrezne podskupine.</i>	25
<i>Preglednica VI: Sestava optimizirane reakcijske zmesi za pomnoževanje odsekov DNA s PCR.</i>	28
<i>Preglednica VII: Optimizirani program za izvedbo reakcije PCR.</i>	28
<i>Preglednica VIII: Detekcija produktov v 2 % agaroznem gelu.</i>	29
<i>Preglednica IX: Sestava in vloga uporabljenih reagentov za izvedbo metode DHPLC.</i>	34
<i>Preglednica X: Potek in trajanje analize, ter deleži uporabljenih pufrov na posamezni stopnji programa DHPLC.</i>	36
<i>Preglednica XI: Genotipizacija vzorcev z merjenjem valovne dolžine emitirane fluorescenčne svetlobe reporterskih barvil.</i>	40
<i>Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za analizo s q-PCR.</i>	43
<i>Preglednica XIII: Temperaturni program za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.</i>	43
<i>Preglednica XIV: Frekvence genotipov polimorfizma Ala66Ser v genu za TXNRD2 znotraj preiskovanih skupin, v primerjavi z različnimi narodi in rasami.</i>	51
<i>Preglednica XV: Frekvence polimorfizma Ala66Ser(G>T) v celotni ženski populaciji.</i>	51
<i>Preglednica XVI: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk polimorfizma Ala66Ser(G>T) s testi Post Hoc v ženski populaciji.</i>	52
<i>Preglednica XVII: Frekvence v skupini zdravih preiskovank pri polimorfizmu Ala66Ser(G>T). ...</i>	54
<i>Preglednica XVIII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v polimorfizmu Ala66Ser(G>T)s testi Post Hoc v skupini zdravih preiskovank.</i>	54
<i>Preglednica XIX: Alelne frekvence polimorfizma Ala66Ser(G>T) v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.</i>	55
<i>Preglednica XX: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v polimorfizmu A66S(G>T) s testi Post Hoc, v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.</i>	56
<i>Preglednica XXI: Alelna frekvence polimorfizma Ala66Ser(G>T) v skupini moških preiskovancev.</i>	57
<i>Preglednica XXII: Optimizirani pogoji verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).</i>	59
<i>Preglednica XXIII: Frekvence genotipov polimorfizmov 12496C>T (TXNa) in -795A>G (TXNb) znotraj različnih skupin preiskovancev.</i>	64

<i>Preglednica XXIV: Primerjava frekvence genotipov polimorfizmov 12496C>T (TXNa) in -795A>G (TXNb) v vzorcih različnih populacij.</i>	64
<i>Preglednica XXV: Tabela za statistično ovrednotenje izsledkov haplotipske študije.</i>	65
<i>Preglednica XXVI: Alelne frekvence polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v skupini preiskovank.</i>	66
<i>Preglednica XXVII: Genotipske frekvence polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v skupini zdravih preiskovank.</i>	68
<i>Preglednica XXVIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivke "starost" s testi Post Hoc v skupini zdravih preiskovank, v okviru polimorfizmov 12496C>T (TXNa).</i>	69
<i>Preglednica XXIX: Povzetek rezultatov v obliki povprečnih vrednosti (srednje vrednosti $\pm$ SD) po statistični obdelavi spremenljivk v haplotipski študiji, v skupini zdravih preiskovank.</i>	72
<i>Preglednica XXX: Frekvence v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo pri polimorfizmu 12496C>T (TXNa) in -795A>G(TXNb).</i>	73
<i>Preglednica XXXI: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk pri polimorfizmih 12496C>T (TXNa) s testi Post Hoc, v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.</i>	73
<i>Preglednica XXXII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v primeru polimorfizmov -795A>G(TXNb) s testi Post Hoc, v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.</i>	76
<i>Preglednica XXXIII: Povzetek rezultatov v obliki povprečnih vrednosti (srednje vrednosti $\pm$ SD) po statistični analizi spremenljivk v haplotipski študiji, v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.</i>	78
<i>Preglednica XXXIV: Alelne frekvence v skupini moških preiskovancev.</i>	79
<i>Preglednica XXXV: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk s testi Post Hoc, v skupini moških preiskovancev.</i>	80
<i>Preglednica XXXVI: Povzetek rezultatov povprečnih vrednosti (srednje vrednosti $\pm$ SD), dobljenih s statistično analizo spremenljivk v okviru haplotipske študije skupine moških preiskovancev.</i>	84
<i>Preglednica XXXVII: Zbrani podatki genotipizacije za TXNa (rs2776), TXNb (rs2301241) in TXNRD2 (rs5748469 ; A66S (C>A)).</i>	I
<i>Preglednica XXXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA in rezultati statistične analize preiskovank.</i>	X
<i>Preglednica XXXIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank.</i>	XI
<i>Preglednica XL: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, ki smo ga izvedli pri preiskovankah.</i>	XI
<i>Preglednica XLI: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testa LSD Post Hoc za skupino preiskovank.</i>	XI
<i>Preglednica XLII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize pri preiskovankah.</i>	XI
<i>Preglednica XLIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank.</i>	XII

<i>Preglednica XLIV: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah</i>	XII
<i>Preglednica XLV: Tabela za vrednotenje rezultatov po statistični obdelavi v okviru haplotipske študije.</i>	XIII
<i>Preglednica XLVI: Alelne frekvence, določene s haplotipsko študijo.</i>	XIII
<i>Preglednica XLVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovank</i>	XVI
<i>Preglednica XLVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank).....</i>	XVI
<i>Preglednica XLIX: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah</i>	XVII
<i>Preglednica L: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovank.</i>	XVII
<i>Preglednica LI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank</i>	XVII
<i>Preglednica LII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank</i>	XVIII
<i>Preglednica LIII: Rezultati statistične analize spremenljivk testa v okviru ANCOVA, pri zdravih preiskovankah</i>	XVIII
<i>Preglednica LIV: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini zdravih preiskovank.</i>	XVIII
<i>Preglednica LV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank</i>	XIX
<i>Preglednica LVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank</i>	XIX
<i>Preglednica LVII: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri zdravih preiskovankah</i>	XX
<i>Preglednica LVIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk v okviru testa LSD Post Hoc, v skupini zdravih preiskovank.....</i>	XX
<i>Preglednica LIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank</i>	XX
<i>Preglednica LX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank</i>	XXI
<i>Preglednica LXI: Rezultati statistične obdelave spremenljivk v okviru testa ANCOVA, zdravih preiskovank</i>	XXI
<i>Preglednica LXII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini zdravih preiskovank</i>	XXI
<i>Preglednica LXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	XXII

<i>Preglednica LXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXIII</i>
<i>Preglednica LXV: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXIII</i>
<i>Preglednica LXVI: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXIII</i>
<i>Preglednica LXVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXIII</i>
<i>Preglednica LXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXIV</i>
<i>Preglednica LXIX: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXV</i>
<i>Preglednica LXX: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXV</i>
<i>Preglednica LXXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXV</i>
<i>Preglednica LXXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXVI</i>
<i>Preglednica LXXIII: Rezultati statistične obdelave spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXVI</i>
<i>Preglednica LXXIV: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo</i>	<i>XXVII</i>
<i>Preglednica LXXV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovancev</i>	<i>XXVII</i>
<i>Preglednica LXXVI: Rezultati statistične obdelave spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovancih</i>	<i>XXVIII</i>
<i>Preglednica LXXVII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testa LSD Post Hoc, v skupini preiskovancev</i>	<i>XXVIII</i>
<i>Preglednica LXXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovancev</i>	<i>XXVIII</i>
<i>Preglednica LXXIX: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovancih</i>	<i>XXIX</i>
<i>Preglednica LXXX: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovancev</i>	<i>XXIX</i>
<i>Preglednica LXXXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovancev</i>	<i>XXX</i>
<i>Preglednica LXXXII: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovancih</i>	<i>XXXI</i>

<i>Preglednica LXXXIII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testa LSD Post Hoc, v skupini preiskovancev</i>	<i>XXXI</i>
---	-------------

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečne <i>t</i> -vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) vratu stegenice (<i>t_fn</i>) glede na polimorfizme v genu TXNRD2 pri preiskovankah	52
Graf 2: Povprečne <i>t</i> -vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) celotnega kolka (<i>t_tot</i>) glede na polimorfizme v genu TXNRD2 pri preiskovankah	53
Graf 3: Povprečne <i>t</i> -vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) ledvenih vretenc (<i>t_ls</i>) glede na polimorfizme v genu TXNRD2 pri preiskovankah	53
Graf 4: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) sOPG glede na polimorfizme v genu TXNRD2, pri zdravih preiskovankah	55
Graf 5: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pOC glede na polimorfizme v genu TXNRD2, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo	56
Graf 6: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMD_tot glede na polimorfizme v genu TXNRD2, pri moških preiskovancih	57
Graf 7: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) sOPG preiskovank v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa	67
Graf 8: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivke "leta_mene" v povezavi s polimorfizmi v genu TXNb, pri vseh preiskovankah	68
Graf 9: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) starosti v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa, pri zdravih preiskovankah	69
Graf 10: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) starosti, v povezavi s polimorfizmi v genu TXNb, pri zdravih preiskovankah.	70
Graf 11: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDls za gen TXNb pri zdravih preiskovankah	71
Graf 12: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pOC v povezavi s polimorfizmi v genu TXNb, pri zdravih preiskovankah.	71
Graf 13: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDfn v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo.	74
Graf 14: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDls v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo - test LSD Post Hoc (C/C - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, C/T - heterozigot).	75
Graf 15: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) sOPG v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo	75
Graf 16: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDtot glede na polimorfizem v genu TXNb, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo	77

Graf 17: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) t_{tot} glede na polimorfizme v genu TXNa, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo	77
Graf 18: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracij sOPG glede na polimorfizme v genu TXNa, pri moških preiskovancih.....	80
Graf 19: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDfn glede na polimorfizme v genu TXNb, pri moških preiskovancih.....	81
Graf 20: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDtot glede na polimorfizem v genu TXNb, pri moških preiskovancih.....	82
Graf 21: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDls glede na polimorfizem v genu TXNb, pri moških preiskovancih.....	82
Graf 22: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pOC glede na polimorfizme v genu TXNb, pri moških preiskovancih	83
Graf 23: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) sOPG glede na polimorfizme v genu TXNb, pri moških preiskovancih.....	84

1. UVOD

1.1. Vloga kosti

Okostje daje človeškemu telesu obliko, zaščito življenjsko pomembnih notranjih organov in oporo. Predstavlja ogrodje za pritrditev skeletnih mišic, ki skupaj z njim omogočajo nadzorovano gibanje. Tvorí zaščitni ovoj, v katerem je shranjen kostni mozeg in skladišči minerale. Kalcij, fosfor, natrij, kalij in magnezij, so najpomembnejši za gostoto kosti in s tem tudi za njihovo trdnost.

1.1.1. Zgradba in sestava kosti

Biokemično kompaktno kostno substanco sestavlja organski matriks, ki predstavlja 35 % mase kosti, ter anorganski (mineralni del), ki predstavlja preostali, 65 % masni delež. Organske snovi predstavljajo predvsem kolagenska vlakna (90 – 95 %), preostali del pa mukopolisaharidi, ne-kolagenske beljakovine osteokalcin, osteonektin, osteopontin, fibronektin, trombospondin in kostni sialoprotein, ki so sestavine opornega in vezivnega tkiva. Ne-kolagenske beljakovine skupaj z lokalnimi mediatorji in hormoni uravnavajo proces mineralizacije kosti. Anorganski del kosti, ki je pomemben za njihovo trdnost, sestavljajo predvsem kalcij in fosfati. Kalcij je prisoten kot amorfen kalcijev fosfat in v kristalnih oblikah hidroksiapatita, ki ima v svojih mrežah vključene majhne količine kalcijevega karbonata in kalcijevega fluorida (1,2).

Kost je sestavljena iz kompaktnega površinskega kortikalnega tkiva in trabekularnega tkiva, ki se nahaja v njeni notranjosti. Njuno razmerje pri odraslem človeku je 80:20. Med notranjimi trabekulami se preliva kostni mozeg, ki je pomemben za razvoj rdečih in belih krvnih celic (eritrociti, trombociti in levkociti). Kortikalna kost je porozna, saj je razmerje med površino in volumnom majhno. Površina kortikalnega dela predstavlja le tretjino celotne kostne površine. Preostali dve tretjini pa pripadata trabekularni kosti, ki sestavlja ploščate kosti, vretenca in epifize dolgih kosti. Proces presnove se večinoma odvijajo na površini kosti, zato se vsaka sprememba najprej opazi na trabekularni kosti. Le-ta je močno porozna, njeno razmerje med površino in volumnom pa veliko.

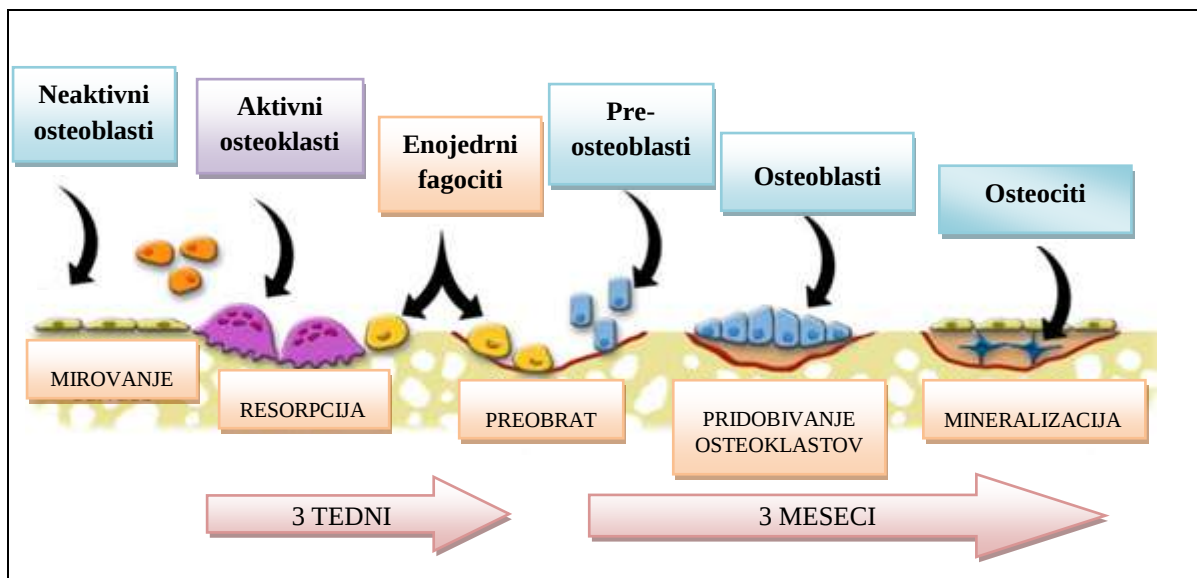
Kortikalna in trabekularna kost vsebujeta specializirane kostne celice, ki so odgovorne za kostno tvorbo. Celice, ki so odgovorne za rast kosti imenujemo **osteoblasti**. Nastanejo po diferenciaciji iz pluripotentnih mezenhimskih celic kostnega mozga. Njihova naloga je tvorba in izločanje proteinskih kompleksov, ki so sestavni del kostnega matriksa in sodelujejo pri mineralizaciji kosti. Glavna produkta osteoblastov sta kolagen tipa I in nekolagenski protein osteokalcin. Zrele osteoblastne celice so nujne za nalaganje kalcijevih in fosforjevih kristalov v kosteh oziroma za proces mineralizacije. V aktivnih osteoblastih je veliko alkalne fosfataze, ki določa dnevno hitrost mineralizacije. Na svojih površinah izražajo mnogo receptorjev: npr. za glukokortikoide, estrogene, PTH, TNF- α , TGB- β , interleukine, prostaglandine in 1,25-dihidroksi vitamin D₃. Spremenjene osteoblaste, ki se ujemajo v notranjost lakune mineraliziranega matriksa ali pa ostanejo na površini kosti imenujemo **osteociti**. To so največje celice v kosteh. Njihova naloga je, da s finimi celičnimi izrastki prepredejo kost in vzpostavijo stik med celicami in kostno površino. Njihova lokacija jim omogoča hitro sproščanje kalcija iz kosti, potrebno za uravnoteženost notranjega okolja in zaznavanje potreb po kostni premeni. Polinuklearne fagocite, ki nenehno razgrajujejo kost tako, da izločajo v okolico lizosomske encime (kislo fosfatazo, kolagenaze in druge), imenujemo **osteoklasti**. Izvirajo iz hematopoetskih monocitno-makrofagnih vrst. So večjedrne celice, ki nastanejo s celičnim zlitjem enojedrnih osteoklastov in izločajo kisline za razgradnjo kostnine. Funkcionalno so tako udeleženi pri demineralizaciji kosti, razgradnji kolagena in cepljenju mukopolisaharidnih proteinskih kompleksov. Izražajo receptorje za M-CSF, kalcitonin in RANKL (1,3,4).

1.1.2. Kostna premena

Kostna premena je fiziološki proces, ki poteka vse življenje in s katerim se obnavlja kostno tkivo. Tekom kostne premene se ciklično izmenjujeta procesa tvorbe kosti z osteoblasti in resorpcija kosti, za katero so odgovorni osteoklasti.

Cikel premene kosti (**Slika 1**) se prične z razgaljenjem kostne površine zaradi umika neaktivnih osteoblastov, kar imenujemo faza aktivacije. Sledi ji faza pridobivanja osteoklastov in njihova aktivacija. Pripnejo se na tarčno površino kosti, nato pa z nakisanjem in proteolitično presnovo v fazi preobrata, izdolbejo Howshipove lakune. Osteoklasti se potem odmaknejo, dno votlinice pa očistijo enojedrni fagociti in ga obložijo

s cementno plastjo. Omenjene celice nadomestijo osteoprogenitorne celice, ki se diferencirajo v osteoblaste, ki tvorijo osteoid, ta pa kasneje mineralizira (faza pridobivanja osteoblastov in tvorbe osteoida). V fazi mirovanja nato osteoid zapolni izdolbeno Howshipovo lakuno, temu pa sledi njegova mineralizacija. Površino kosti ponovno prekrijejo neaktivni osteoblasti in cikel se zopet ponovi (5,6).



Slika 1: Kostna premena.

Življenjska doba osteoklastov je tri tedne, aktivnih osteoblastov pa tri mesece. Proces premene nadzirajo telesni hormoni in lokalni faktorji (**Preglednica 1**) (1, 5).

Preglednica 1: Dejavniki, ki vplivajo na proces premene.

HORMONI	LOKALNI FAKTORJI
Parathormon (PTH): Stimulira resorpcijo kosti.	Trombocitni rastni dejavnik (PDGF): Pospešuje tvorbo kosti.
Kalcitonin: Zavira resorpcijo kosti z direktnim delovanjem na osteoklaste.	Bazični fibroblastični rastni dejavnik (bFGF): Pospešuje tvorbo kosti.
Inzulin: Je nujno potreben za normalno mineralizacijo kosti in pospešuje tvorbo kosti.	Transformirajoči rastni dejavnik (TGF-β): Pospešuje tvorbo kosti.
Rastni hormon: Pospešuje produkcijo 1,25-dihidroksi vitamina D₃, ki stimulira absorpcijo kalcija iz črevesja. Pospešuje tvorbo kosti s tem, da	Tumorski nekrozni faktor alfa (TNF-α): Pospešuje resorpcijo kosti.

stimulira osteoblaste in osteoklaste.	
• <i>Vitamin D₃</i>: Pospešuje tvorbo kosti, povečuje resorpcijo kalcija in fosfata iz črevesja.	• <i>Interlevkin-1 (IL-1)</i>: Zavira tvorbo kosti.
• <i>Glukokortikoidi</i>: Stimulirajo resorpcijo kosti zaradi vpliva na zmanjšano absorpcijo kalcija iz črevesja.	• <i>Kolonije stimulirajoči dejavnik (CSF)</i>: Pospešuje resorpcijo kosti.
• <i>Estrogeni</i>: Zavirajo resorpcijo kosti z indirektno inhibicijo nastanka citokinov IL-1/IL-6.	• <i>Interferon gama (INF-γ)</i>: Zavira resorpcijo kosti.
• <i>Androgeni</i>: Zavirajo resorpcijo kosti.	
• <i>Tiroidni hormoni (tiroksin)</i>: Pospešuje resorpcijo kosti z direktno stimulacijo osteoklastov k povečani kostni presnovi.	

Neravnovesje med tvorbo in razgradnjo kostnine, ki je posledica vpliva lokalnih in sistemskih dejavnikov, lahko vodi do razvoja bolezni kosti, med katere spada tudi osteoporoza.

1.2. Osteoporoza

Osteoporoza je sistemska bolezen okostja, za katero sta značilni majhna mineralna kostna gostota (MKG), in sicer za 2,5 ali več standardnih deviacij (SD) pod povprečno vrednostjo za mlade odrasle osebe ob sočasni prisotnosti mikroarhitekturnih sprememb kostnega tkiva, kar povzroča večjo krhkost kosti in pogoste zlome. Glede na vzroke za nastanek osteoporoze, jo delimo v dve veliki skupini, primarno in sekundarno.

Primarno osteoporozo delimo na (5):

- juvenilno,
- idiopatično in
- involutivno, ki je lahko:
 - pomenopavzalna (osteoporoza tipa I) ali
 - senilna (osteoporoza tipa II).

Sekundarna osteoporoza se razvije kot posledica različnih bolezni ali pa zaradi negativnih učinkov toksičnih zdravil na okostje.

Pomenopavzalna osteoporoza se pojavi predvsem pri ženskah med 50. in 70. letom starosti. Zanje so značilni kompresijski zlomi vretenc, reber, medenice, najbolj distalnega dela koželjnice in podlahtnice, torej delov okostja, kjer po sestavi prevladuje trabekularna komponenta (5). Vzrok za njen nastanek je pomanjkanje estrogenov, kar zviša raven izražanja osteoblastogeneze in osteoklastogeneze. Senilna osteoporoza se pojavlja v starosti nad 70 let in prizadene tudi moško populacijo. Zanje je značilna zmanjšana količina tako trabekularne kot kortikalne kosti. Za to obliko osteoporoze so, poleg kompresijskih zlomov kosti in ploščatih kosti, značilne tudi frakture dolgih kosti, predvsem kolka. Vzroki za to so predvsem zmanjšana absorpcija kalcija iz črevesja, posledično zvišana koncentracija PTH v krvi ter zmanjšano nastajanje $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ (5, 6).

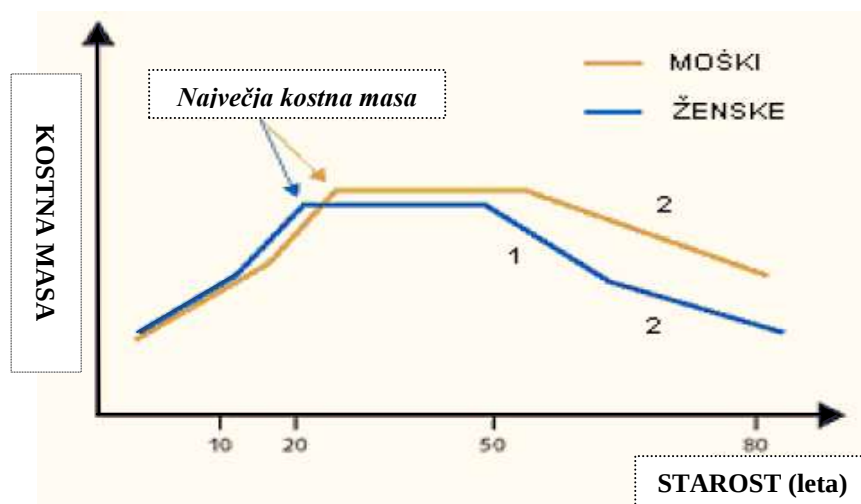
1.2.1. Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze

Gostota kosti narašča v času odraščanja. Kost pridobiva na moči in trabekularna kost doseže najvišjo vrednost gostote do 25., kortikalna pa do 35. leta starosti (**Slika 2**). Ko gradnja kosti doseže svoj maksimum (proces gradnje in razgradnje kosti sta uravnotežena), se kostna masa nekaj let ne spreminja. Po določenem času pa se začne proces zmanjševanja kostne mase, ki poteka do konca življenja. Za morebitni razvoj osteoporoze je tako najbolj pomembno obdobje do zaključka obdobja adolescence. Na doseženo vrednost največje kostne mase vplivajo genetski in zunanji dejavniki. Intenzivne raziskave in epidemiološke študije so pokazale, da na nastanek osteoporoze poleg rase (belci dosegajo najmanjše vrednosti MKG med vsemi rasami), spola (MKG je pri ženskah manjša), telesne aktivnosti in prehrane bogate s kalcijem v času adolescence ter starosti (izguba spolnih hormonov), vpliva tudi način življenja.

Med **dejavnike tveganja** za osteoporozo prištevamo še:

- način prehranjevanja,
- življenjske razvade (prekomerno uživanje alkohola, kave, kajenje),
- preveliko ali premajhno težo,
- pomanjkanje telesne aktivnosti,

- prekomerno telesno aktivnost (pojav stanja hipogonadotropnega hipogonadizma in amenoreje),
- jemanje nekaterih zdravil (glukokortikoidi) in
- kronične bolezni: hipertiroidizem, hiperparatiroidizem, bolezni jeter, žolčnih poti in prebavil, sladkorna bolezen (2, 5, 7).



Slika 2: Vpliv starosti na izgubo mineralne kostne gostote (MKG).

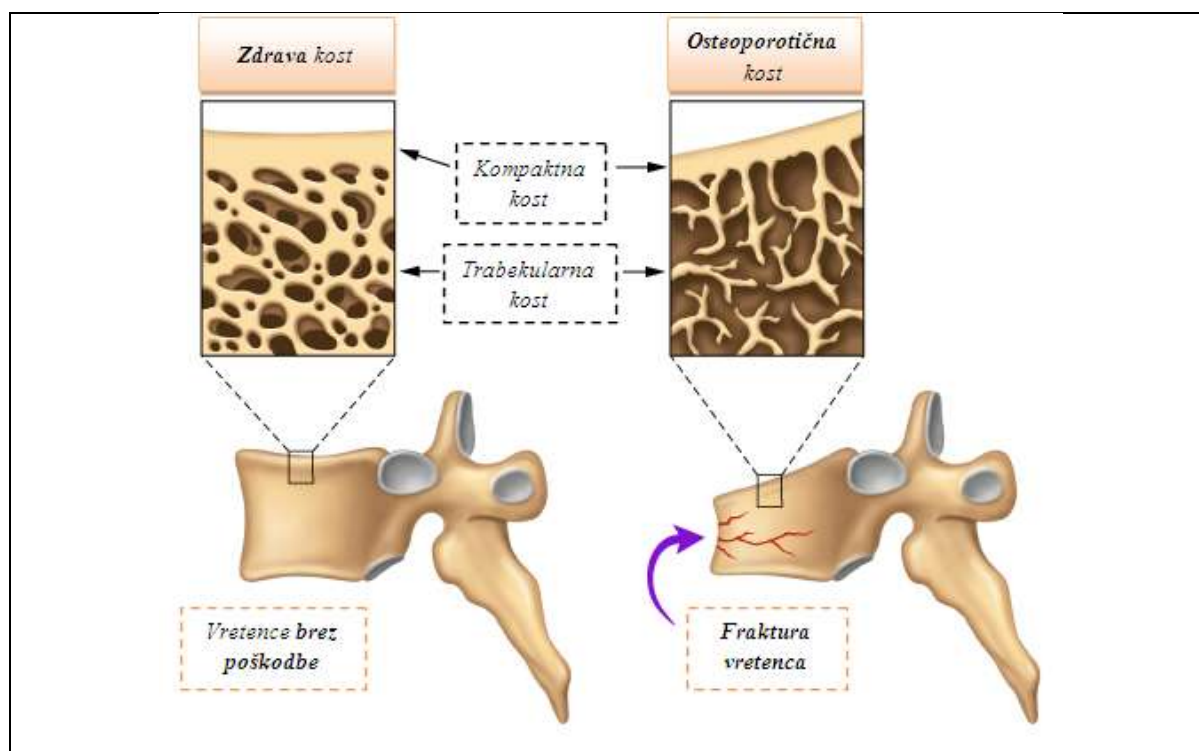
Leta 2006 je bila v Republiki Sloveniji opravljena študija prevalence osteoporoze. Vanjo je bilo vključenih 609 preiskovancev, od tega 361 žensk starih nad 50 let ter 168 moških starih nad 60 let. Ugotovljena je bila prevalenca, ki je pri ženskah znašala 27,5 %, pri moških pa 14,6 %. Izsledki meritev MKG so pri 43,2 % preiskovancev dokazali osteopenijo, pri 23,4 % pa osteoporozo. Iz študije je razvidno, da se pogostost osteoporoze s starostjo povečuje in da je bila prevalenca osteoporoze v starostnem obdobju med 80. in 89. letom skoraj 50-odstotna (**Preglednica II**) (8).

Preglednica II: Izsledki meritev MKG ter prevalenca osteopenije in osteoporoze.

Starost (leta)	Normalen izvid (%)	Osteopenija (%)	Osteoporoza (%)
50 – 59	39,2	48,4	12,4
60 – 69	33,1	43,2	23,7
70 – 79	31,3	41,1	27,6
80 - 89	21,2	30,3	48,5

1.2.2. Klinična slika

Osteoporoza je na začetku razvoja precej asimptomatska, vse dokler ne pride do zlomov kosti, kot so kompresijski zlomi vretenc, zlom zapestja in kolka. Za osteoporotične bolnike je značilno, da lahko že majhna telesna obremenitev (vstajanje iz sedečega položaja ali kašelj) privede do zloma. Glavni znak je bolečina v hrbtenici, pogosto v križu ali med lopaticama. Kadar pride še do dodatnih zlomov vretenc, se postopno deformira hrbtenica in bolniki občutijo kronične bolečine v hrbtu. Bolečina v hrbtu pa ni vedno sorazmerna s stopnjo osteoporoze. Pri postopni deformaciji vretenc je bolnik lahko povsem brez bolečin. Za končni izgled telesa, po kompresijskih osteoporotičnih zlomih prsnih in ledvenih vretenc, sta značilni izguba telesne višine (do 20 cm) in torakalna kifoza. Pri osteoporozi tipa II so najpogostejše prisotni zlomi kolka, ki so posledica zmanjšanja kortikalnega in trabekularnega dela kosti. Pri tem ne gre zgolj za količinsko zmanjšanje, ampak tudi za strukturne kostne spremembe, kot je npr. tanjšanje trabekul. Te postanejo najprej luknjičaste, postopoma lahko celo izginejo, prostori med trabekulami pa se večajo. Zlom kolka je pogosto usoden zaradi spremljajočih zapletov. Znano je, da eno leto po zlomu kolka umre eden od štirih bolnikov, eden od njih ne more več hoditi, dva pa sicer to lahko še počneta, vendar je njuna gibljivost močno zmanjšana (7).



Slika 3: Mikroarhitekturna struktura zdrave in osteoporotične kosti.

1.2.3. Diagnostika

Po priporočilu Svetovne zdravstvene organizacije (SZO, ang. *World Health Organization*, WHO) lahko osteoporozo diagnosticirajo z merjenjem MKG, z dvojno rentgensko absorpciometrijo (DEXA, ang. *Dual-Energy X-ray Absorptiometry*) ali na osnovi že dokazanih osteoporotičnih zlomov. Prav z merjenjem MKG z DEXA so postavili definicijo ugotavljanja prisotnosti in obsega osteoporoze (**Preglednica III**) (9).

Preglednica III: Definicija osteoporoze na osnovi merjenja MKG z DEXA (9).

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

Osteoporozo lahko definiramo in diagnosticiramo s pomočjo naslednjih tehnik (2, 10, 11):

- **Enoenergetske rentgenske absorpciometrije** (ang. *Single-Energy Absorptiometry*), ki omogoča določitev obrobni delov okostja (npr. podlahti, zapestja). Pri tej metodi uporabljajo enoenergetski snop žarkov.
- **Dvoenergetske rentgenske absorpciometrije**, DEXA (ang. *Dual-Energy X-ray Absorptiometry*), pri kateri gre za absorpcijo dveh rentgenskih žarkov z različnima energijama. Eden meri absorpcijo mehkega tkiva, drugi pa absorpcijo celotnega okostja. Razlika med meritvama pa pripada absorpciji na račun kostne mase.
- **Enojne fotonske absorpciometrije** (ang. *Single Photon Absorptiometry*), ki je najstarejša in hitra metoda, a najmanj zanesljiva. Uporablja gama žarke z enojno energijo, ki jih ozko usmerjene pošiljamo skozi izbrani del telesa. Te metode ne moremo uporabljati za merjenje hrbtenice in kolka, ker se na ta način ne da standardizirati debeline mehkih tkiv.
- **Dvojne fotonske absorpciometrije** (ang. *Dual-Photon Absorptiometry*), ki temelji na izkoriščanju gama žarkov z dvema različnima energijama. Ta metoda nam omogoča merjenje kostne mase celotnega telesa, hrbtenice, vratu in velikega trohantra stegenice.

- **Kvantitativne 3D računalniške tomografije (CT, ang. Computed Tomography)**, ki poteka z meritvijo absorpcije dvodimenzionalnih rentgenskih žarkov okrog iste rotacijske osi. Računalnik na osnovi dobljenih podatkov ustvari tridimenzionalno podobo notranjosti opazovanega dela telesa. Metoda omogoča volumetrično določitev (v mg/cm^3) trabekularne in kortikalne gostote vretenc, kolka in drobnih delov okostja, npr. golenice in podlakti.
- **Ultrazvočne kvantitativne ultrasonografije (QUS, ang. Quantitative UltraSonography)** je čedalje pogostejše uporabljena metoda, ki služi kot presejalni test za osteoporozo. Omogoča pregled trabekularnih kosti petnice, pogačice in proksimalne falange prsta ter kortikalnega dela kosti na sprednji tretjini tibije. Temelji na merjenju oslabitve ultrazvočnega valovanja (BUA) in spremembi hitrosti ultrazvoka (SOS) pri prehodu skozi kost. Tako BUA kot SOS sta odvisna od mineralne kostne gostote in sprememb v mikroarhitekturi kosti. Na osnovi sprememb BUA in SOS lahko napovemo tveganje za osteoporotične zlome.
- **Scintigrafije okostja**, ki je invazivna metoda. Potrebna je intravenska aplikacija radiofarmakov v obliki polifosfatov, na katere je kemično vezan radioaktivni tehneций (Tc-99m). Ti se absorbirajo na organskem in anorganskem delu kostnine. Tako zagotovijo dobro razločevanje med osteoporotičnimi zlomi vretenc, ki povzročajo heterogene spremembe kostnega mozga in metastazami, ki povzročajo homogene spremembe kostnega mozga in s tem homogeni signal. S kompleksnim postopkom na računalniku dobimo scintigram, ki odraža stanje kostne premene.
- **Kostno biopsijo**, ki je invazivna preiskovalna metoda kostnine, pri kateri z uporabo električnega svedra odvzamemo vzorce tkiva iz grebena črevnice. Zagotavlja nam informacijo o kakovosti zgradbe kosti (delež kortikalne in trabekularne kostnine, količine osteoida) ter kvantitativne histomorfometrične, statične in dinamične parametre o kostni strukturi. Indikacije za kostno biopsijo so sum na osteomalacijo oziroma neznano razmerje med osteoporozo in osteomalacijo ter pomenopavzalna osteoporozo z nenavadnim potekom (11).

MKG je pomemben pokazatelj tveganja za zlome, vendar nam ne daje vrednosti o izgubi kosti, ampak samo trenutno oceno. Zato pa nam določanje biokemičnih označevalcev v serumu ali urinu omogoča spremljanje procesa tvorbe in resorpcije kosti. S kombinacijo

merjenja MKG in biokemičnih označevalcev lahko torej izboljšamo oceno tveganja za nastanek zlomov in spremljanje uspešnosti zdravljenja (13).

Biokemični označevalci tvorbe kosti, ki jih določamo v serumu (1,13):

- **BALP – kostna alkalna fosfataza** (*ang. Bone alkaline phosphatase*) je encim, ki dokazuje aktivnost osteoblastov. Pri pomenopavzalni osteoporozi je vrednost BALP običajno v normalnem območju.
- **OC - osteokalcin** (*ang. Osteocalcin*) je tudi vezan na aktivnost osteoblastov. Njegova koncentracija v serumu narašča linearno s starostjo in je v negativni korelaciji z zmanjševanjem kostne gostote ledvenih vretenc. Zvišanje serumskega OC torej označuje pospešeno presnovo kosti.
- **PICP/PINP - prokolagen tip I C/N propeptid** (*ang. C/N-terminal propeptide of type collagen I*), nastane po cepitvi molekule prokolagena tipa I in vsebuje C ali N-terminalni podaljšek.

Biokemični označevalci resorpcije kosti (1, 13):

Najbolj uporabni označevalci kostne resorpcije so razgradni produkti, ki nastanejo z encimsko hidrolizo kolagena tipa I. Ta predstavlja več kot 90 % beljakovin kosti, zato mnogi označevalci izhajajo prav iz sproščenih fragmentov kolagena. Poznamo:

- **PYD – piridinolin** (*ang. Pyridinoline*), ki ga določamo v urinu.
- **DPD – deoksi piridinolin** (*ang. Deoxypyridinoline*), ki ga prav tako določamo v urinu, a je bolj specifičen kot PYD.
- **ICIP – prečno povezani karboksiterminalni telopeptid kolagena tipa I** (*ang. Cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen*), ki ga določamo v serumu.
- **HYP – hidroksiprolin** (*ang. Hydroxyproline*), ki ga določamo v urinu.
- **CTX – karboksiterminalni prečno povezani telopeptid** (*ang. Cross-linked C-telopeptide*), ki nastane pri razgradnji ICIP, ki ga lahko določamo v urinu ali v serumu.
- **NTX – aminoterminalni prečno povezani telopeptid** (*ang. Cross-linked N-telopeptide*), ki ga določamo v urinu ali v serumu.

Poznamo tudi biokemične označevalce resorpcije kosti, ki ne sodijo v skupino razgradnih produktov kolagena:

- **TRAP – tartrat rezistentna kisl fosfataza** (*ang. Tartrate-resistant acid phosphatase*), ki jo izločajo osteoklasti in jo določamo v serumu.
- **Ca – kalcij**, ki ga določamo v urinu.
- **BSP – kostni sialoprotein** (*ang. Bone sialoprotein*).

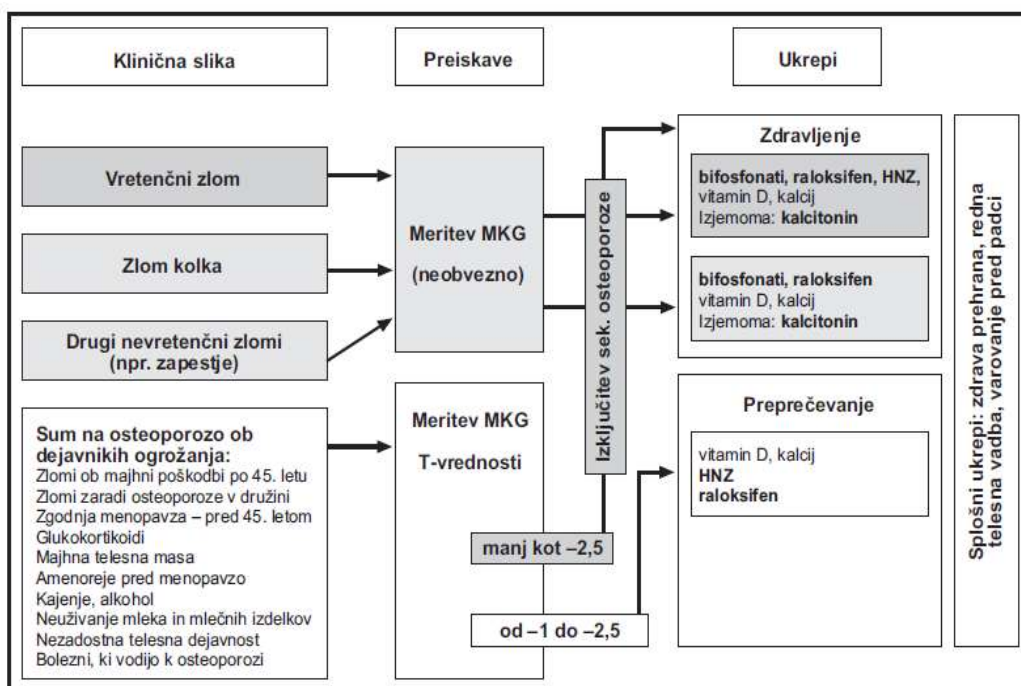
Pred pričetkom zdravljenja ugotovljene osteoporoze moramo obvezno izključiti sekundarno osteoporozo, in sicer na osnovi naslednjih preiskav seruma oziroma krvi: krvna slika, kalcij, fosfat, alkalna fosfataza, kreatinin, proteinogram, AST, ALT, TSH, pri moških pa še celokupni testosteron (9).

Eden od najnovejših prognostičnih označevalcev osteoporoze je indeks FRAX (*ang. Fracture Risk Assessment Tool*). Gre za model, ki ga je za pridobivanje ocene tveganja osteoporotičnega zloma razvila SZO. Z uporabo računalniškega programa in vključevanjem vseh dejavnikov tveganja (starost, spol, vrednost MKG, indeks telesne mase, pojav zloma kosti v družini, pitje alkohola, kajenje, zdravljenje z glukokortikoidi, revmatoidni artritis, itd.) lahko predvidimo odstotek možnosti zloma kosti v nadaljnjih desetih letih (14). Ta diagnostični kazalec se kot del diagnostike osteoporoze v Republiki Sloveniji zaenkrat še ne izvaja.

1.2.4. Zdravljenje

V Republiki Sloveniji so smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze temeljile na mednarodnih priporočilih, in sicer International Osteoporosis Foundation ali IOF (Osteoporosis Intern 1999: 259-265) ter Medical Guidelines for Clinical Practice for the Prevention and Management of Postmenopausal Osteoporosis (Endocrine Practice 2001; 7; 293-312). Smernice so nastale na osnovi izsledkov, z dokazi podprte medicine in priporočajo uporabo naslednjih zdravil: zaviralcev kostne resorpcije (hormonsko nadomestno zdravljenje, bifosfonati, raloksifen, kalcitonin), pripravkov s kalcijem in vitaminom D ter analogov vitamina D (kalcitrol, alfakalcidiol) (9).

V zadnjih letih se je odnos do preventive in zdravljenja osteoporoze spremenil, še zlasti po izsledkih randomizirane klinične preiskave (RKR) Women's Health Initiative (WHI). Evropska agencija za zdravila (EMA) in Ameriška agencija za zdravila (FDA) sta leta 2003 podali priporočilo, po katerem hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ) ni več primerno kot postopek izbora za zdravljenje osteoporoze, saj je tveganje večje od koristi same terapije za to indikacijsko področje. Danes velja, da HNZ, tako pri preventivi, kot pri zdravljenju osteoporoze, ni več zdravilo prvega izbora. Uporaba HNZ je možna samo pri ženskah, ki imajo v perimenopavzi in zgodnji menopavzi klimakterične težave in izrazita tveganja za zlome, pa še to samo v primeru, ko ima vpliv zdravljenja zanje večjo korist od potencialnega tveganja. Ponovno se uveljavlja sočasna uporaba kalcija in vitamina D (15). Vitamin D ima pomemben vpliv na razvoj, delovanje in ohranjanje mišičnih vlaken. Kombinacija s kalcijem tako predvsem preprečuje padce in krepi mišično maso (17).



Slika 4: Smernice za odkrivanje, preprečevanje in zdravljenje osteoporoze v Republiki Sloveniji (9).

Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze v Republiki Sloveniji iz leta 2002 ne vključujejo nekaterih novejših terapevtskih sredstev, kot so (15, 18):

- **Stroncijev ranelat**, ki vzpodbuja tvorbo nove kosti, ob tem pa zavira kostno razgradnjo. Povečuje dozorevanje osteoblastov in nastajanje osteocitov podobnih celic.
- **Teriparatid**, človeški rekombinantni parathormon, ki pri bolnicah s pomenopavzalno osteoporozo, v obliki podkožnih injekcij, spodbuja tvorbo nove, kakovostne kosti in tako zniža tveganje za vretenčne in nevretenčne zlome.
- **Denosumab**, naravno monoklonsko telo, ki zavira receptorski aktivator RANKL in na ta način preprečuje osteoblastogenezo. Hkrati pri osteoporotičnih bolnicah zvišuje MKG in zmanjšuje kostno premeno.
- **Novi selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM)**, ki so še v teku preiskav. Mednje uvrščamo Lasofoksifen, Bazedoksifen in Arzoksifen. Veliko obeta tudi novi t.i. "vazomotorni SERM", ki naj bi deloval namesto HNZ pri odpravljanju klimakteričnih težav, ob tem pa še antiresorptivno na kost.
- **Aktivin**, protein, ki je del transformacijskega dejavnika rasti kostnega morfogenetskega proteina β (TGF- β /BMP). Preprečuje delovanje osteoblastov na mineralizacijo kosti.

1.3. Oksidativni stres in antioksidativni obrambni sistem

Oksidativni stres nastane zaradi porušenega ravnotežja med oksidativnimi dejavniki in antioksidativno sposobnostjo organizma, ki varuje in popravlja poškodbe, nastale zaradi prisotnosti prostih radikalov in reaktivnih kisikovih zvrsti (*ang. Reactive Oxygen Species, ROS*). Proste radikale lahko definiramo kot molekule ali molekulske fragmente, ki imajo enega ali več neparnih elektronov v atomski ali molekulski orbitali (19). Radikali, ki nastanejo iz kisika, predstavljajo v bioloških sistemih najpomembnejšo skupino radikalov vrst. Nastajajo kot intermediati v različnih reakcijah, ki jih katalizirajo encimi ali pa so posledica razpada molekul zaradi zunanjih dejavnikov, kot so: vnetni citokini, rastni dejavniki, kemoterapevtiki, UV svetloba, ionizirajoče sevanje in redoks reakcije (20).

ROS imajo v organizmu dve pomembni vlogi:

- v patofizioloških procesih (oftalmoloških, kardiovaskularnih, nevrodegenerativnih bolezni, itd.) lahko uničijo proteine, lipide, DNA ali celo izzovejo celično apoptozo, poleg tega pa
- so ključne sporočilne molekule v fizioloških procesih, saj so nujne za aktivnost pomembnih celičnih signalnih poti (jedrnega faktorja κB (NF- κB), JNK, p38/MAPK).

V skupino ROS uvrščamo (19):

- superoksidne radikale ($O_2^{\cdot -}$), ki nastajajo z delovanjem NADPH oksidaze oziroma v mitohondrijih, v transportni verigi elektronov,
- hidroksilne radikale ($\cdot OH$),
- hidroperoksidne radikale ($HOO^{\cdot}$),
- vodikov peroksid (H_2O_2) in
- singletni kisik (1O_2).

Delovanje ROS pa še ojačujejo reaktivne dušikove spojine (RNS), npr. $NO^{\cdot}$.

Celice se na oksidativni stres odzovejo tako, da aktivirajo encimske in neencimske antioksidantne sisteme ("lovilce radikalov"). Ti vključujejo (21):

- encime, ki reagirajo z ROS in jih pretvorijo v netoksične produkte :
 - superoksidna dismutaza (SOD),
 - hidroperoksidaze (katalaza in peroksidaze),
 - glutationski sistem (glutation-peroksidaza in glutations-reduktaza),
 - tioredoksin reduktaza.
- neencime:
 - nizkomolekularni antioksidanti: vitamin C oziroma askorbinska kislina, ki lahko deluje kot antioksidant ali prooksidant (v kolikor je koncentracija kovinskih ionov, npr. Fe^{3+} večja od koncentracije vitamina C); vitamin E, ki sodi med fenolne antioksidante in ima sposobnost, da pretrga oksidativno verižno reakcijo,
 - endogeni antioksidanti: sečna kislina in lipojska kislina,
 - glutation,
 - tokoferol,

- karotenoidi, ki so dobri lovilci prostih radikalov zlasti pri majhnih parcialnih tlakih kisika (npr. v zdravem tkivu).

V primeru, da organizem s svojimi antioksidativnimi obrambnimi mehanizmi oksidativnega stresa ne obvlada ustrezno, lahko pride do resnih posledic. Zaradi porušenega ravnotežja med oksidativnimi in antioksidativnimi procesi nastanejo posredne in neposredne poškodbe celic in tkiv (22). Posredne predstavljajo predvsem neželeno delovanje na celične procese, tudi tiste, ki aktivirajo gene, povezane s promocijo apoptoze. Tarče neposrednih poškodb pa so proteini, lipidi (lipidna peroksidacija), nukleinske kisline (DNA) in določene majhne molekule, kot na primer biogeni amini (30).

Oksidativni stres merimo s pomočjo biokemijskih označevalcev, ki jih določamo v krvi in urinu. Mednje uvrščamo reducirani in oksidirani glutation, antioksidantne proteine (transferin), amoniak, laktat ter 8-hidroksigvanozin (8-OHdG), monoklonsko protitelo proti 4-hidroksil-2-nonenalu (4-HNE) in proti timidin glikolu, heksanoil lizin (HLE), isoprostan ter monoklonska protitelesa proti malondialdehidu (MDA) in proti dibromotirozinu, itd. (23, 24).

1.3.1. Tioredoksinski sistem

Tioredoksinski sistem sestavljajo protein tioredoksin (TRX) in družina encimov tioredoksinskih reduktaz (TrxR). Igra pomembno vlogo pri vzdrževanju normalnega redoks stanja v celici in je prisoten tako v prokariontih kot evkariontih. Vpleten je v celične funkcije kot so npr. sinteza deoksiribonukleotidov, redoks nadzor transkripcijskih dejavnikov in zaščita pred oksidativnim stresom.

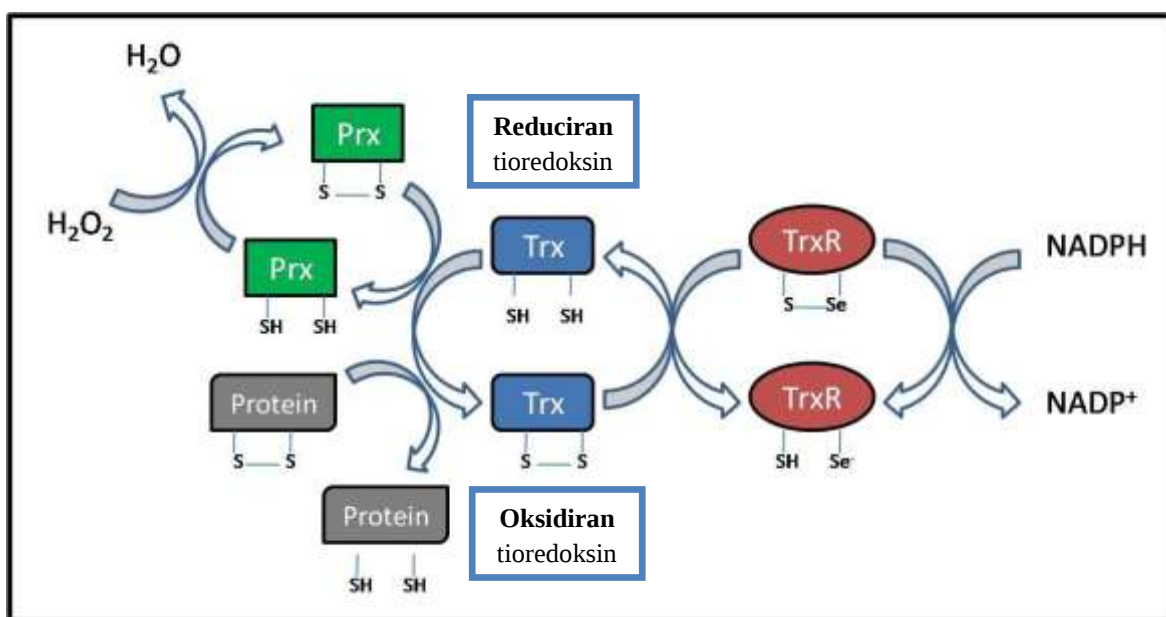
Tioredoksinski sistem je sestavni del celičnih procesov, ki potekajo preko tiolnih-redoks reakcij (32). Mednje sodijo:

- redukcija ribonukleotidne reduktaze,
- celična proliferacija,
- modulacija transkripcijskih dejavnikov (NF- κ B, p53, AP-1, Sp-1, glukokortikoidni receptor),
- reproduktivni procesi,
- povezovanje v peroksidaze v človeških eritrocitih,

- obrambni sistem proti škodljivim vplivom UV sevanja,
- obrambni sistem proti oksidativnemu stresu in
- obrambni sistem proti nastanku rakavih celic.

Tioredoksinski sistem je bil nedolgo nazaj izbran za eno od terapevtskih tarč pri zdravljenju raka. Ugotovili so namreč, da v kolikor je v agresivnih tumorjih miši prisotno prekomerno izražanje tioredoksina ter zmanjšano izražanje tioredoksinske reduktaze, to upočasni napredovanje tumorja in metastaziranje (27).

Tioredoksinska reduktaza reducira tioredoksin in s tem tudi oksidiran cistein v celičnih proteinih. Rezultat je odstranitev peroksidov preko peroksiredoksinov in s tem zaščita celice pred oksidativnim stresom (27). Peroksiredoksin sicer ne spada v tioredoksinski sistem, vendar pa je del mitohondrijske tioredoksinske signalne poti (37).



Slika 5: Tioredoksinski redoks sistem (TRX – tioredoksin, TrxR - tioredoksinska reduktaza, Prx – peroksiredoksin) (46).

1.3.1.1. Tioredoksini

Tioredoksini je majhen protein z dvema redoks-aktivnima cisteinoma (Cys-32 in Cys-35). Za vse tioredoksine je značilno aktivno redoks zaporedje cistein-glicin-prolin-cistein (Cys-Gly-Pro-Cys), ki omogoča redukcijo disulfidnih vezi v proteinih in peptidih (29). Tioredoksini obstajajo v dveh osnovnih oblikah, in sicer v reducirani (tioredoksin-(SH)₂) ali v

oksidirani (tiorredoksin-S₂) (30). V prvem primeru se obnaša kot proteinska disulfidna-oksidoreduktaza. Reducirana oblika nastane kot posledica delovanja tiorredoksinske reduktaze (TrxR) v prisotnosti NADPH. Poznamo tri izoforme tiorredoksina, ki se ločijo po velikosti in celični lokaciji (29):

- **tiorredoksin-1 (TRX1)**: citoplazemski protein z maso 12kDa,
- **tiorredoksin-2 (TRX2)**: mitohondrijski protein z maso 18kDa in
- skrajšani TRX1 (1-80) ali **tiorredoksin-80 (Trx80)**, ki je dejavnik okrepljene eozinofilne citotoksičnosti.

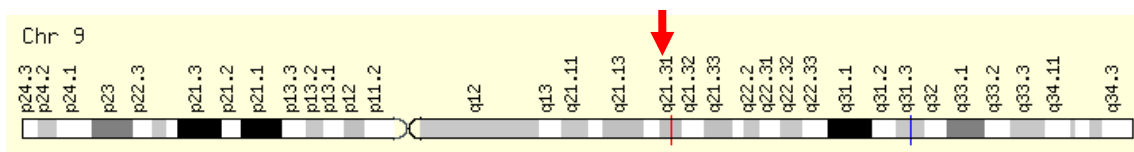
Tiorredoksin poznamo tudi kot disulfidno reduktazo, ki reducira večino proteinov, ki vsebujejo disulfidne vezi, vključno z ribonukleotidno reduktazo, tiorredoksinsko peroksidazo (peroksiredoksin) in metioninsko sulfoksidno reduktazo (25).

Reducirani tiorredoksin deluje na več tarč, preko katerih izraža svoje učinke (**Preglednica IV**). Predvsem vzpodbuja rast celic, zavira njihovo apoptozo in pospešuje angiogenezo v tumorjih (27). Ugotovili so, da tiorredoksin pomembno vpliva tudi na odstranitev hidroksilnih radikalov in onesposobitev singletnega kisika (25). Uravnava redoks stanje in aktivnost transkripcijskih dejavnikov ter nadzira proliferacijo, hipoksične odzive in apoptozo celic (28). Tiorredoksin veže ROS, še preden bi ti lahko naredili škodo celicam in jih tako varuje pred oksidativnim stresom (27).

Tiorredoksin je prisoten v normalnih tkivih, izrazito močno pa je izražen pri raku na pljučih, materničnem vratu, trebušni slinavki, želodcu in dojkah (33).

Preglednica IV: Proteinske tarče reduciranega tiorredoksina in njegov učinek.

Proteinska tarča	Učinek
Peroksiredoksin (PRDX)	Odstranitev ROS
Ribonukleotidna reduktaza (RR)	Sinteza DNA
NF-κB, AP-1, SP-1	Aktivacija transkripcijskih dejavnikov
HIF-1α, VEGF	Angiogeneza
ASK-1, PTEN	Inhibicija apoptoze



Slika 6: Položaj gena, ki kodira za tioredoksin na človeškem kromosomu 9 (34).

V okviru določenih študij so že preiskovali nekatere od polimorfizmov TRX1, in pri tem ugotovili, da:

- je alel -7953T>C statistično značilno povezan z nizkimi vrednostmi krvnega tlaka.
- so aleli rs2776C>T, rs2301241A>G, rs1410051A>G, rs1345168A>G, rs4135192T>C, rs2418076G>A, rs4135208AG, rs4135211A>C, rs4135165G>A, rs4135172G>A, rs4135179T>C, rs4135179T>C, rs4135221A>G povezani z rakom dojk.

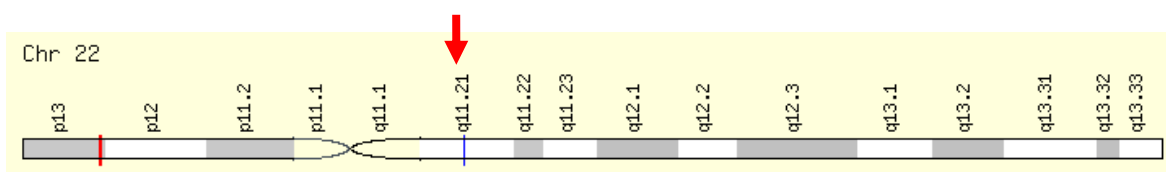
Poleg tega pa so vloge polimorfizmov TRX1 preučevali tudi v povezavi z boleznimi jeter in ledvic ter diabetesom, shizofrenijo, Alzheimerjevo boleznijo, akutnim pankreatitisom, ishemijo srca, revmatoidnim artritisom, sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS), itd.

1.3.1.2. Tioredoksinna reduktaza D2

Tioredoskinska reduktaza sodi v družino piridinskih nukleotidnih-disulfidnih oksidoreduktaz, imenovanih tudi homodimerne flavoproteinske reduktaze. Za razliko od tioredoksina, ima substratno specifičnost, saj lahko reducira tudi nesulfidne substrate kot so na primer lipidni hidroksidi. Tioredoksinna reduktaza vsebuje dve redoks-aktivni mesti. Prvo je med 59. in 64. aminokislino (Cys-Val-Asn-Gly-Cys), drugo pa v C-terminalnem delu in vsebuje selenocistein (SeCys), in sicer v zaporedju Gly-Cys-SeCys-Gly. Prvo aktivno mesto pridobi elektron od NADPH na FAD (flavin-adenin dinukleotida), ta pa ga prenese do drugega redoks-aktivnega položaja s SeCys. SeCys skupaj z sosednjim Cys, predstavlja redoks-aktivno mesto, v katerem nastane selenenilsulfid potem, ko pride do darovanja elektrona tioredoksinu ali drugemu ustreznemu substratu. Tioredoksinna reduktaza posredno reducira tudi encim tioredoksinsko peroksidazo, ki odstranjuje vodikov peroksid (28, 29).

Poznamo več različnih tioredoksinskih reduktaz (28, 29, 31):

- Citosolsko tioredoksinsko reduktazo 1 (TrxR1), velikosti 54,4 kDa, ki jo kodira gen *TXNRD1*,
- mitohondrijsko **tioredoksinsko reduktazo 2 (TrxR2)** velikosti 56,2 kDa, ki jo kodira gen *TXNRD2* in
- specifično tioredoksinsko glutationsko reduktazo (TGR), ki jo kodira gen *TXNRD3*. Za razliko od TrxR1 in TrxR2 ta vsebuje še monotiolni glutaredoksin in je izražena predvsem v spermatidih in testisih.



Slika 7: Položaj gena, ki kodira tioredoksin reduktazo D2 na človeškem kromosomu 22 (34).

Obstajajo tudi študije, opravljene na področju raziskav tioredoksinske reduktaze D2, in sicer predvsem v povezavi z rakom dojke. Preiskovali so zlasti naslednje polimorfizme:

- rak dojke: **rs5748469G>T**, rs2073752G>A, rs756661C>T, rs2020917C>T, rs740603A>G, rs4485648A>G, rs732262G>A, rs2073750G>A, rs3788306A>G.
- Kashin-Beckova bolezen: **rs5748469G>T**

1.3.2. Vpliv oksidativnega stresa na razvoj osteoporoze

Močno zmanjšano zaščitno delovanje posameznih fizioloških antioksidativnih sistemov proti poškodbam z ROS, ima za posledico bolezenske spremembe kot so rak, diabetes, ateroskleroza, revmatoidni artritis, osteoartritis in **osteoporoza** (45).

Izgubo kostne mase v starosti, poleg drugih dejavnikov, povzroča tudi povečano nastajanje ROS, ob sočasnem pomanjkanju elementov, ki so potrebni za izgradnjo kostnine. S starostjo se poveča apoptoza osteoblastov in osteoklastov, zaradi česar se zmanjša tvorba kosti. Lean in sodelavci so v študijah dokazali, da imajo pri varovanju kostnega tkiva pred škodljivimi vplivi ROS pomembno vlogo estrogeni. Ugotovili so, da lahko z odstranitvijo fiziološkega vira estrogena povzročijo zmanjšanje delovanja »tiolnega« antioksidativnega sistema. Pri tem so tiolna antioksidanta **tioredoksin** in glutation, ter njuna regenerativna

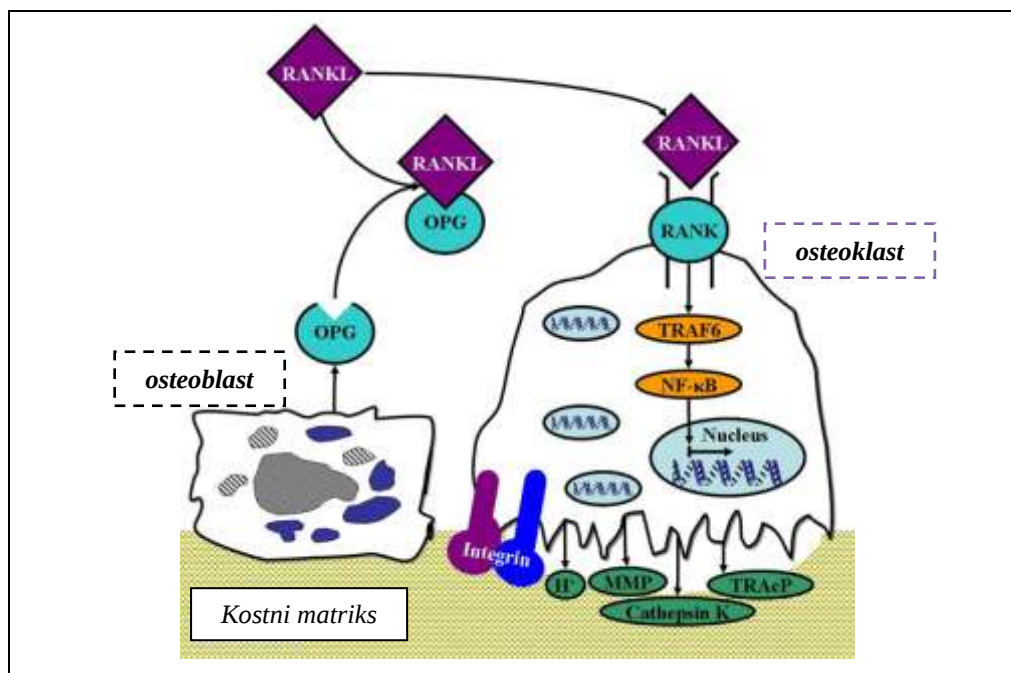
encima **tiorredoksinska reduktaza** in glutationska-S-reduktaza manj aktivni, kar bi lahko povezali z zmanjšano MKG in pojavom osteoporoze. Očitno torej estrogeni preko tiolnih antioksidantov vplivajo na celične signalne poti, katerih aktivator je ROS (37, 45).

Celica se zoper delovanje ROS brani tudi z zvišanjem ravni encimov oziroma lovilcev radikalov, kot so od mangana odvisna superoksidna-dismutaza (Mn-SOD), superoksidna katalaza in sistema glutationska reduktaza/glutation/glutationska peroksidaza ter tiorredoksinska reduktaza/tiorredoksin/tiorredoksinska peroksidaza (44). Zvišane koncentracije ROS imajo dva učinka: poškodujejo lahko celične komponente ali pa sprožijo specifične fiziološke signalne poti.

Sprožitev fizioloških signalnih poti poteka preko različnih transkripcijskih dejavnikov: jedrnega transkripcijskega dejavnika κ B (NF- κ B), tumorskega supresorskega proteina p53, HSF-1 (*ang. Heat shock factor 1*) ali preko signalnih poti encimov, ki vplivajo na omenjene dejavnike (sistemi PI3K/Akt, JNK, p38/MAPK). Končni odziv po prenosu signalov vpliva na gensko podvajanje in prepisovanje, odvisen pa je od trajanja in jakosti stresa oziroma vrste sproženih signalnih poti in ravnovesja med njimi. Ker se jakost oksidativnega stresa povečuje s staranjem, se končni neto odziv kaže v zmanjšani delitvi, rasti in diferenciaciji celic ter v povečanem obsegu celične smrti (47). Za osteoklaste so bistvenega pomena signalne poti, ki so občutljive na ROS in v katerih delujejo naslednji dejavniki: NF- κ B, aminoterminalna kinaza c-Jun (JNK), fosfatidilinozitolna 3-kinaza (PI3K) in kinaza p38 MAPK. Makrofagne kolonije vzpodbujajoči dejavnik M-CSF (*ang. Macrophage Colony Stimulating Factor*) in membranski citokin RANKL (*ang. Receptor Activator for NF- κ B Ligand*) pomembno vplivata na diferenciacijo osteoklastov. RANKL nastaja v osteoblastih, spodbuja nastanek novih osteoklastov, pospeši delovanje zrelih celic in preprečuje njihovo apoptozo potem, ko se veže na funkcionalne receptorje RANK izražene na membrani osteoklastov. Ob tem pride do pospešitve procesov diferenciacije in aktivacije osteoklastov ter do njihovega zlitja v večjedrne osteoklaste. Preživetje osteoklastov se podaljša, saj je njihova apoptoza upočasnjena. Zato se poveča razgradnja kostnine, to pa vodi v zmanjšanje kostne mase. Delovanje RANKL zavira osteoprotegerin (OPG), ki tekmuje z receptorji RANK za vezavo omenjenega liganda. Tako OPG v kostnih celicah inhibira zadnje stopnje diferenciacije osteoklastov, zavira njihovo aktivacijo in inducira njihovo apoptozo (**Slika 8**) (49).

Večje izražanje RANKL v osteoblastih sprožijo PTH, citokini interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) in interleukin-11 (IL-11) ter 1,25-(OH)₂-D. Izražanje RANKL v

osteoblastnih celicah pa spodbujajo: pomanjkanje estrogena, starost in povečano nastajanje ROS. Slednji (ROS) vplivajo na tvorbo osteoklastov in resorpcijo kosti. Vpliv ROS na izražanje RANKL so proučevali Bai in sodelavci, in ugotovili, da omenjena povezava lahko sproži osteoporozo pri miših (50).



Slika 8: Delovanje RANKL-a in OPG. RANKL-ligand receptorja za aktivacijo jedrnega transkripcijskega dejavnika NF- κ B, RANK – receptor za aktivacijo jedrnega transkripcijskega dejavnika NF- κ B, OPG – osteoprotegerin, TRAF6 – receptor s TNF-povezanega dejavnika, NF- κ B – jedrni transkripcijski dejavnik κ B, MMP – metalo proteinaza zunajceličnega matriksa.

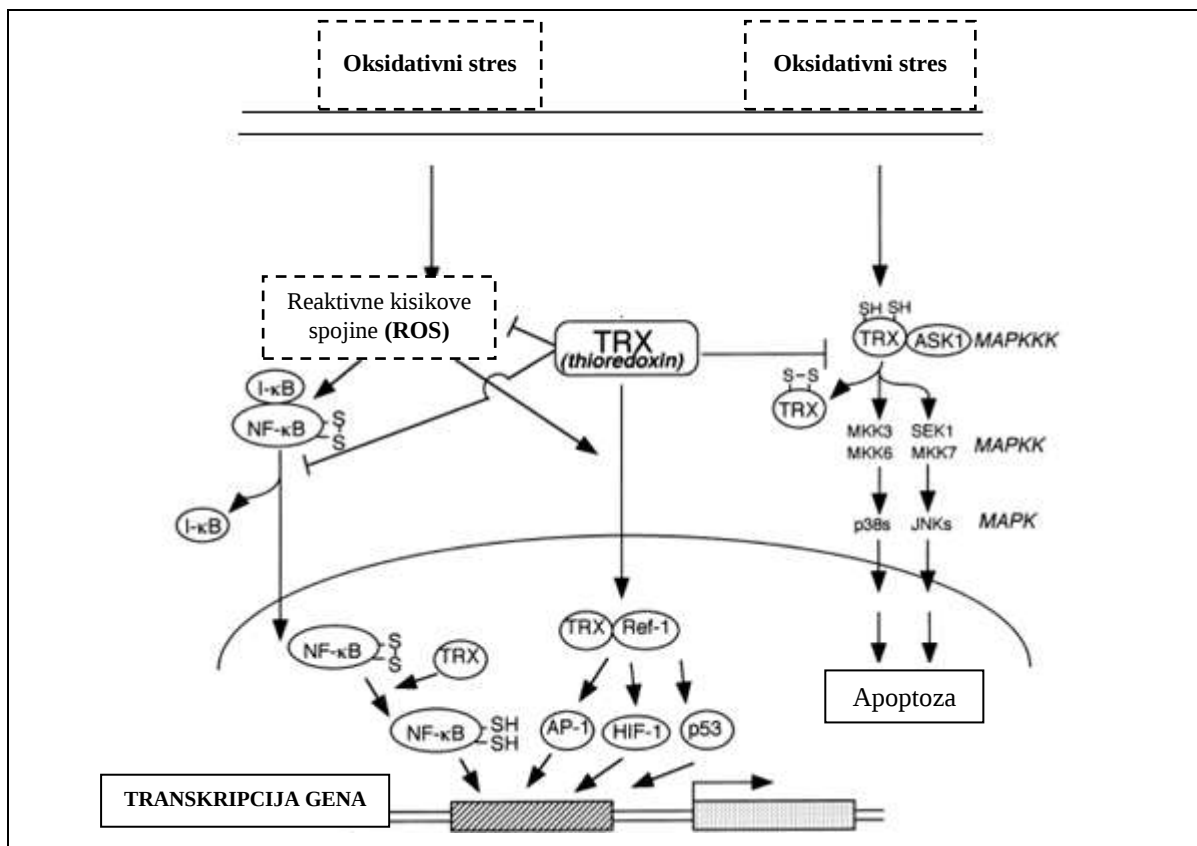
1.3.2.1. Signalne poti pri tioredoksinu in morebitne povezave z razvojem osteoporoz

Jedrni transkripcijski dejavnik NF- κ B pomembno souvaja apoptozo in celični odziv na oksidativni stres. Nastajanje ROS sproži signalno pot NF- κ B (44, 47). Kljub temu, da tioredoksin prepreči razpad inhibitorja I κ B v citoplazmi, ta še vedno omogoča povezavo NF- κ B z DNA, in sicer preko redukcije disulfidne vezi v NF- κ B (28).

Ostali transkripcijski dejavniki, ki so občutljivi na tioredoksin so: tumorski-supresor p53, hipoksični inducibilni dejavnik-1 α (HIF-1 α , ang. *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*), glukokortikoidni receptor in proteinski kompleks AP-1 (ang. *Activator Protein-1*) (32). Tioredoksin lahko nekatere transkripcijske dejavnike reducira neposredno, določeni transkripcijski dejavniki pa potrebujejo molekule Ref-1 kot posrednike. Tisti, ki so odvisni

od interakcije TRX/Ref-1 so pomembni za aktivacijo večine genov, ki vzpodbujajo celično preživetje v odzivu na oksidativni stres. Ref-1 je pomemben redoks signalni dejavnik, znan tudi kot DNA-popravljalna endonukleaza (29). Tioredoksin torej lahko zaščiti celice pred oksidativnim stresom preko povezave z Ref-1. Dejavnik AP-1 je pomemben za rast celic. Vsebuje zaporedje amino kislin, ki obkroža aktivni cistein, tako da tioredoksin nanj ne more neposredno delovati. V tem primeru namreč tioredoksin deluje kot donor elektrona redoks proteinskemu kompleksu Ref-1/APE (*ang. Redox factor 1-apurinic/aprimidinic endonuclease*), ki v zameno za redukcijo tiolov stimulira vezavo med AP-1 in DNA. V obeh primerih tako TRX z mehanizmi popravljanja DNA vpliva na celično rast (28). Ref-1 z redukcijo cisteinov pospeši tudi vezavo ostalih transkripcijskih dejavnikov, vključno s p53 in HIF-1 α , na DNA.

Tioredoksin naj bi bil udeležen v procesu apoptoze in sicer na osnovi dveh različnih mehanizmov. Poleg že omenjene signalne poti NF- κ B, tudi preko signalizacije z ASK-1 (*ang. Apoptosis Signal-regulating Kinase-1*), ki je del družine MAPKKK (*ang. Mitogen Activated Protein Kinase-Kinase-Kinase*) (29, 44).



Slika 9: Signalne poti pri delovanju ROS (43).

Reducirani TRX [Trx (SH)₂] reagira z N-terminalnim delom ASK-1, s čemer zavre aktivnost serin-treoninske-kinaze (SEK, *ang. Serine-Threonine Kinase*), ki sodi v družino MKKK. TRX se pod vplivom ROS oksidira, temu pa sledi njegova ločitev od ASK-1. S tem je onemogočena aktivacija ASK-1, zato se spremeni apoptozni signal, kar je pomemben obrambni mehanizem proti oksidativnemu stresu (29, 43, 50, 51).

Tioredoksin pospešuje tudi nastanek IL-6 in ima zmožnost uravnavanja aktivacije p38, kinaze MAP, IL-6 in tumor nekrotizirajočega dejavnika α (TNF- α , *ang. Tumor Necrosis Factor- α*) (44). V signalni poti fosfatidil inozitol 3 kinaze (PI3K) je tioredoksin negativni regulator, saj inhibira fosfatazo (28).

V nedavno opravljenih študijah so ugotovili, da sta v signalni poti RANK, za diferenciacijo osteoklastov, pomembna njegova aktivna kompleksa z NF- κ B in AP-1. Natančnega mehanizma delovanja AP-1/TRX v osteoblastih, med procesom remodelacije kosti, pa do sedaj še niso uspeli v celoti razjasniti.

2. NAMEN DELA

Osteoporoza je sistemska bolezen skeleta, za katero sta značilni zmanjšana količina kostne mase in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva. Posledica je povečana krhkost kosti in pogostost zlomov. Osteoporoza postaja zaradi svojih zapletov v obliki osteoporotičnih zlomov, eden od osnovnih zdravstvenih problemov razvitih družb. K izgubi kostne mase v starosti prispeva tudi povečano nastajanje reaktivnih kisikovih snovi (ROS). Telo se zoper škodljivo delovanje ROS brani z antioksidativnimi mehanizmi, v katere sodi tudi tioredoksinski sistem. Tioredoksinski sistem sestavljajo protein tioredoksin (TRX) in družina encimov, tioredoksinskih reduktaz (TrxR). Kot nevtralizatorji ROS imajo pomembno vlogo v obrambi organizma proti oksidativnemu stresu. Polimorfizmi genov *TXNRD2* in *TRX* lahko močno vplivajo na učinkovitost zaščitnega delovanja tega sistema. To se lahko kaže v bolezenskih spremembah, kot je na primer osteoporoza.

V okviru diplomske naloge želimo ugotoviti vplive »vodilnih« ali »tag« polimorfizmov -795A>G in 12496C>T v genu za tioredoksin ter polimorfizem 196G>T (Ala66Ser) v genu za tioredoksinsko reduktazo D2, na mineralno kostno gostoto (MKG) ter s tem na razvoj osteoporoze. S statistično obdelavo podatkov bomo poskušali poiskati signifikantne povezave med omenjenimi genskimi polimorfizmi ter MKG in biokemičnimi označevalci kostne premene. V raziskavo bo vključenih 721 preiskovancev.

Študija bo obsegala:

- pomnoževanje definiranega odseka DNA, s predhodno optimizirano verižno reakcijo s polimerazo (PCR);
- genotipizacijo vzorcev pomnoženih z verižno reakcijo s polimerazo (alelna diskriminacija) v realnem času (q-PCR);
- genotipizacijo vzorcev, pomnoženih s PCR, z denaturacijsko tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (DHPLC);
- oceno vpliva polimorfizmov 12496C>T, -795A>G in 196G>T (Ala66Ser) na MKG ter biokemične označevalce kostne premene, s pomočjo izbranih statističnih metod.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Preiskovanci

V našo študijo smo vključili 721 preiskovancev, od tega 592 žensk in 115 moških. Razdelili smo jih v dve osnovni skupini glede na spol, znotraj teh pa v podskupine, kot je razvidno iz **Preglednice V**.

Preglednica V: Razdelitev preiskovancev v dve osnovni skupini in znotraj teh v ustrezne podskupine.

1. SKUPINA	• Celotna ženska populacija (592) • Zdrave preiskovanke (314) • Osteoporotične preiskovanke (266)
2. SKUPINA	• Celotna moška populacija (115)

3.2. Določitev vrednosti mineralne kostne gostote in biokemijskih kazalcev kostne remodelacije

Pri ugotavljanju povezave med MKG in polimorfizmi izbranih genov, smo uporabljali naslednje parametre: starost, leta mene, indeks telesne mase (ITM), MKG (kolka, ledvenih vretenc in vratu stegnenice), vrednosti-t, RANKL (aktivator receptorja NF- κ B), BALP (kostno alkalno fosfatazo), pOC (osteokalcin), sOPG (osteoprotegerin) in sCTX (karboksiterminalni prečno povezani telopeptid).

Meritve mineralne kostne gostote (MKG) (*ang. Bone Mineral Density - BMD*) so opravili na UKC Ljubljana, UKC Maribor in v SB Celje. S pomočjo metode DEXA (dvoenergijske rentgenske absorpciometrije) so preiskovancem izmerili MKG v treh različnih delih skeleta, in sicer na področju vratu stegnenice (*ang. BMD femoral neck - BMDfn*), kolka (*ang. BMD total spin - BMDtot*) ter ledvenih vretenc (*ang. BMD lumbar spine - BMDln*). MKG lahko izrazimo v obliki gramov na cm² ali kot vrednost-t. Slednja

je definirana kot število standardnih odklonov nad in pod povprečjem vrednosti MKG zdravih mladih odraslih oseb. Osteoporoza je definirana, kadar je t-vrednost $-2,5$ standardnih odklonov, medtem ko ima zdrav posameznik vrednost-t enako ali večjo od -1 .

Meritev koncentracije biokemičnih označevalcev smo izvedli v laboratoriju Klinike za nuklearno medicino, UKC Ljubljana. Vzorci so bili preiskovancem zaradi cirkadianega ritma merjenih parametrov odvzeti med 8. in 10. uro zjutraj. Koncentracije kostne alkalne fosfataze (BALP) smo določali z imunoradiometrično metodo, skladno z navodili proizvajalca (Tandem-R-ostase, Beckman Coulter). Koncentracije osteokalcina (OC) smo merili v plazmi, in sicer s kemiluminiscentno imunometrično metodo tako, kot to predpisuje proizvajalec (IMMULITE®-Osteocalcin, DMC, ZDA). Karboksi terminalni prečno povezani telopeptid (CTX) smo določali z elektrokemiluminiscentno (CLIA) metodo, skladno z navodili proizvajalca (Elcys β -cross Labi; Roche, Nemčija).

3.3. Opis vzorcev DNA

Preiskovancem so na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, UKC Ljubljana, v SB Celje in v Ambulanti za osteoporozo, Zdravilišča Dolenjske Toplice odvzeli vzorce periferne venske krvi, ki so jih shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz njih smo nato najkasneje po petih dneh osamili genomsko DNA. Postopek smo izvedli ročno, z metodo izsoljevanja po Millerju.

3.4. Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo PCR (*ang. Polymerase Chain Reaction*) je metoda in vitro, ki temelji na pomnoževanju nukleotidnih zaporedij s pomočjo kratkih začetnih nukleotidov. Ti se pripnejo na skrajna dela tarčnega zaporedja in delujejo kot substrat za termostabilni encim DNA-polimerazo, ki v prisotnosti dodanih deoksinukleotidov omogoča nastanek številnih kopij komplementarnih zaporedij. Za izvajanje reakcije PCR

uporabljamo ciklični termostat. Ta po naprej določenem programu spreminja temperaturo termalnega bloka, kamor vstavimo vzorce.

3.4.1. Priprava reakcijske zmesi

Na uspešnost izvedbe reakcije PCR lahko pomembno vplivamo. Previdni moramo biti predvsem pri pripravi vzorcev, saj ima lahko kakršna koli kontaminacija okolja, v katerem pripravljamo reakcijske zmesi oziroma prisotnost druge DNA, za posledico nastanek nespecifičnih produktov pomnoževanja. Da bi se kar najbolj izognili morebitnim zapletom smo vzorce pripravljali v ločenem prostoru, kjer sta bila vstop in gibanje omejena. V laboratoriju smo uporabljali čiste delovne halje in rokavice iz lateksa za enkratno uporabo (brez smukca). Pred začetkom priprave reakcijske zmesi smo vedno temeljito očistili delovno površino komore z 10 % etanolom in 6 % raztopino vodikovega peroksida. Šele nato smo v komoro prenesli vse potrebne pripomočke (predhodno avtoklavirane nastavke za pipete v škatlicah, epruvetke s pokrovčki v pokritih steklenih čašah in pipete), ki smo jih očistili s 3 % natrijevim hipokloritom. Nato smo notranjost komore izpostavili UV svetlobi za 30 minut. Medtem smo iz zmrzovalnika vzeli potrebne reagente, ki so bili shranjeni pri -20 °C, da so se pravočasno odtajali. Po končanem obsevanju delovne površine v komori smo vanjo prenesli reagente in predhodno pripravljene delovne raztopine vzorcev, pri čemer smo zunanost ovojnine predhodno očistili s 3 % natrijevim hipokloritom. V komori smo vse reagente in vzorce pred uporabo dobro premešali in centrifugirali. DNA polimerazo Taq smo vzeli iz zmrzovalnika šele tik pred uporabo in jo nato nemudoma vrnili nazaj v zmrzovalnik. Delovne raztopine vzorcev smo hranili v hladilniku pri 4 °C. Pripravili smo jih z redčenjem prečiščenih vzorcev DNA (shranjeni pri -20 °C), redčenih z vodo v razmerju 1:10.

Sestavo reakcijske zmesi smo najprej optimizirali in jo nato brez dodatka DNA pripravili kot je navedeno v **Preglednici VI**. Na zalogo smo jo pripravili v 3 do največ 50-kratni količini, jo dobro premešali in jo nato v volumnih po 19 µL odpipetirali v posamezne plastične epruvete s pokrovčki. V vsako epruveto smo nato dodali še po 1 µL vzorčne DNA. V vsako enajsto, ki je služila kot slepi vzorec, pa smo namesto vzorca DNA dodali 1 µL avtoklavirane ultračiste vode (negativna kontrola za reakcijo PCR).

Preglednica VI: Sestava optimizirane reakcijske zmesi za pomnoževanje odsekov DNA s PCR.

REAGENT	VOLUMEN (μL)
pufer 10x	2
raztopina MgCl ₂	1,2
dNTP (2mM)	2
istosmerni začetni oligonukleotid	2
obratnosmerni začetni oligonukleotid	2
Amli Taq Gold TM polimeraza DNA	0,1
avtoklavirana ultračista voda	9,7
vzorec DNA	1
Končni volumen zmesi	20

3.4.2. Pogoji reakcije PCR

V računalniku cikličnega termostata smo nastavili optimizirani temperaturni program, časovne intervale med posameznimi stopnjami in število ciklov pomnoževanja (**Preglednica VII**). Tik preden smo zaprte plastične epruvetke z reakcijsko zmesjo postavili v aparaturu, smo njihovo vsebino dobro premešali in centrifugirali. Tako smo zagotovili, da je bila reakcijska zmes homogena, in omogočili optimalen potek reakcije. Nato samo vklopili nastavljeni program (*COLONY.CYC*).

Preglednica VII: Optimizirani program za izvedbo reakcije PCR.

Stopnja reakcije	Temperatura	Časovni interval	35-krat
začetna denaturacija	95 °C	10 min	
ločitev verig DNA	95 °C	1 min	
prileganje začetnih oligonukleotidov	65 °C	30 s	
podaljševanje verige s polimerazo DNA	72 °C	30 s	
končno podaljševanje verige s polimerazo DNA	72 °C	8 min	
inkubacija	8 °C	∞	

3.4.3. Preverjanje uspešnosti reakcije PCR

Po končani reakciji PCR smo preverili uspešnost in specifičnost pomnoževanja z agarozno gelsko elektroforezo. Sočasno smo tudi preverili ali so v slepem vzorcu nastali morebitni produkti, kar bi kazalo na kontaminacijo pri delu. Agarozna gelska elektroforeza je standardna separacijska metoda, ki jo uporabljamo za ločevanje, prepoznavo ter čiščenje DNA oziroma njenih odsekov. Temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Negativno nabita DNA potuje proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Hitrost potovanja je odvisna od velikosti molekul DNA (manjši oz. krajši fragmenti DNA potujejo proti anodi hitreje kot večji), oblike DNA (krožna, sproščena, linearna), sestave elektroforeznega pufra, koncentracije agaroze in nanjo dodanih interkelirajočih barvil ter jakosti električnega polja.

Detekcijo pomnoženih produktov smo izvajali v 2 % agaroznem gelu (**Preglednica VIII**). Po natehtanju ustrezne količine agaroze v erlenmajerico smo vanjo dodali pufer TAE in si zapisali celotno maso. Nato smo erlenmajerico pokrili z urnim steklom ter jo 3-krat po 30 sekund segrevali v mikrovalovni pečici. Posodo smo ponovno stehtali in vanjo dodali ustrezno količino izparele destilirane vode. Pripravljeno raztopino smo dobro premešali in jo pustili ohlajati v digestoriju. Medtem smo pripravili nosilec za gel, ki smo ga vpeli v podstavek in ga zatesnili z obeh strani. V še toplo raztopino agaroze smo nato odpipetirali ustrezno količino etidijevega bromida ali barvila SYBR safeTM in zmes vlili v pripravljen nosilec, odstranili morebitne mehurčke ter gel zaščitili pred dnevno svetlobo.

Preglednica VIII: Detekcija produktov v 2 % agaroznem gelu.

Sestavina	Količina
agaroz	1,5 g
TAE pufer	75 ml
etidijev bromid/ SYBR safe TM	6 µL / 5 µL

Ko se je po približno 30 minutah gel strdil, smo ga prenesli v ustrezno elektroforezno kadičko in čezenj nalili pufer TAE. Produkte reakcije PCR smo pred nanosom v “žepke” gela na parafilmu pomešali z 2,5 µL nanašalnega pufra (glicerol in ksilencianol). Glicerol poveča gostoto vzorca in omogoča usedanje vzorcev v žepke. Ksilencianol pa vzorce

obarva modro, kar nam omogoča spremljanje hitrosti potovanja odsekov DNA proti anodi. V prvi "žepku" smo vedno nanesti 2 μL označevalca velikosti fragmentov, skupaj z nanašalnim pufrom, v preostale pa predhodo pripravljene mešanice naših vzorcev. Na vsakih 10 napolnjenih "žepkov" smo dodali slepi vzorec. Elektroforezo smo izvajali 25 minut pri 90 V, nato pa gel previdno odstranili iz kadičke in ga prenesli v komoro z digitalnim fotoaparatom in virom UV svetlobe. Posnete fotografije smo programske dokumentirali in na njih označili položaje lis.

3.4.4. Reagenti in oprema

3.4.4.1. Verižna reakcija s polimerazo

➤ *Reagenti:*

- 10x pufer PCR, Gold Buffer MgCl_2 , 25 mM, 1,5 mL (Applied Biosystem, Roche, ZDA); sestava: 150 mM Tris-HCl, 500 mM, pH = 8, pri T = 25 °C;
- 25 mM raztopina MgCl_2 (Applied Biosystem, Roche, ZDA);
- raztopina dNTP, 2 mM; sestava: po 10 μL vsake od raztopin dATP, dGTP, dCTP in dTTP, v koncentraciji 100 mM, z dodatkom 460 μL avtoklavirane ultračiste vode (Perkin Elmer);
- začetna oligonukleotida, redčenje 1:20 (proizvajalec Sigma Aldrich);
- polimeraza DNA AmpliTaq Gold™, 5 U/ μL (Applied Biosystem, Roche, ZDA);
- avtoklavirana ultračista voda (iz aparata ELGA, Purelab Classic);
- delovne raztopine vzorcev DNA, redčenih iz izolatov v razmerju 1:20, redčenih z vodo.

➤ *Aparature in pribor:*

- brezprašne rokavice Safeeskin PFE (Kimberly-Clark);
- sterilni nastavki za pipete brez filtra e.p.T.I.P.S., 10 μL in 200 μL (Sarstedt, Nemčija);
- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete (Sarstedt, Nemčija);

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

3.4.3.2. Agarozna gelska elektroforeza

➤ Reagenti:

- agaroz (Agarose for routine use, Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija));
- TAE pufer (Tris-acetat in EDTA), redčen z vodo, v razmerju 1:50;
- ultra čista voda (aparat Elga, Purelab Classic);
- etidijev bromid, 10 mg/mL (Sigma-Aldrich (GmbH, Steinheim, Nemčija));
- označevalec velikosti DNA; fragmenti velikosti 50, 150, 300, 500, 700, 1000 bp (PCR Markers G316A, Promega Corp. ZDA);
- nanašalni pufer (glicerol in ksilencianol modro).

➤ Aparature in pribor:

- oranžne rokavice (Orange Nitrile™ 260, SHIELDSkin™);
- erlenmajerica z ozkim vratom (250 mL);
- merilni valj (100 mL);
- plastična žlica;

- urno steklo;
- parafilm;
- prijemalka iz gume za vročo steklovino;
- elektronska tehtnica Exactan 300 EB (Tehtnica (Železniki, Slovenija));
- mikrovalovna pečica;
- centrifuga Centric 150 (Tehtnica, Železniki, Slovenija);
- polavtomatske pipete (2-20 μ L);
- avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija);
- kadička za elektroforezo (BIO-RAD[®] Wide);
- vir napetosti (BIO-RAD[®] Power Pac Basic, 300 V/400 mA/75 W);
- komora z UV svetilko ($\lambda = 302$ nm) in z digitalnim fotoaparatom za slikanje gelov (UVI Tec);
- računalnik s programom UVI Photo (verzija 99.01 za operacijski sistem Windows).

3.5. Denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

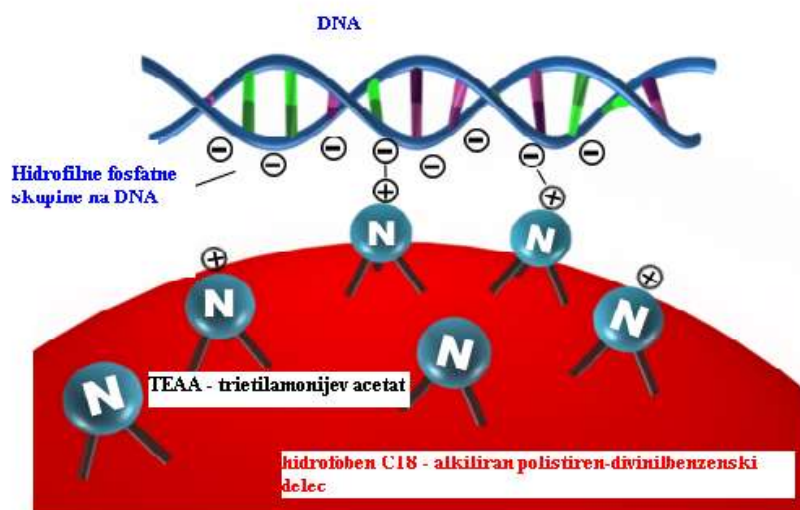
Denaturacijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (DHPLC) temelji na reverzno-fazni ionsko-izmenjevalni tekočinski kromatografiji. DHPLC so prvotno razvili za detekcijo posameznih nukleotidnih polimorfizmov SNP (*ang. Single nucleotide polymorphism*) in genskih mutacij. Pri tej metodi se za ustrezno ločevanje med različno velikimi fragmenti DNA izkorišča višja temperatura, in sicer najmanj 50 °C.

Sistem DHPLC je popolnoma avtomatiziran. Povezan je z računalnikom, na katerem je nameščen ustrezen program, npr. NavigatorTM Software, ki omogoča nastavitve pogojev oziroma poteka analize, spremljanje njenega napredovanja ter pregled in obdelavo rezultatov.

Princip ločbe temelji na interakcijah negativno nabitih fragmentov molekule DNA s stacionarno fazo, s katero je napolnjena kolona. Sestavljajo jo hidrofobni in elektrostatsko nevtralni C₁₈ polistirenski-divinilbenzenski delci. Mobilna faza je kombinacija pufrov za

eluiranje vzorcev DNA iz kolone (0,1M TEAA s 25 % acetonitrilom). Vezavo DNA omogoča pozitivno nabiti trietilamonijev acetat (TEAA). S svojimi pozitivno nabitimi amonijevimi skupinami se veže na DNA, s hidrofobnimi etilnimi skupinami pa na stacionarno fazo (**Slika 10**) (52, 53).

Interakcija med DNA in stacionarno fazo je tem močnejša, čim daljši je analizirani odsek DNA. Elucijo DNA pri optimalni temperaturi dosežemo s povečanjem koncentracije organskega topila. Kot smo že omenili je to največkrat acetonitril, ki prekine hidrofobne reakcije med stacionarno fazo in TEAA. Iz kolone izprani ostanki DNA nato potujejo skozi UV svetlobo (254 nm) in fluorescenčni detektor, ki meri absorbanco. Te informacije zazna ustrezna programska oprema in jih zapisuje v obliki kromatogramov.

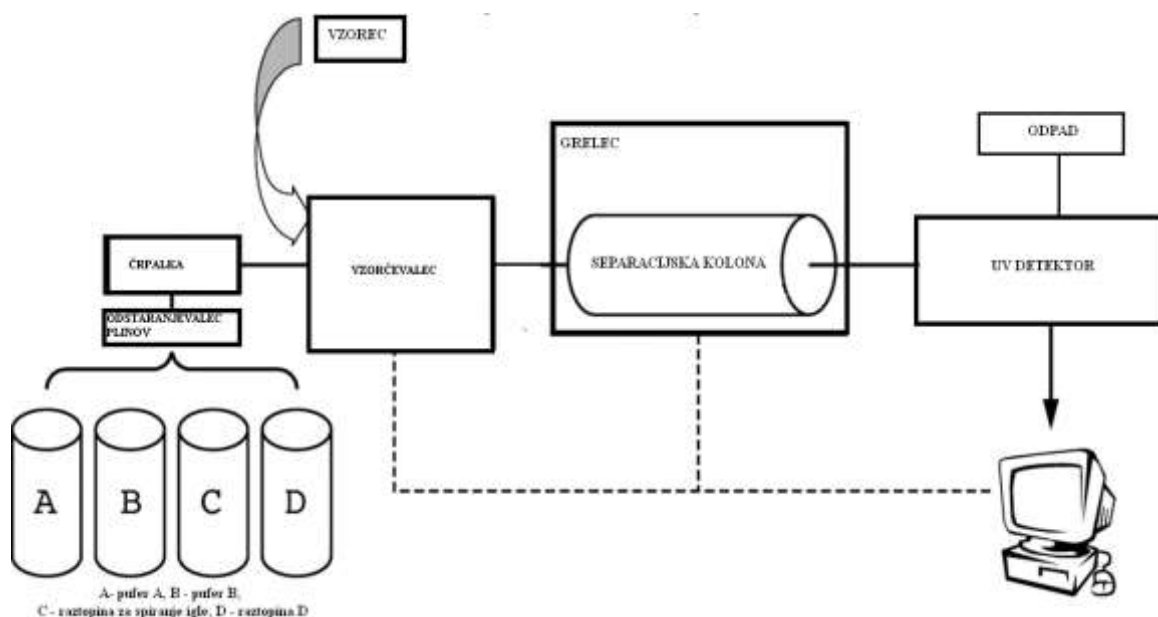


Slika 10: Princip delovanja metode DHPLC.

Nukleinske kisline lahko analiziramo pri različnih pogojih, ki se med seboj razlikujejo glede na uporabljene temperature:

- temperatura je 45 – 50 °C zagotavlja nendenaturacijske pogoje; ločevanje poteka na podlagi velikosti (fragmenti s krajšo dolžino se eluirajo prej, saj ima krajša DNA manjši neto negativni naboj in se posledično šibkeje veže na stacionarno fazo);
- temperatura od 50 – 75 °C omogoča vzpostavitev **delnih denaturacijskih pogojev**; ločitev poteka na podlagi velikosti in nukleotidne sekvence;
- temperatura od 75 – 80 °C pa omogoča nastanek popolnoma denaturacijskih pogojev; ločitev poteka na podlagi velikosti ali pa velikosti in sekvence.

Za genotipizacijo z reakcijo PCR pomnoženih produktov smo uporabili sistem WAVE[®] MD proizvajalca Transgenomic z delno denaturacijskimi pogoji pri temperaturi 63,2 °C.



Slika 11: Shematski prikaz aparature DHPLC sistema WAVE[®].

Uporabili smo tri različne pufre, ki smo jih označili z A, B in D ter raztopino C (**Preglednica IX**).

Preglednica IX: Sestava in vloga uporabljenih reagentov za izvedbo metode DHPLC.

IME	SESTAVA	VLOGA
Transgenomic Wave [®] pufer A	0,1M TEAA, pH = 7	vezava kolone
Transgenomic Wave [®] pufer B	75 % 0,1M TEAA + 25 % acetonitrila	elucija DNA iz kolone
Transgenomic Wave [®] pufer D	25 % vode + 75 % acetonitrila	spiranje kolone
Transgenomic Wave [®] raztopina C	96 % vode + 4 % acetonitrila	spiranje igle

3.5.1. Priprava vzorcev

Pred pripravo vzorcev na mikrotitrski ploščici smo izdelali preglednico, ki nam je bila v pomoč, da ne bi zamenjali precej številnih vzorcev in tudi pri vnašanju podatkov v računalniški program.

Vzorci smo za analizo pripravili v dveh stopnjah. Najprej smo v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbincami v 95 od njih vnesli po 12 μL pripravljenih pomnoženih vzorcev DNA, ki smo jih želeli analizirati, v preostalo pa 12 μL ultračiste H_2O (slepi vzorci). Dobro zatesnjeno ploščico smo nato vstavili v aparat za PCR, vzorce denaturirali 5 minut pri 95 °C in nato redenaturirali s postopnim ohlajanjem na 60 °C v 35-ih minutah (1 °C/minuto). Tako pripravljene vzorce smo pokrili z avtoklaviranim gumijastim pokrovom, jih centrifugirali, nato pa ploščico vstavili v nosilec za mikrotitrne ploščice v DHPLC aparaturi.

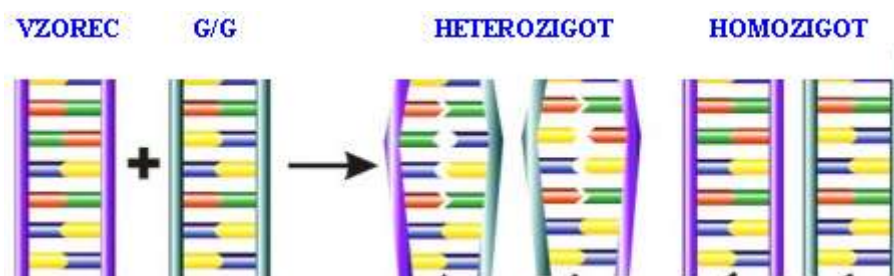
V drugi stopnji smo 6 μL vzorcev, ki smo jih analizirali kot homozigote na prvi stopnji, dodali po 6 μL vzorca DNA znanega homozigota. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili z avtoklaviranim gumijastim pokrovom in jo centrifugirali, ter ponovili opisani denaturacijski in redenaturacijski postopek.

Sekvenca za analizo z DHPLC: TXNRD2

GCCTGTTCTTGAGTCCTGAGCCAGCTCCCATGCTCACCTGCTGCTCTCCTTATCC
TTCCAGCCGCCAGCTGGGAAGGAAGGTG(G/A)CCGTGGTGGACTACGTGGAA
CCTTCTCCCAAGGTAGGCAGCACCTATGGGAGCCGGGTGTCCTGGGGAAGG
AGGTGGGAGGTGGGCCAGTTCCTGTACAGAGGGCAGCTGACACCAAAGTCCT
TCAGCCCTGCTGTCCATGGTTTCTGGACAGTGTCTCTGTTTCACTCATCATTACTT
TAAAGTTCTTGACCATTATCGAAAACAACCTCTGGCCAGGTGCAGTTGCTCACGC
CTGTACTC

Uporabljeni istosmerni začetnik: GCCTGTTCTTGAGTCCTGAGCCAG

Uporabljeni obratnosmerni začetnik: GAGTACAGGCGTGAGCAACTGC



Slika 12: Shema poteka analize z metodo DHPLC.

3.5.2. Potek analize DHPLC

Po optimizaciji delno denaturacijskih pogojev, potrebnih za genotipizacijo naših vzorcev, smo pripravljeno mikrotitrsko ploščico vstavili v nosilec aparata DHPLC. Nosilec je izdelan tako, da ves čas analize vzdržuje konstantno nizko temperaturo ($T = 2-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), s katero je onemogočeno izparevanje vzorcev, s tem pa zagotovljena optimalnost analize. Analizo začnemo z avtomatskim injiciranjem produkta reakcije PCR v kolono. Sledi vezava odsekov DNA na stacionarno fazo preko TEAA, temu pa gradientna elucija iz kolone ob zveznem spreminjanju razmerja med pufroma A in B. Po končani eluciji aparat avtomatsko poskrbi za čiščenje in ekvilibracijo kolone med analizo naslednjega vzorca. Volumen injiciranega vzorca je bil vedno $6\text{ }\mu\text{L}$. Podatki o poteku in času analize, ter deležih uporabljenih pufrov v posamezni stopnji, so zbrani v **Preglednici X**. Odseke DNA smo po eluciji iz kolone detektirali z UV detektorjem, pri valovni dolžini 254 nm , pri kateri molekule DNA absorbirajo UV svetlobo.

Preglednica X: Potek in trajanje analize, ter deleži uporabljenih pufrov na posamezni stopnji programa DHPLC.

STOPNJA ANALIZE	ČAS (min)	DELEŽ PUFRA A (%)	DELEŽ PUFRA B (%)
<i>Injiciranje</i>	0	51	49
<i>Začetek gradienta</i>	0,5	46	54
<i>Konec gradienta</i>	5	37	63
<i>Začetek čiščenja</i>	5,1	51	49
<i>Konec čiščenja</i>	5,6	51	49
<i>Začetek ekvilibracije</i>	5,7	51	49
<i>Konec ekvilibracije</i>	6,1	51	49

3.5.3. Reagenti in oprema

➤ *Reagenti:*

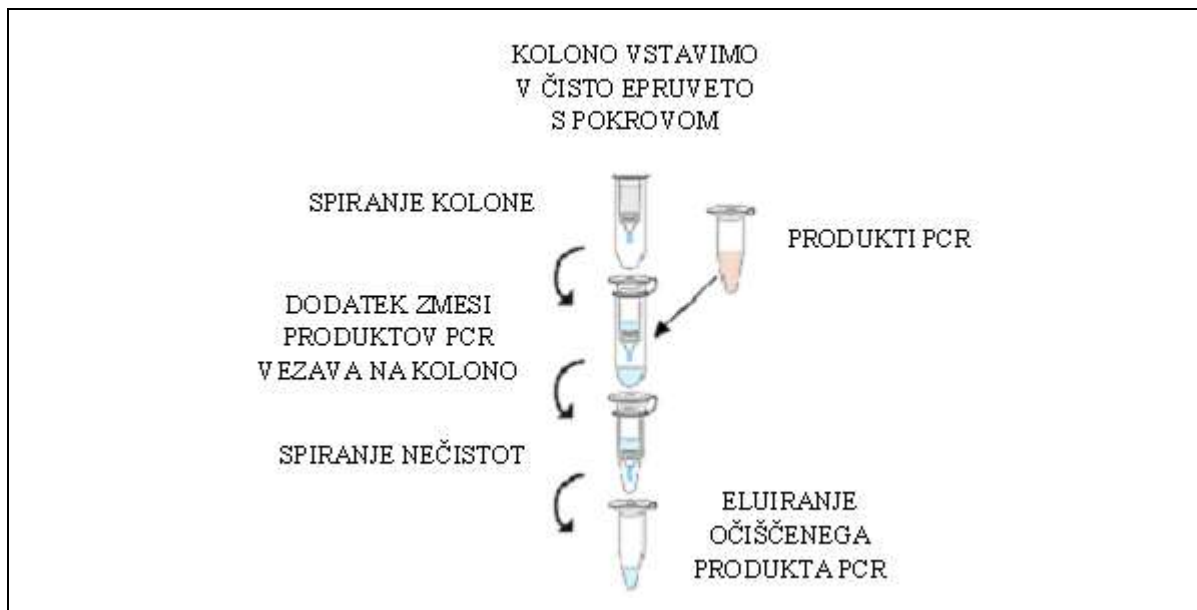
- Transgenomic Wave[®] **puffer A,**
- Transgenomic Wave[®] **puffer B,**
- Transgenomic Wave[®] **puffer D,**
- Transgenomic Wave[®] **raztopina C,**
- ustrezno pripravljene produkti PCR.

➤ *Aparature in pribor:*

- brezprašne rokavice PFE (Kimberly-Clark),
- škatlice z avtoklaviranimi nastavki za pipete (Sarstedt, Nemčija),
- avtoklav (Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija),
- polavtomatska pipeta (2-20 µL; Eppendorf, Nemčija),
- mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami, Micro Amp[®] optical 96 – Well Reaction Plate (AB Applied Biosystems),
- avtoklavirani gumijasti pokrovi za mikrotitrne ploščice,
- mikrocentrifuga (FVL-2400N Combi-Spin (Biosan Latvija)),
- mikrocentrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- ciklični termostat (MWG AG Biotech Primus 96^{Plus}, Nemčija),
- aparatura DHPLC: WAVE[®] MD System model 4000 Plus, s separacijsko kolono DNASep[®] in s programsko opremo Navigator[™] Software (Transgenomic Inc., Omaha, ZDA).

3.6. Sekvenčna analiza

Med izvajanjem praktičnega dela smo poslali vzorce tudi na sekvenčno analizo, saj smo za določevanje homozigotov z DHPLC potrebovali znane sekvence. Izbrali smo dva vzorca z genotipom G/G (vzorci št. 672 in 669) in dva z genotipom G/T (vzorci št. 678 in 680). Najprej smo jih pomnožili s pomočjo reakcije PCR. Končni volumen vsake od reakcijskih zmesi je znašal 50 µL. Uspešnost reakcije PCR smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu (*glej ustrezen protokol v **Poglavju 3.4.3.***). Nato smo vzorce očistili, da bi odstranili morebitne nečistote, kot npr. ostanke začetnih oligonukleotidov, dNTP, polimeraze DNA, genomske DNA in soli. S tem zagotovimo natančno določitev nukleotidnega zaporedja v preiskovanem vzorcu. Za čiščenje smo uporabili komercialno dostopni komplet SIGMA GenElute[™] PCR clean-up Kit, ki vsebuje kolono napolnjeno s silikagelom, epruveto s pokrovom in raztopine, ki jih uporabimo tekom različnih stopenj postopka (***Slika 13***).



Slika 13: Stopnje čiščenja produktov PCR.

Vsak očiščeni produkt PCR smo razdelili v dve epruveti s pokrovčkom, tako, da smo v vsako odpipetirali po 20 μL . V eno epruveto smo nato dodali 4 μL istosmernega, v drugo pa 4 μL obratnosmernega začetnega oligonukleotida.

Vzorci za sekvenčno analizo smo poslali v laboratorij v tujino, in sicer MWG Biotech (Ebserberg, Nemčija), ki za tovrstno analizo uporablja avtomatizirani postopek sekvenciranja po Sangerju. Ta omogoča zaznavanje fluorescentno označenih dideoksiribonukleozodnih trifosfatov (ddNTP) v ustreznem optičnem sistemu.

3.7. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (q-PCR)

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času oziroma kvantitativni PCR (qPCR) predstavlja nadgradnjo klasične reakcije PCR. Omogoča zanesljivo in enostavno detekcijo ter kvantitativno merjenje količine nastalega produkta v vsakem ciklu verižne reakcije, za razliko od klasične PCR, pri kateri lahko pomnoženo DNA kvantificiramo šele na koncu reakcije. Pomnoževanje in detekcija potekata torej sočasno in temeljita na merjenju fluorescence, ki jo lahko zagotovimo na dva načina, pri čemer lahko uporabimo specifični (1) ali nespecifični način detekcije (2):

1.) Uporabimo specifične oligonukleotidne sonde, označene s fluorescenčnimi barvili, te se specifično vežejo na tisti odsek DNA, ki ga želimo pomnožiti. Najpogosteje uporabljamo hidrolizirajoče sonde TaqMan[®] in hibridizacijske sonde (molekularna svetila, tehnologija FRET).

Sonda TaqMan[®] je določen oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezano reportersko barvilo, in sicer FAM[®] za alel 1 in VIC[®] za alel 2. Vsaka izmed sond se veže samo na eno varianto alela, ki je lahko nemutirana ali mutirana.

2.) Pri nespecifičnem načinu detekcije uporabljamo nespecifična fluorescenčna barvila, kot je npr. SYBRGreen[®]. Barvilo se veže v vsako novo nastalo dvojnovijačno DNA, in sicer neodvisno od nukleotidnega zaporedja, zato se z vsakim ciklom povečuje intenziteta zaznane fluorescence.

V reakcijsko zmes dodamo še sonde, označene s fluorescenčnim dušilcem. Končno sondo torej sestavlja oligonukleotid, na katerega sta vezana fluorescenčno barvilo in dušilec. Dokler sta ti dve molekuli na istem oligonukleotidu, dušilec onemogoča fluoresciranje barvila. Po razgradnji sonde pa se dušilec in barvilo ločita in barvilo po ekscitaciji z laserjem lahko fluorescira, kar zaznamo z detektorjem. V fazi prilaganja se na matrico DNA specifično vežejo tako začetni oligonukleotidi kot sonde. Na stopnji sinteze DNA pa polimeraza sintetizira verigo med obema začetnima oligonukleotidoma. Ko encim doseže sonde, jih s svojim 5' - 3' eksonukleaznim delom razgradi, s čimer loči barvilo od dušilca. Razdalja med njima se tako poveča, dušilec pa ne more več preprečiti fluorescence reporterskega barvila, zato pride do porasta fluorescence, ki jo detektiramo. Večja kot je koncentracija tarčne, sporočilne DNA v vzorcu, močnejši je fluorescenčni signal, ki ga zazna laser v realnem času (**Slika 14**).

Zaznani porast fluorescence nam pove, kateri alel je prisoten v vzorcu. Povečanje fluorescence za barvilo VIC[®] pomeni, da je oseba homozigot za alel 1, porast tiste za barvilo FAM[®] pa, da je preiskovanec homozigot za alel 2. V primeru pa, ko dobimo porast fluorescence za obe omenjeni barvili pa gre za heterozigotni genotip, v katerem sta prisotna oba alela. V naših analizah je bila valovna dolžina emitirane svetlobe barvila VIC[®] 535 do 580 nm in je označevala alelni polimorfizem rs 2776 (g124960) T in rs 2301241 (a_795g) G. Valovna dolžina emitirane svetlobe FAM[®] je bila 465 do 510 nm in je označevala polimorfizem alelov rs 2776 (g124960) C in rs 2301241 (a_795g) A. Na

osnovi jakosti zaznane fluorescence smo tako razbrali ali se je pomnožilo dovolj produkta, s pomočjo njene valovne dolžine pa smo genotipizirali naš vzorec (**Preglednica XI**).

	Polimerizacija: Prileganje začetnih oligonukleotidov, reporter in dušilec se vežeta na 5' in 3' konec sonde TaqMan®.
	Izgradnja verige
	Cepitev sonde TaqMan®: Fluorescenčni signal (reporter) se oddaljuje od lovilca signala.
	Zaključena polimerizacija: Sinteza produkta PCR se zaključi, reporter se odcepi od dušilca. Pri tem se jakost fluorescenčnega signala v vsakem ciklu poveča.

Slika 14: Shematski prikaz poteka kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času.

Preglednica XI: Genotipizacija vzorcev z merjenjem valovne dolžine emitirane fluorescenčne svetlobe reporterskih barvil.

POLIMORFIZEM	GENOTIP	BARVA	valovna dolžina svetlobe
rs2776 (g124960)	C/C	zelena (VIC®)	535 – 580 nm
	T/T	modra (FAM®)	465 – 510 nm
	C/T	rdeča	535 – 580 nm in 465 – 510 nm
	neopredeljeno	roza	
	pomanjkanje produkta	siva	
rs2301241 (a_795g)	A/A	zelena (VIC®)	535 – 580 nm

	G/G	<i>modra (FAM[®])</i>	465 – 510 nm
	A/G	<i>rdeča</i>	535 – 580 nm in 465 – 510 nm
	<i>neopredeljeno</i>	<i>roza</i>	
	<i>pomanjkanje produkta</i>	<i>siva</i>	

3.7.1. Pomnoževanje odsekov DNA

Za uspešnost genotipizacije oziroma alelne diskriminacije moramo uspešno pomnoževati specifična zaporedja DNA, saj bi v nasprotnem primeru lahko prišlo do razpada sonde in neustreznega emitiranja reporterske fluorescence. Zaporedje DNA pomnožujemo s pomočjo naprave LightCycler[®], v kateri lahko izvedemo verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (*ang. Real- Time PCR*).

3.7.2. Priprava reakcijske zmesi

Tako kot pri pripravi reakcijske zmesi za klasično reakcijo PCR (**Poglavje 3.4.1**), smo tudi v tem primeru upoštevali vse predpise za zagotavljanje čistosti pri uporabi reagentov in opreme. Uporabili smo predpisane reagente, in sicer TaqMan[®] Genotyping MasterMix in destilirano vodo. Sondi in vodo smo vedno shranjevali v zmrzovalniku pri -20 °C, medtem ko smo MasterMix hranili kar v hladilniku pri 2-8 °C.

Sestava TaqMan[®] genotyping MasterMIX:

- AmpliTaq Gold[®] polimeraza DNA, ultračista;
- pufer z optimizirano sestavo;
- deoksiribonukleotid trifosfati (dNTP);
- ROX pasivna referenca, ki služi kot interna referenca za normalizacijo reporterskega signala med analizo.

Podatki za sonde:

- Za polimorfizem rs2776 (ID sonde: C__3194436_10 ; dbSNP ID rs2776):

Okvir sekvence ([VIC]/[FAM]):

ATTTATTTTGAAAGCTATTCAGACA[C/T]GAGACGGTTTTAAAAAGTGTTAGCA

- Za polimorfizem rs2301241 (ID sonde C__15756075_10 ; dbSNP ID rs2301241)

Okvir sekvence ([VIC]/[FAM]):

GACCCTGGAAAGGTCCTGACCTCCT[A/G]AAGTCTCAGTGTTTCCTTCTGTAGA

3.7.3. Priprava vzorcev

V posebno namensko komoro smo po končanem predhodnem obsevanju delovne površine z UV svetlobo, prenesli pripravljene reagente in naše vzorce DNA, pri čemer smo njihovo ovojnino najprej očistili s 3 % natrijevim hipokloritom. Pred začetkom dela smo vzorce in reagent najprej dobro premešali in centrifugirali, s čimer smo zagotovili homogenost in prisotnost vzorca na dnu epruvete. Pred nanosom vzorcev na mikrotitrsko ploščico smo si pripravili preglednico za identifikacijo vzorcev v vsaki posamezni vdolbinci. Reakcijsko zmes smo pripravili po predpisu navedenem v **Preglednici XII**, in sicer v posebnih mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbincami. V vsako od njih smo odpipetirali po 5,52 µL reakcijske zmesi, k tej pa še po 5 µL vzorca DNA. Vsaka mikrotitrsko ploščica je vsebovala tudi dva slepa vzorca, ki nista vsebovala DNA, pač pa po 5 µL vode. Nato smo z neprodušno samolepilno folijo dobro prekrili pripravljeno ploščico in jo tako zaščitili pred morebitno kontaminacijo v času prenosa do naprave za izvedbo q-PCR ter tudi kasneje med samim potekom reakcije.

Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za analizo s q-PCR.

REAGENT	VOLUMEN (μL)
TaqMan [®] Genotyping MasterMix	5,26
40x sonda	0,26
vzorec DNA (4,21 ng/ μL) ali voda za slepi vzorec	5
Končni volumen zmesi	10,52

3.7.4. Potek reakcije

Dobro zaščiteno mikrotitrsko ploščico z vzorci smo najprej centrifugirali, nato pa jo previdno prenesli v aparaturo za q-PCR. Pri tem in pri vstavljanju v aparat smo morali biti zelo previdni in zaščiteni z rokavicami brez smukca. Za pomnoževanje vzorčne DNA smo uporabili temperaturni program, ki ga priporoča proizvajalec reagentov (**Preglednica XIII**).

Preglednica XIII: Temperaturni program za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

ZAČETNI KORAK		DENATURACIJA		Prileganje in izgradnja komplementarne verige DNA	
čas	temperatura	čas	temperatura	čas	temperatura
10 min	95 °C	15 s	92 °C	1 min	60 °C
Število ciklov: 40					

3.7.5. Reagenti in oprema

➤ Reagenti:

- sonda, 40x SNP Genotyping assay,
- TaqMan[®] Genotyping MasterMix (AB Applied Biosystems),

- avtoklavirana ultračista voda (iz aparata ELGA, Purelab Classic),
- delovne raztopine vzorcev DNA redčene iz izolatov v razmerju 1:20.

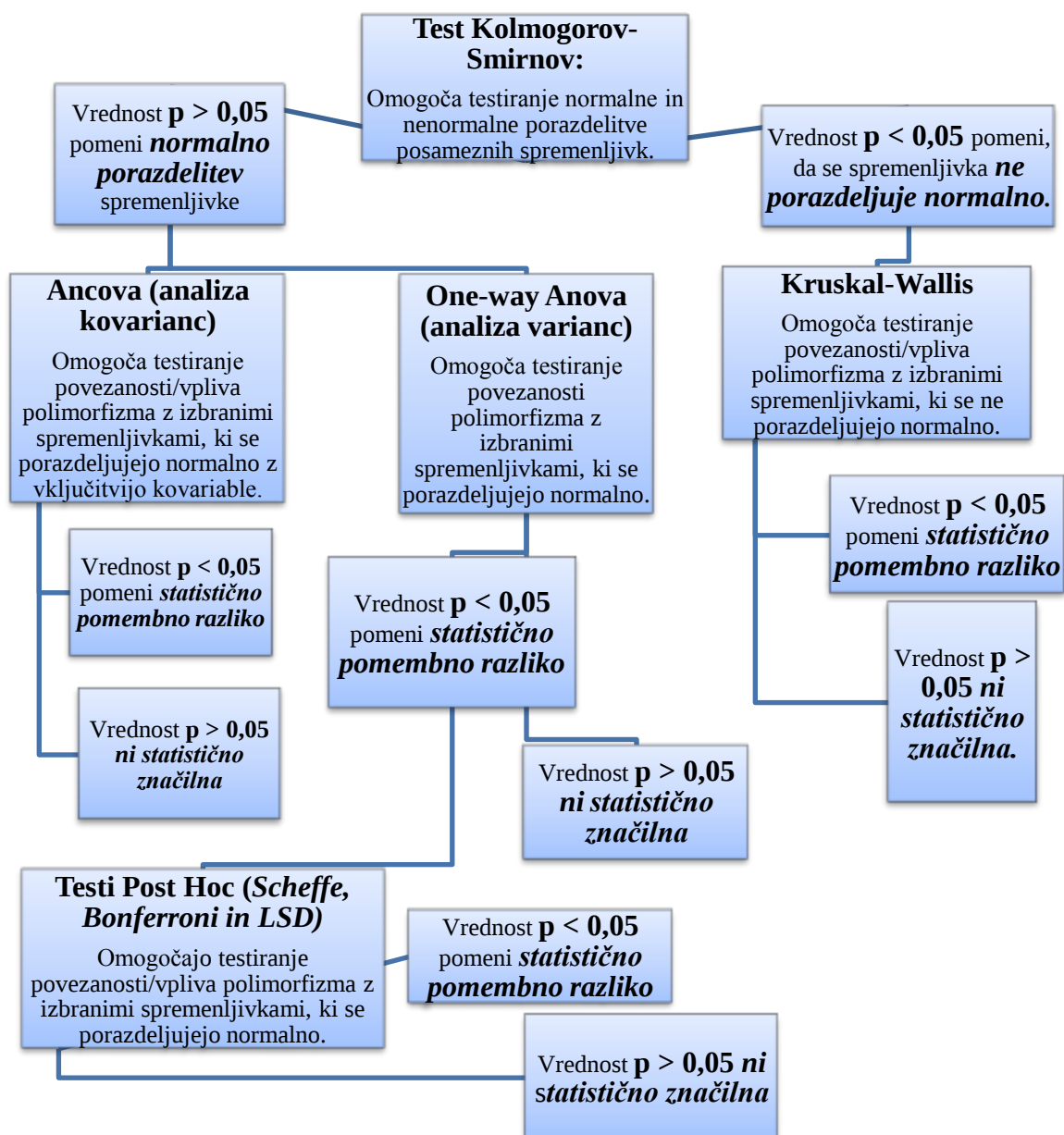
➤ *Aparature in pribor:*

- brezprašne rokavice PFE (Kimberly-Clark),
- sterilni nastavki za pipete brez filtra e.p.T.I.P.S., 10 µL in 200 µL (Sarstedt, Nemčija),
- škatlice za avtoklavirane nastavke za pipete (Sarstadt, Nemčija),
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 0,5 in 1,5 mL (Sarstedt, Nemčija),
- avtoklav (Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija),
- delovna komora za PCR (Biosan DNK/RNA UV-Cleaner (UVC/T-M-AR, Latvija)),
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 µL; 2-20 µL; 20-200 µL (Eppendorf, Nemčija),
- mikrocetrifuga 322A tehtnica (Tehtnica, Železniki),
- mikrocetrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- mikrotitrne ploščice s kapaciteto za 96 vzorcev, Micro Amp[®] optical 96 – Will Reaction Plate (AB Applied Biosystems),
- neprodušna samolepilna folija za prekrivanje ploščic, Optical Adhesive Film (MICRO AmpTM),
- Real-Time PCR naprava LightCycler[®] 480 II (Roche).

3.8. Statistične metode

Za statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo uporabljali program SPSS 17.0 for Windows, proizvajalca SPSS inc., ZDA.

Za analizo smo uporabljali teste, skladno z naslednjim algoritmom:



4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Tioredoksinska reduktaza

Genotipizacijo tioredoksinske reduktaze smo izvedli z metodo DHPLC. Produkate, ki smo jih analizirali smo predhodno pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo.

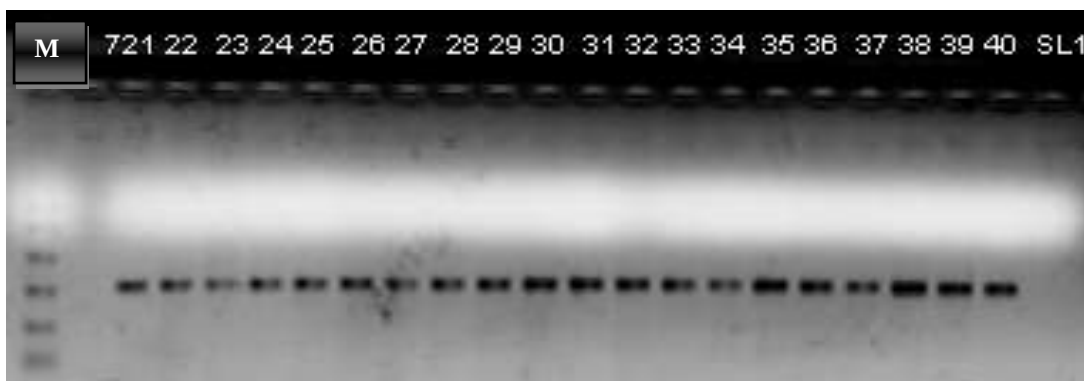
4.1.1. Optimizacija pogojev verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Na potek reakcije PCR pomembno vplivajo številni dejavniki. Optimalne pogoje smo določili eksperimentalno, ob upoštevanju dolžine tarčnih odsekov DNA, vsebnosti gvaninov in citozinov v njih ter T_m začetnih oligonukleotidov.

- *Istosmerni začetni oligonukleotid:*
5'GCCTGTTCTTGAGTCCTGAGCCAG3', dolžine 24 bp, s T_m 70,1 °C, ki vsebuje 58,3 % gvanina/citozina (G/C).
- *Obratnosmerni začetni oligonukleotid:*
3'GAGTACAGGCGTGAGCAACTGC5', dolžine 22 bp, s T_m 69,2 °C, ki vsebuje 59,1 % G/C.

Najprej smo izvedli reakcijo PCR s tremi različnimi koncentracijami $MgCl_2$ (1, 2 in 3 mM). Ugotovili smo, da je najustreznejša koncentracija 1,5 mM. V naslednjem koraku smo določili optimalne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov. Te so običajno 5 °C pod T_m začetnih oligonukleotidov. Preizkušali smo temperaturni interval med 64 in 69 °C in ugotovili, da je najustreznejša temperatura 65 °C. Spreminjali smo tudi število ciklov, in sicer med 35 in 40. Na podlagi rezultatov smo se nato odločili za 35 ciklov. Optimizirane pogoje smo nato uporabili pri vseh 721 preiskovanih vzorcih.

Uspešnost vsake reakcije PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (90 V, 25 minut, **Slika 15**).

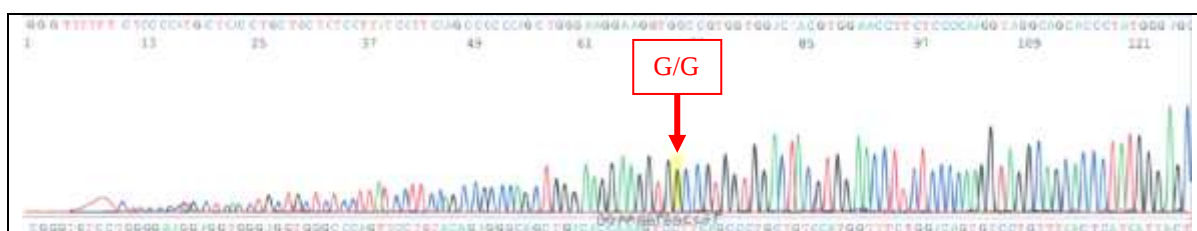


Slika 15: Detekcija produktov PCR na agroznom gelu.

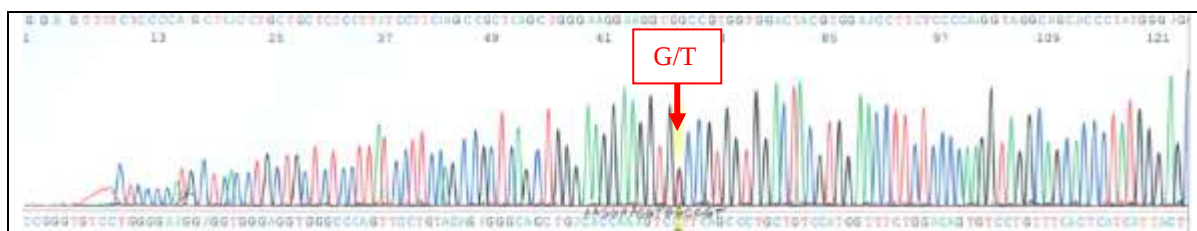
4.1.2. Optimizacija pogojev analize z metodo DHPLC in sekvenčna analiza

Glede na naše produkte PCR smo izbrali delno denaturacijske pogoje za analizo polimorfizma Ala66Ser v genu za *TXNRD2*. Najprej smo optimizirali temperaturo, ki zagotavlja takšne pogoje. Preizkusili smo interval med 62 °C in 64 °C. Ker se pri 62 °C kromatografski vrhovi homozigota ali heterozigota niso videli, pri T 64 °C pa so bili preširoki, smo se odločili za približno sredino, to je 63,2 °C.

Zaradi potrditve za pravilne analize podatkov, dobljenih z metodo DHPLC, smo 4 izbrane vzorce PCR poslali na sekvenciranje v tujino (MWG Biotech, Ebserberg, Nemčija). S postopkom sekvenciranja po Sangerju so določili zaporedja nukleotidov v izbranem odseku DNA pri vzorcih 672 (genotip G/G), 669 (genotip G/G), 678 (genotip G/T) in 680 (genotip G/T) (**Sliki 16 in 17**).

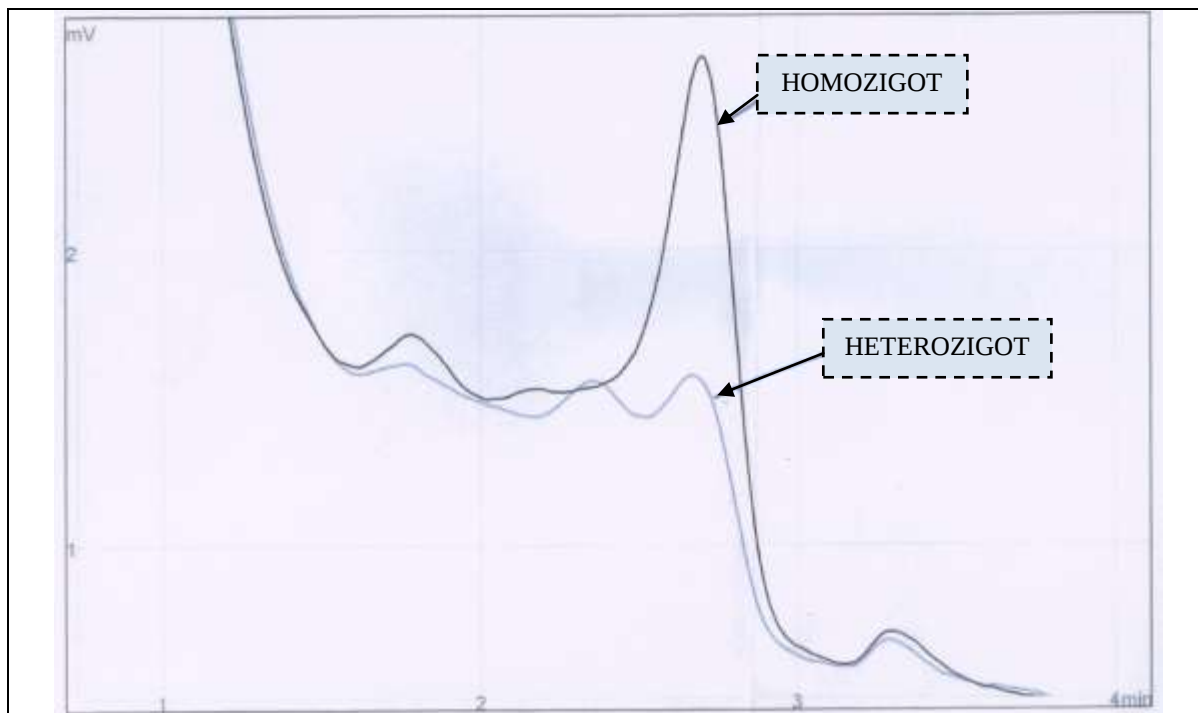


Slika 16: Rezultat sekvenciranja vzorca 672 z istosmernima začetnima oligonukleotidoma (genotip G/G).



Slika 17: Rezultat sekvenciranja vzorca 680 z istosmernima začetnima oligonukleotidoma (genotip G/T).

Sekvenciranje je potrdilo rezultate analiz, ki smo jih opravili z metodo DHPLC. Vzorca 672 in 669 sta bila potrjena kot homozigota G/G, vzorca 678 in 680 pa kot heterozigota G/T. Omenjene vzorce smo nato pri analiziranju ostalih rezultatov uporabili kot referenčne. Njihove kromatografske vrhove smo tako uporabili za določanje genotipov vseh preostalih vzorcev (*Slika 18*).



Slika 18: Referenčni kromatografski vrhovi, ki so nam pomagali pri določanju genotipa posameznega preiskovanega vzorca.

4.1.3. Ugotavljanje vpliva polimorfizma Ala66Ser v genu za TXNRD2 na mineralno kostno gostoto in koncentracijo biokemičnih označevalcev kostne premene

Študije, v okviru katerih so proučevali pojav osteoporoze zaradi odziva na oksidativni stres, so nam bili v pomoč pri interpretaciji dobljenih rezultatov. Vseh mehanizmov nastanka osteoporoze zaradi delovanja ROS še niso znani. Kot smo omenili že v uvodu, se telo pred delovanjem ROS brani z antioksidativnimi sistemi, med katere sodi tudi tioredoksinski, ki smo ga preiskovali. Za zmanjšanje njegove aktivnosti bi lahko bil odgovoren tudi polimorfizem, ki smo ga proučevali s postopkom DHPLC. Želeli smo ugotoviti ali obstaja kakšna povezava med polimorfizmom Ala66Ser in vrednostmi MKG ter biokemičnih označevalcev kostne premene. Zato smo z metodo DHPLC 721 osebam

določili genotip ustreznih odsekov DNA. Vsem preiskovancem so predhodno izmerili MKG vratu stegenice (BMDfn), ledvenega vretenca (BMDls) in MKG celotnega kolka (BMDtot). Pri skoraj vseh preiskovanih osebah so bili poleg spola in starosti, zbrani tudi podatki o: ITM, t-vrednosti in koncentracijah biokemičnih označevalcev kostne premene - RANKL, ALP, sBALP, sOPG, pOC in CTX. Poleg naštetih spremenljivk so pri ženskah določili še čas nastopa menopavze ter časovno obdobje njenega trajanja.

Dobljene rezultate smo ustrezno analizirali s pomočjo statističnega programa SPSS 17.0. V diplomski nalogi smo se osredotočili predvsem na primerjavo med spoloma, zato smo preiskovance razdelili v dve skupini. Skupino 592 žensk smo v nadaljevanju grupirali še na zdrave ($N = 314$) in tiste z diagnosticirano osteoporozo ($N = 266$). Moške populacije pa zaradi majhnega števila vzorcev ($N = 115$) nismo delili v podskupine.

Najprej smo s pomočjo testa Kolmogorov-Smirnov ugotavljali ali se določena spremenljivka porazdeljuje, normalno ali nenormalno. Pri tem smo postavili ničelno hipotezo, ki se glasi: vse spremenljivke se porazdeljujejo normalno ($p > 0,05$). Vrednost testa pri $p > 0,05$ dejansko pomeni normalno porazdeljevanje spremenljivke, tista s $p < 0,05$ pa nasprotno, torej nenormalno. Vse spremenljivke, pri katerih je bila vrednost $p < 0,05$ smo naravno logaritmirali in s temi vrednostmi ponovno izvedli test Kolmogorov-Smirnov. V kolikor smo tudi v tem primeru, dobili vrednost $p < 0,05$ smo smatrali, da se takšne spremenljivke ne porazdeljujejo normalno, in s tem zavrgli ničelno hipotezo. Z njimi smo izvedli še test Kruskal-Wallis. Gre za neparametričen test, ki predpostavlja, da vrednost $p < 0,05$ predstavlja statistično pomembno razliko med proučevanimi polimorfizmi, medtem ko za vrednost $p > 0,05$ velja, da razlika ni statistično značilna. Za spremenljivke z vrednostmi $p > 0,05$ v testu Kolmogorov-Smirnov, ki so se porazdeljevale normalno, pa smo uporabili parametrične teste: ANOVA, Post Hoc teste - Scheffe, LSD in Bonferroni ter ANCOVA. Test ANOVA v ničelni hipotezi predpostavlja, da so povprečne vrednosti dane spremenljivke značilno različne med primerjanimi genotipskimi podskupinami ($p < 0,05$). V kolikor ničelno hipotezo sprejmemo, lahko potem trdimo, da je preiskovani genotip povezan z vrednostjo spremenljivke oziroma, da vpliva na njeno vrednost. V primerih, ko po izvedbi testa ANOVA nismo mogli sprejeti ničelne hipoteze, ker smo pri tem dobili vrednosti $p > 0,05$, smo za takšne spremenljivke izvedli teste Post Hoc, in sicer: Scheffe, LSD in Bonferroni. Tri različne teste smo izbrali zato, ker pri testiranju spremenljivk

upoštevajo različne kriterije. Omenjeni testi delujejo podobno kot ANOVA, s to razliko, da ugotavljajo povezanost le dveh genotipov in ne vseh, tako kot ANOVA z izbrano spremenljivko. V primerih, ko niti s testom ANOVA niti s testi Post Hoc nismo mogli dokazati statistično značilnosti ($p < 0,05$), smo sklepali, da preučevana spremenljivka in genotip nista povezana, zato smo ovrgli ničelno hipotezo. Poleg vseh navedenih smo izvajali tudi test ANCOVA. Gre za test, ki je enak kot ANOVA, le da z njim lahko ovrednotimo še izbor kovarianc. Izbrali smo dva parametra, za katera so v dosedaj opravljenih študijah že dokazali statistično značilne vplive na MKG. Za kovarianci smo tako upoštevali starost in indeks telesne mase (ITM). V kolikor smo lahko potrdili ničelno hipotezo ($p < 0,05$) glede povezanosti starosti in ITM z vrednostjo MKG in preiskovanim genotipom, je to pomenilo, da lahko izključimo vplive obeh kovarianc na vrednost spremenljivke (MKG). Takšna ugotovitev poveča statistično moč testa, saj v tem primeru na vrednost spremenljivke očitno vpliva izključno genotip.

4.1.4. Genotipska frekvenca polimorfizma Ala66Ser v genu za TXNRD2

Preiskovanim skupinam smo najprej določili frekvenco genotipov v okviru polimorfizma, ki smo ga določali (**Preglednica XIV**). Nato smo preverili ali se genotipi v obravnavani populaciji preiskovancev porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinbergovim (H-W) ravnotežjem. Pogoji za Hardy-Weinbergovo pravilo so:

- populacija je velika in parjenje je naključno,
- v populaciji ni mutacij,
- populacija je izolirana, ni migracije in ne emigracije, torej ni pretoka genov in
- v populaciji ni naravne selekcije.

V realnosti pa zelo težko najdemo primer populacije, za katero bi v celoti veljala omenjena pravila. Zato H-W pravilo uporabljamo le kot model za študij frekvenc posameznih alelov znotraj določene populacije. Zakon tako pravi, da se v velikih populacijah pri naključnem razmnoževanju osebkov z enakimi sposobnostmi razmerja genov ohranjajo. To pomeni, da frekvence alelov in genotipov v populaciji ostajajo konstantne, torej v ravnotežju. H-W ravnotežje izračunamo s formulo: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. V preiskovanem polimorfizmu Ala66Ser smo na ta način dobili rezultat $p = 0,0788$, s čimer smo potrdili, da se genotipi porazdeljujejo v skladu s H-W ravnotežjem.

Preglednica XIV: Frekvence genotipov polimorfizma Ala66Ser v genu za TXNRD2 znotraj preiskovanih skupin, v primerjavi z različnimi narodi in rasami.

Preiskovane skupine	TXNRD2			Preiskovane skupine	TXNRD2		
	GG	GT	TT		GG	GT	TT
Moški	50 %	41 %	9 %	Slovenci	56 %	34 %	10 %
Ženske	57 %	33 %	10 %	Evropejci	45 %	44 %	11 %
Zdrave ženske	57 %	35 %	8 %	Afro-Američani	39 %	52 %	9 %
Ženske z osteoporozo	56 %	32 %	12 %	Podsaharski afričani	62 %	34 %	4 %
				Azijci	2 %	26 %	72 %

4.1.5. Statistična obravnava rezultatov analize polimorfizma Ala66Ser

S statistično analizo smo obravnavali 4 skupine, in sicer celotno žensko populacijo, znotraj te pa posebej zdrave preiskovanke in preiskovanke s potrjeno osteoporozo ter celotno moško populacijo. Statistično analizo smo izvajali skladno z algoritmom, predstavljenim v **poglavju 3.8**.

4.1.5.1. Preiskovanje in polimorfizem Ala66Ser

Obravnavali smo 592 preiskovank, z metodo DHPLC pa smo uspeli določiti genotip pri 443 od njih.

Preglednica XV: Frekvence polimorfizma Ala66Ser(G>T) v celotni ženski populaciji.

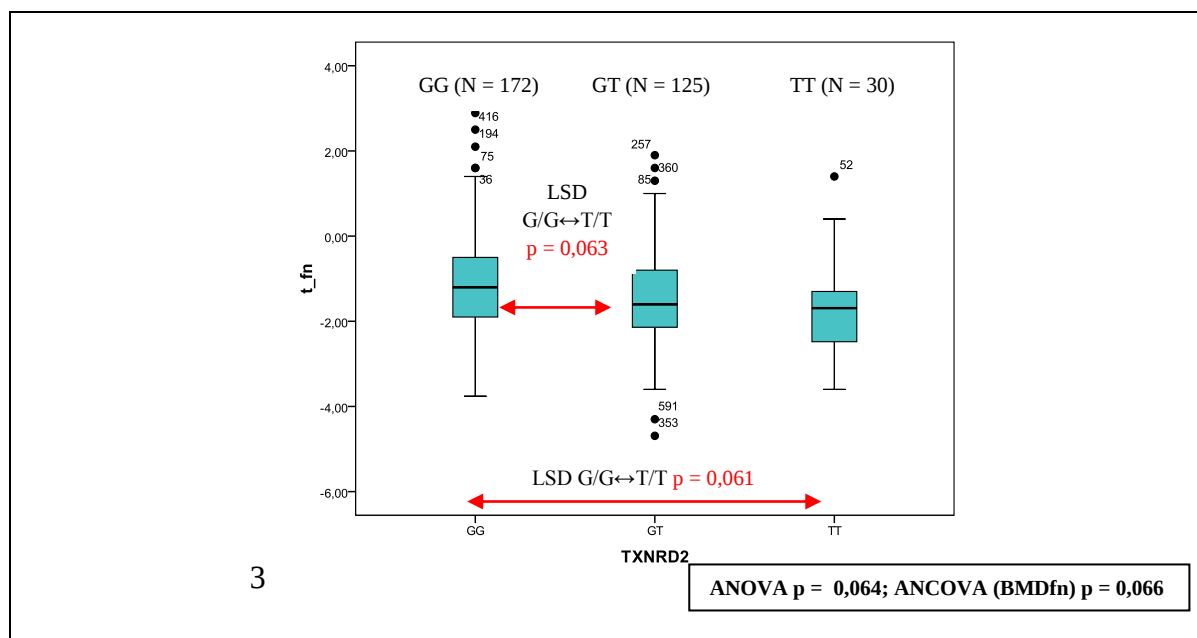
Polimorfizem	Genotip	Frekvence (št.)	Odstotek (%)
TXNRD2: Ala66Ser(G>T)	GG	251	57
	GT	148	33
	TT	44	10
	Skupno	443	100,0

S testom ANOVA smo dokazali statistično (mejno) pomembne razlike za spremenljivke: starost ($p = 0,018$), t_{fn} ($p = 0,064$), t_{tot} ($p = 0,047$) in t_{ls} ($p = 0,099$). S testi Post Hoc pa smo nato še potrdili ugotovljene statistično pomembne razlike med posameznimi genotipskimi podskupinami (**Preglednica XVI**).

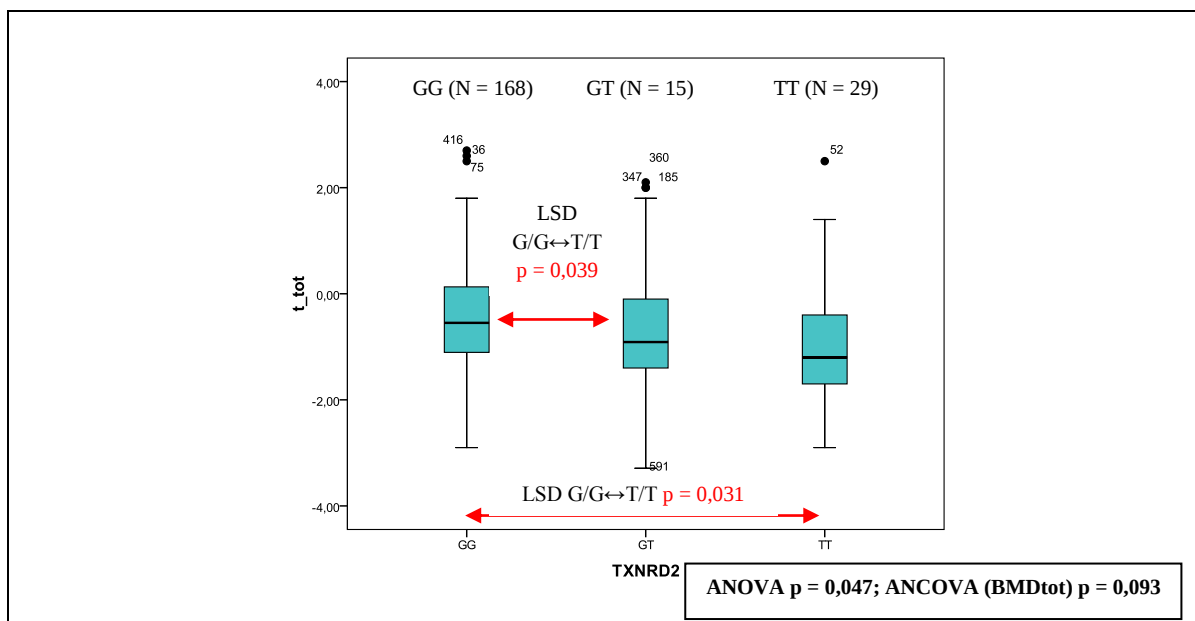
Preglednica XVI: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk polimorfizma Ala66Ser(G>T) s testi Post Hoc v ženski populaciji.

Spremenljivka	Test Post Hoc	Genotipi	Signifikanca
Starost	SCHEFFE	GG – GT	p = 0,020
	LSD	GG – GT	p = 0,005
	BONFERRONI	GG – GT	p = 0,015
t _{fn}	LSD	GG – GT	p = 0,065
		GG – TT	p = 0,062
t _{tot}	LSD	GG – GT	p = 0,041
		GG – TT	p = 0,063
t _{ls}	LSD	GG – GT	p = 0,055

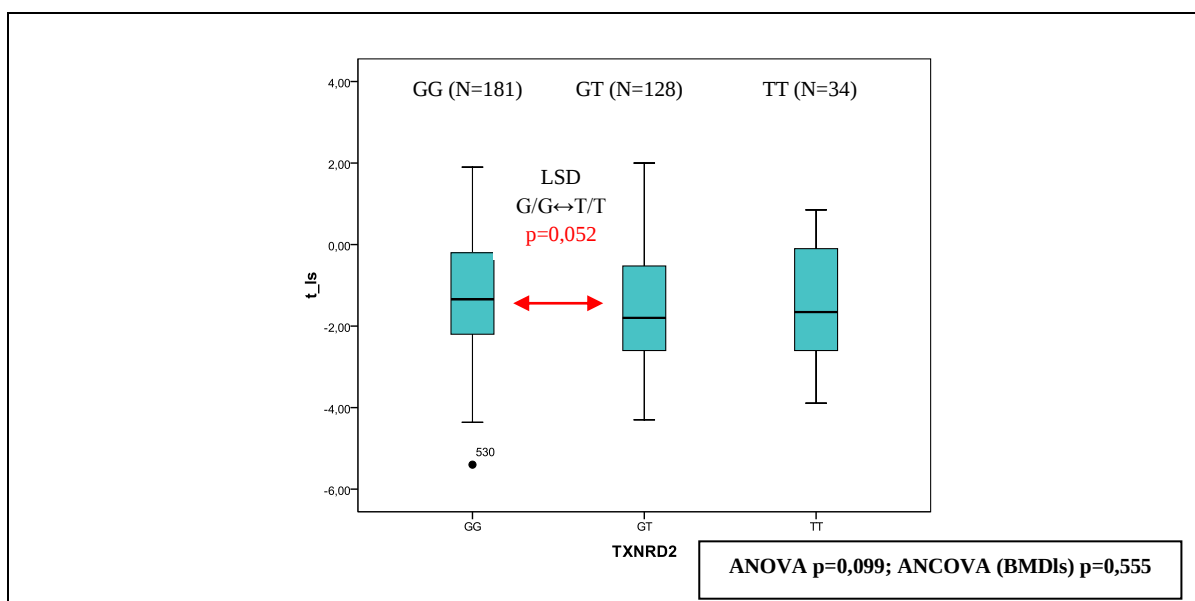
T vrednosti vratu stegenice (t_{fn}, **Graf 1**), celotnega kolka (t_{tot}, **Graf 2**) in ledvenih vretenc (t_{ls}, **Graf 3**) so bile v povprečju višje pri preiskovankah z genotipom G/G v primerjavi s tistimi z genotipom T/T. Zato lahko trdimo, da omenjeni polimorfizem vpliva na znižanje t-vrednosti. Ker pa so znižane t-vrednosti značilne za osteoporozo, bi lahko sklepali, da omenjeni polimorfizem vpliva na povečano tveganje za njen pojav.



Graf 1: Povprečne t-vrednosti (srednja vrednost ± SD) vratu stegenice (t_{fn}) glede na polimorfizme v genu TXNRD2 pri preiskovankah – test ANOVA (G/G - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, G/T - heterozigot).



Graf 2: Povprečne t -vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) celotnega kolka (t_{tot}) glede na polimorfizme v genu *TXNRD2* pri preiskovankah – test ANOVA (G/G - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, G/T - heterozigot).



Graf 3: Povprečne t -vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) ledvenih vretenc (t_{ls}) glede na polimorfizme v genu *TXNRD2* pri preiskovankah - test ANOVA (G/G - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, G/T - heterozigot).

S testom Kruskal-Wallis smo dokazali statistično pomembno razliko pri spremenljivki “leta mene” ($p = 0,043$). S testom ANCOVA pa smo izključili vplive starosti in ITM, tako na BMDfn ($p = 0,066$) kot na BMDtot ($p = 0,093$). Tako smo še dodatno potrdili moč vpliva preiskovanega genotipa na omenjeni spremenljivki.

4.1.5.2. Zdrave preiskovanke in polimorfizem Ala66Ser

Skupno smo obravnavali 314 zdravih preiskovank. Z metodo DHPLC pa smo uspeli določiti genotip pri 229 od njih.

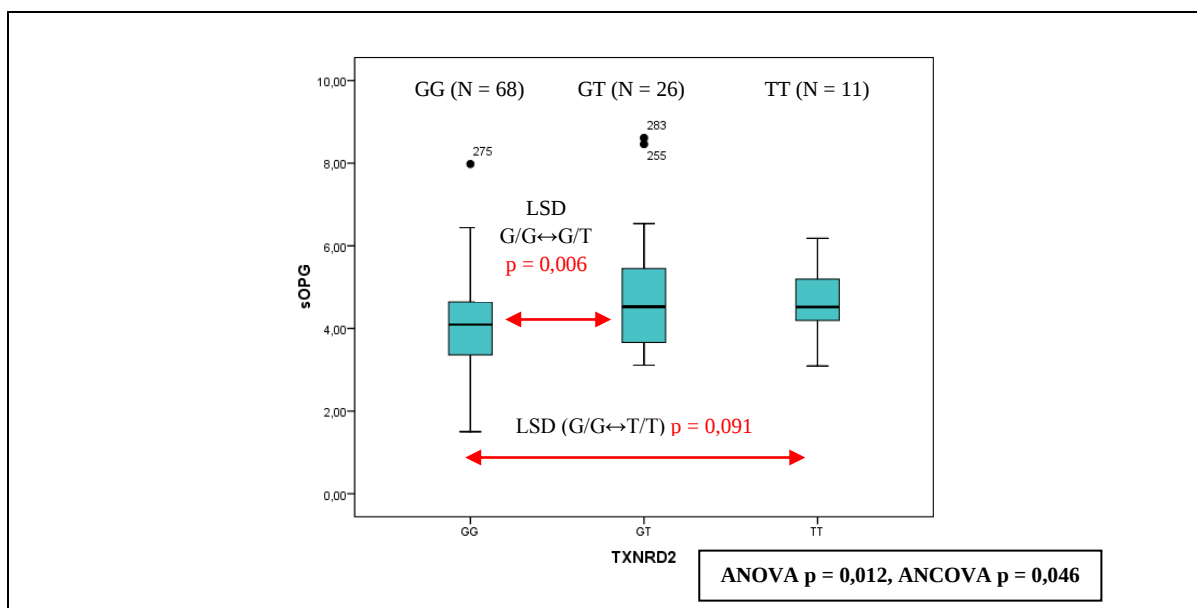
Preglednica XVII: Frekvence v skupini zdravih preiskovank pri polimorfizmu Ala66Ser(G>T).

Polimorfizem	Genotip	Frekvence (št.)	Odstotek (%)
TXNRD2: Ala66Ser(G>T)	GG	130	57
	GT	81	35
	TT	18	8
	Skupno	229	100

S testom ANOVA smo razkrili statistično pomembne vplive dveh spremenljivk, starosti ($p = 0,022$) in sOPG ($p = 0,012$). Povprečne vrednosti sOPG so bile pri preiskovankah z genotipom T/T (mutiran homozigot) višje, v primerjavi s tistimi z genotipom G/G (**Graf 4**). To kaže na povečano osteoklastno aktivnost in večjo možnost za nastanek osteoporoze. Izvedli smo tudi teste Post Hoc, s katerimi smo dokazali statistično pomembne vplive starosti in OPG med posameznimi genotipskimi podskupinami (**Preglednica XVIII**).

Preglednica XVIII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v polimorfizmu Ala66Ser(G>T)s testi Post Hoc v skupini zdravih preiskovank.

Spremenljivka	Test Post Hoc	Genotip	Signifikanca
Starost	SCHEFFE	GG - GT	p = 0,023
	LSD	GG - GT	p = 0,006
	BONFERRONI	GG - GT	p = 0,018
sOPG	SCHEFFE	GG - GT	p = 0,023
	LSD	GG - GT	p = 0,006
		GG - TT	p = 0,091
	BONFERRONI	GG - GT	p = 0,018



Graf 4: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) sOPG glede na polimorfizme v genu TXNRD2, pri zdravih preiskovankah - test ANOVA (G/G - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, G/T - heterozigot).

Na osnovi analize, testom ANCOVA, smo lahko izključili vplive starosti in ITM na vrednosti sOPG ($p = 0,046$). S tem smo še dodatno potrdili moč vpliva genotipa na omenjeni biokemični označevalec. S testom Kruskal-Wallis pa nismo zaznali nobenih pomembno značilnih razlik.

4.1.5.3. Preiskovanje s potrjeno osteoporozo in polimorfizem Ala66Ser

Preglednica XIX: Alelne frekvence polimorfizma Ala66Ser(G>T) v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.

Polimorfizem	Genotip	Frekvence (št.)	Odstotek (%)
TXNRD2: Ala66Ser(G>T)	GG	115	56
	GT	66	32
	TT	24	12
	Skupno	205	100

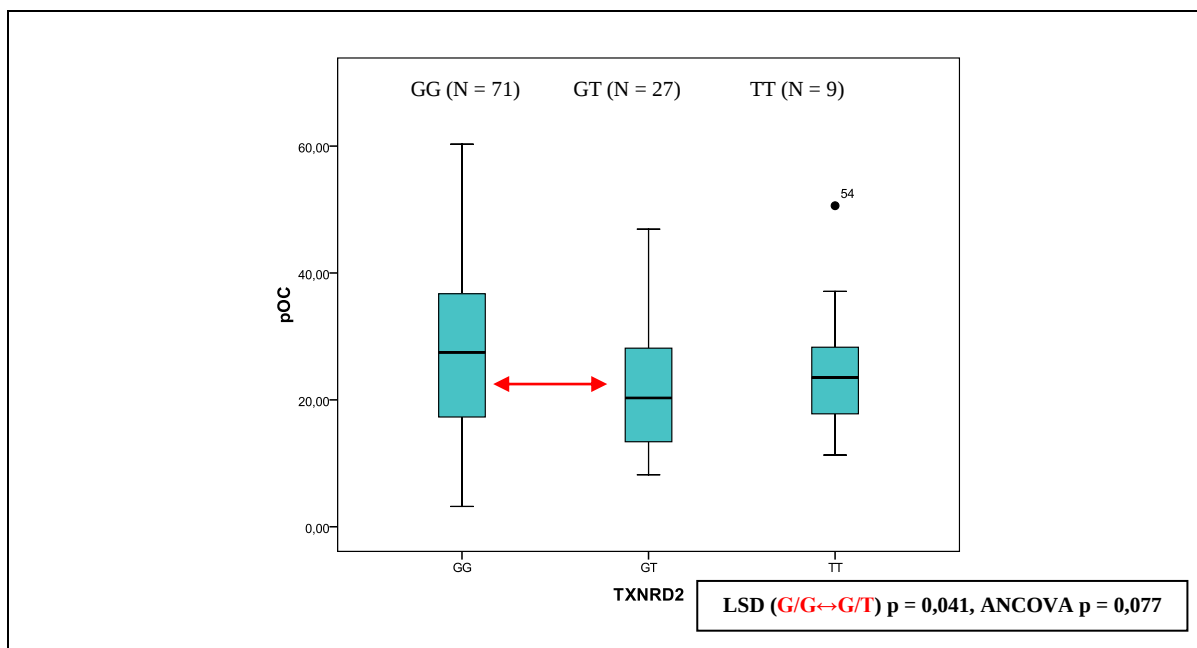
Izvedli smo test ANOVA in ugotovili mejni statistično značilni vpliv spremenljivke "leta mene" ($p = 0,054$). S testi Post Hoc smo nato potrdili značilne razlike tako v povprečnih vrednostih let mene kot v povprečnih vrednostih koncentracije pOC med genotipoma G/G

in G/T (**Preglednica XX**). Statistično značilno višje vrednosti koncentracije biokemičnega označevalca pOC smo ugotovili pri genotipu G/G (**Graf 5**).

Preglednica XX: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v polimorfizmu A66S(G>T) s testi Post Hoc, v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.

Spremenljivka	Test Post Hoc	Genotip	Signifikanca
Leta mene	SCHEFFE	GG – GT	p = 0,062
	LSD	GG – GT	p = 0,019
	BONFERRONI	GG – GT	p = 0,057
pOC	LSD	GG – GT	p = 0,041

Tudi s testom ANCOVA smo zaznali mejno statistično značilno razliko v primeru biokemičnega označevalca pOC (p = 0,077) ter izključili vplive starosti in ITM. Tako smo potrdili moč vpliva genotipa na preiskovano spremenljivko. S testom Kruskal-Wallis nismo ugotovili statistično pomembnih značilnosti.



Graf 5: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) pOC glede na polimorfizme v genu TXNRD2, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo - test LSD Post Hoc (G/G - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, G/T - heterozigot).

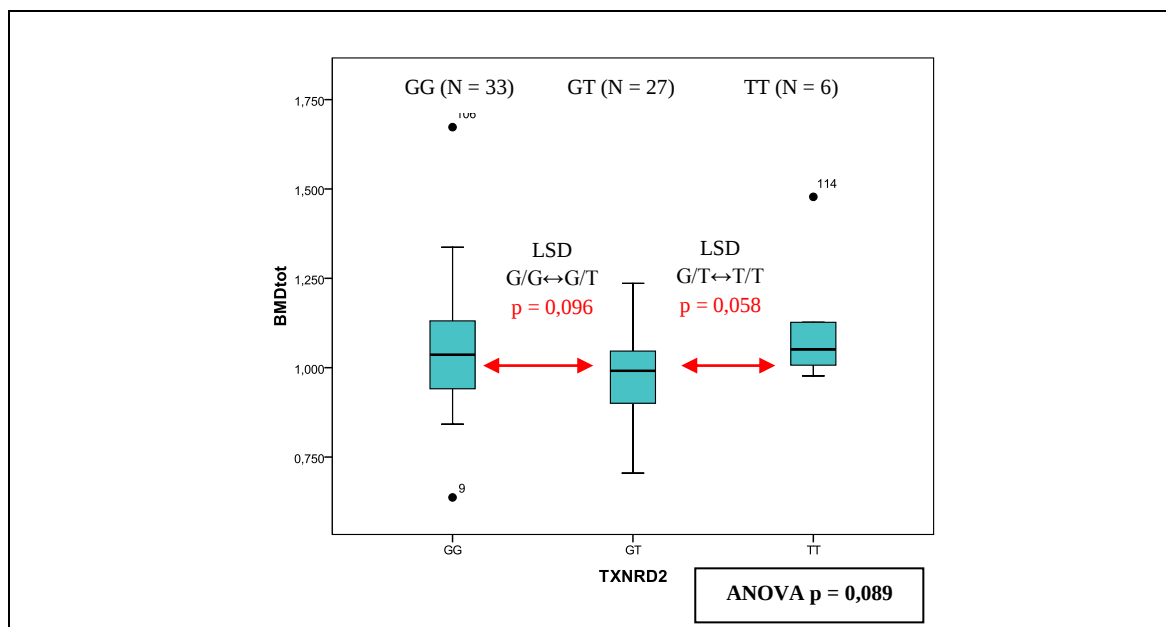
4.1.5.4. Moški preiskovanci in polimorfizem Ala66Ser

Obravnavali smo 115 moških preiskovancev, z metodo DHPLC pa smo uspeli določiti genotip pri 76 od njih.

Preglednica XXI: Alelne frekvence polimorfizma Ala66Ser(G>T) v skupini moških preiskovancev.

Polimorfizem	Genotip	Frekvence (št.)	Odstotek (%)
TXNRD2: Ala66Ser (G>T)	GG	38	50
	GT	31	41
	TT	7	9
	Skupno	76	100

S testom Anova smo zaznali mejen statistično pomemben vpliv spremenljivke MKG celotnega kolka BMD_tot ($p = 0,089$). Test LSD Post Hoc je pokazal statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih BMDtot med genotipoma T/T in G/T ($p = 0,058$) ter mejno statistično pomembno razliko med genotipoma G/G in G/T ($p = 0,096$). Lahko sicer trdimo, da je vrednost spremenljivke t_tot odvisna od genotipa, vendar pa so bile povprečne vrednosti v primeru alela T/T višje kot pri G/G. To pa najverjetneje pomeni, da je prav določen polimorfizem prednostno povezan z višjimi vrednostmi MKG (**Graf 6**). Žal je bil preiskovani vzorec premajhen, da bi lahko delali kakršnekoli zanesljive zaključke. S testomoma ANCOVA in Kruskal-Wallis pa nismo ugotovili statistično pomembnih razlik.



Graf 6: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMD_tot glede na polimorfizme v genu TXNRD2, pri moških preiskovancih - ANOVA test (G/G - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, G/T - heterozigot).

Zaradi majhnega števila moških preiskovancev bi bilo potrebno v nadaljnjih študijah povečati vzorec in nato še enkrat proučiti vpliv polimorfizma Ala66Ser na vrednosti MKG in koncentracije biokemičnih označevalcev kostne premene.

4.1.6. Ocena morebitnih kliničnih vplivov polimorfizma Ala66Ser v genu za tioredoksinsko reduktazo 2

Na osnovi statistične obdelave podatkov smo torej lahko razbrali ali je polimorfizem Ala66Ser v genu za TXNRD2 povezan z značilnimi razlikami med izbranimi spremenljivkami. Ugotovili smo naslednje:

- V celokupni ženski populaciji smo dokazali statistično značilne vplive polimorfizma na spremenljivke: t_fn, t_tot, t_ls, leta mene, BMDfn in BMDtot. Ugotovili smo, da alel T polimorfizma Ala66Ser vpliva na znižanje t-vrednosti, in sicer: t_fn, t_tot in t_ls (**Graf 1, 2 in 3**). Pri spremenljivkah MKG vratu stegenice in MKG celotnega kolka pa smo s testom ANCOVA izključili vplive starosti in ITM, kar kaže na dejanski vpliv genotipa na omenjeni spremenljivki.
- V podskupini zdravih preiskovank smo ugotovili, da imata spremenljivki starost in sOPG statistično značilno različne in višje vrednosti v primeru genotipa T/T. Ker je OPG pokazatelj povečane osteoklastne aktivnosti, lahko trdimo, da proučevani polimorfizem na genu *TXNRD2* vpliva na povišane vrednosti omenjenega biokemičnega označevalca, ki lahko nakazuje možnost pojava osteoporoze. S testom ANCOVA smo izključili vplive starosti in ITM na spremenljivko sOPG, ter s tem dodatno dokazali pomen vpliva genotipa na izmerjene vrednosti sOPG.
- V podskupini preiskovank s potrjeno osteoporozo smo opazili statistično značilno razliko le pri spremenljivki "leta mene". Kljub temu, da s testom ANOVA nismo ugotovili statistično značilnih razlik za biokemične označevalce, pa je test ANCOVA pokazal statistično značilno razliko za vrednosti pOC. Starosti in ITM torej ne vplivata na vrednosti pOC, pač pa le genotip preiskovanega polimorfizma.
- Pri moških preiskovancih smo ugotovili statistično značilno razliko le pri spremenljivki BMDtot. Njene povprečne vrednosti so bile višje v primeru genotipa

T/T (mutiran homozigot), zato bi lahko sklepali, da alel T polimorfizma Ala66Ser pri moških prednostno vpliva na vrednosti mineralne kostne gosote. Žal pa je bil preiskovani vzorec premajhen, da bi to lahko trdili z ustrezno gotovostjo.

4.2. Tioreodoksin

4.2.1. Optimizacija pogojev verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)

Vsi proizvajalci opreme in reagentov priporočajo postopke za izvajanje reakcije, s katerimi jamčijo najboljše rezultate. Večkrat pa moramo takšen postopek prilagoditi eksperimentalnim pogojem. V našem primeru smo tako povečali število ciklov pomnoževanja DNA s predpisanih 40 na 50 in s tem izboljšali specifično pomnoževanje DNA.

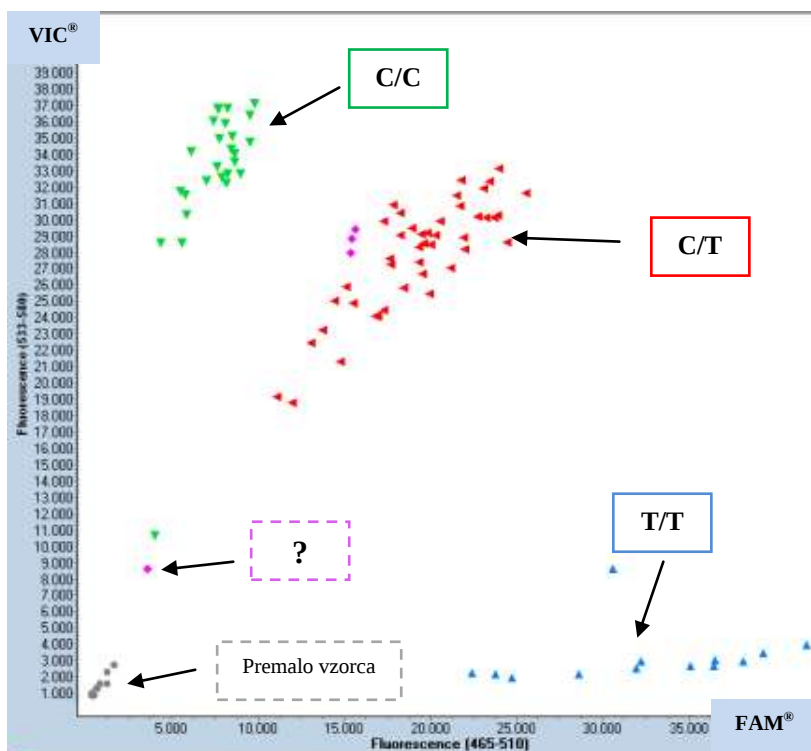
Preglednica XXII: Optimizirani pogoji verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).

Začetni korak		Denaturacija		Prileganje in izgradnja komplementarne DNA verige	
Čas	Temperatura	Čas	Temperatura	Čas	Temperatura
10 min	95 °C	15 s	92 °C	1 min	60 °C
Število ciklov = 50					

4.2.2. Analiza rezultatov genotipizacije

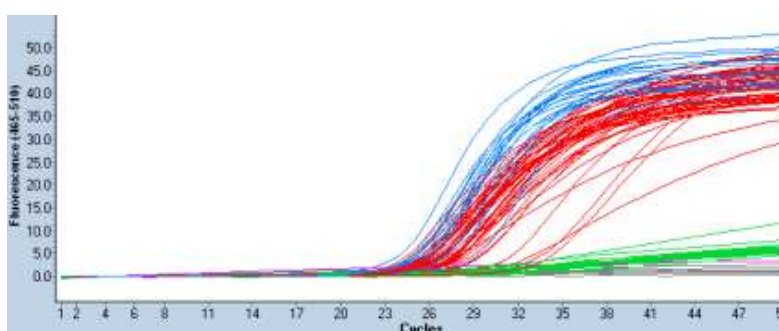
Po izvedbi q-PCR smo najprej analizirali vse dobljene genotipe, in sicer tako kot je prikaz na **Sliki 19**. Na abscisi je prikazana fluorescenca barvila FAM[®]. V tem delu grafa so razporejeni vzorci z genotipom T/T (modro obarvani trikotniki) polimorfizma rs2776. Na ordinati pa je prikazana intenziteta fluorescence barvila VIC[®]/Hex/Yellow in v tem delu grafa so razporejene meritve vzorcev z genotipom C/C (zeleno obarvani trikotniki). Rdeči

trikotniki predstavljajo heterozigote z genotipom C/T, roza obarvane kare neopredeljene genotipe in sive točke tiste vzorce, v katerih je bilo premalo pomnoženega odseka DNA.



Slika 19: Razporeditve genotipov po skupkih za TXNa (alelna diskriminacija 12496C>T).

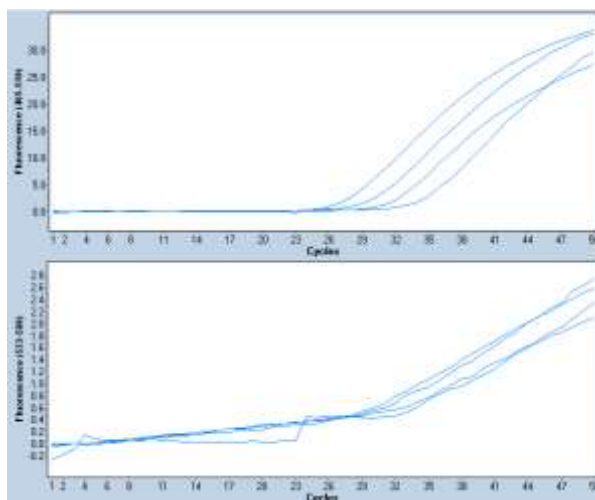
V nadaljevanju smo pregledali krivulje specifičnega pomnoževanja (**Slika 20**). Na ta način lahko razberemo v katerem ciklu so se produkti začeli pomnoževati in kolikšno jakost fluorescence so dosegli oziroma koliko pomnoženih kopij je nastalo tekom reakcije.



Slika 20: Primer krivulj pomnoževanja.

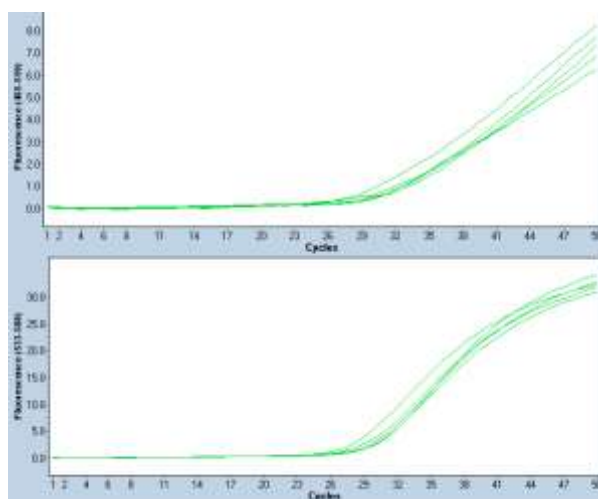
Kljub temu, da računalniški program aparature za q-PCR že sam določi rezultate genotipov (barvna interpretacija), smo vsak vzorec posebej še enkrat na krivulji preverili tudi sami (**Slike 21, 22 in 23**). Tako smo lahko opredelili tudi tiste vzorce, ki jih je program

prepoznal kot neopredeljene (roza barve). Vzorce, ki jim nismo mogli opredeliti genotipa, pa smo ponovno pripravili in analizirali. Slike 21, 22 in 23 prikazujejo primere krivulj na katerih lahko vidimo naraščanje ali padanje fluorescence za barvili FAM[®] (zgornji graf) in VIC[®] (spodnji graf). **Slika 21** prikazuje strmo naraščanje krivulje, ki pripada fluorescenci za barvilo FAM[®], kar opredeljuje prisotnost alela T. Spodnja krivulja pa narašča le malenkostno, kar potrjuje odsotnost alela C. Na osnovi obeh grafov lahko sklepamo, da je v vzorcu prisoten genotip T/T.



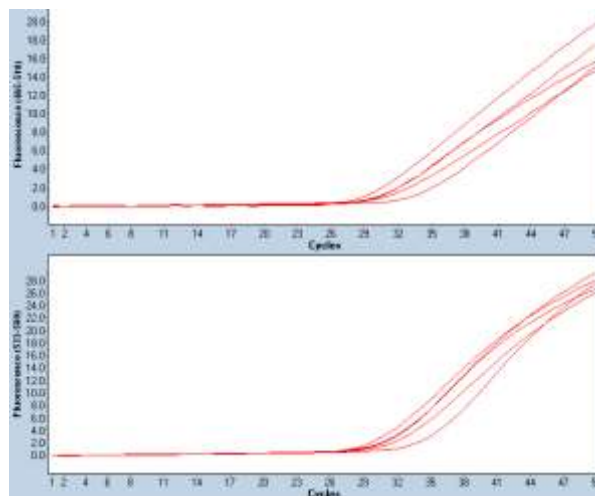
Slika 21: Krivulji, ki dokazujeta prisotnost alela T.

Na **Sliki 22** pa vidimo večje naraščanje krivulje na spodnjem grafu, kar pomeni prisotnost alela C. Krivulja v zgornjem grafu narašča v skromnem obsegu in potrjuje odsotnost alela T. V preiskovanem vzorcu je torej prisoten genotip C/C.



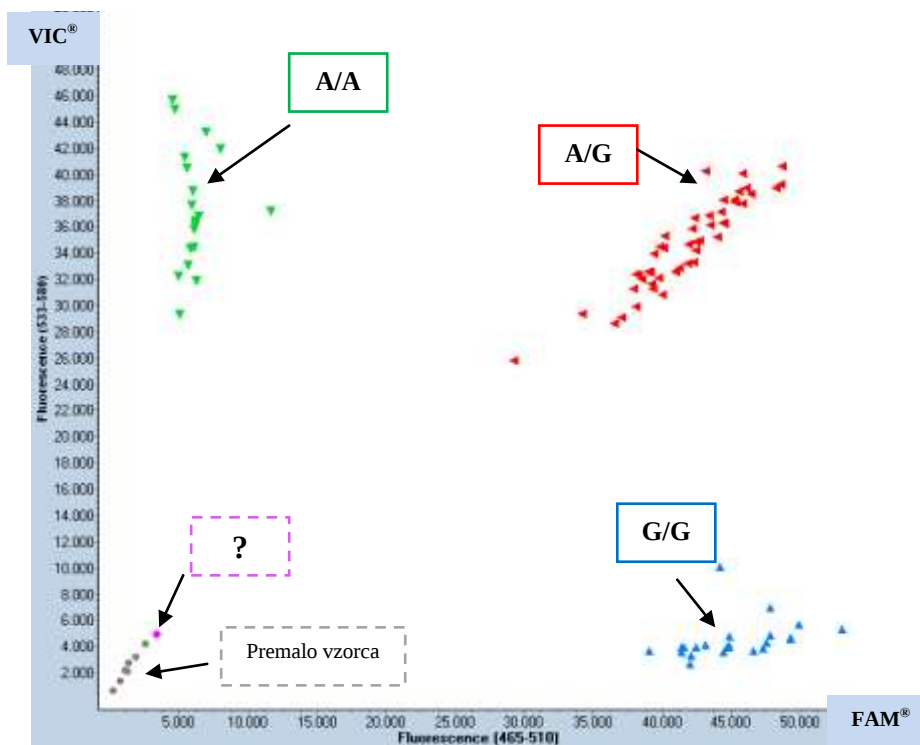
Slika 22: Krivulji, ki dokazujeta prisotnost alela C.

Kadar je naraščanje obeh krivulj približno enako, lahko potrdimo prisotnost obeh alelov, T in C (*Slika 23*). V tem primeru gre za heterozigot, z genotipom C/T.



Slika 23: Krivulja, ki prikazuje prisotnost alela C in T.

Interpretacija rezultatov dobljenih z metodo q-PCR poteka vedno na enak način, kot smo to opisali, ne glede na vrsto preiskovanih polimorfizmov v okviru različnih genov. V primeru polimorfizma rs2301241 tako pripadajo zeleni trikotniki genotipu A/A, modri genotipu G/G in rdeči genotipu heterozigota A/G (*Slika 24*).



Slika 24: Razporeditve genotipov znotraj proučevanih polimorfizmov gena TXNb (-759A>G).

4.2.3. Ugotavljanje morebitnega kliničnega pomena polimorfizmov 12496C>T in -759A>G v genu za tioredoksin

Na zmanjšano aktivnost tioredoksinskega sistema, ki ščiti telo pred delovanjem ROS, lahko vplivata tudi polimorfizma 12496C>T in -759A>G, v genu za tioredoksin. Želeli smo ugotoviti ali obstaja tudi povezava med omenjenima polimorfizmoma in MKG ter določenimi biokemičnimi označevalci kostne premene.

Z genotipizacijo v realnem času smo določili genotipe v vseh 721 vzorcih DNA. Vsem preiskovancem so predhodno izmerili BMDfn, BMDls in BMDtot. Za skoraj vse smo imeli tudi podatke o spolu, starosti, ITM, t-vrednosti in koncentracijah biokemičnih označevalcev kostne premene: RANKL, ALP, sBALP, sOPG, pOC in CTX. Poleg naštetih spremenljivk so ženskim preiskovankam določili tudi čas nastopa menopavze in dobo njenega trajanja.

Vse rezultate smo statistično testirali s programsko opremo SPSS 17.0. Osredotočili smo se predvsem na osnovno primerjavo med spoloma, pri čemer smo žensko populacijo (N = 592) razdelili na skupino zdravih preiskovank (N = 314), in tistih s potrjeno osteoporozo (N = 266). Moških preiskovancev je bilo 115. Statistično analizo rezultatov smo izvedli v enakem obsegu in na enak način, kot v primeru uporabe DHPLC. Poleg tega pa smo opravili še haplotipsko analizo, ki nam je omogočila spremljanje vpliva enega od polimorfizmov na drugega.

4.2.4. Genotipske frekvence polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v slovenski populaciji

Znotraj preiskovanih skupin smo najprej določili frekvence genotipov (**Preglednici XXIII in XXIV**) pri obeh preučevanih polimorfizmih.

Tako kot smo to storili pri proučevanju drugih polimorfizmov, smo tudi v tem primeru preverili ali se naši rezultati porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem. Za polimorfizem 12496C>T smo izračunali vrednost $p = 0,7095$, za -795A>G pa $p = 0,4446$. Na podlagi tega, smo sklepali, da se naši genotipi dejansko porazdeljujejo v skladu s H-W ravnotežjem.

Preglednica XXIII: Frekvence genotipov polimorfizmov 12496C>T (TXNa) in -795A>G (TXNb) znotraj različnih skupin preiskovancev.

Skupine preiskovancev	TXNa (frekvence genotipov)			TXNb (frekvence genotipov)		
	CC	CT	TT	AA	AG	GG
Moški	32 %	50 %	18 %	40 %	42 %	18 %
Ženske	31 %	48 %	21 %	26 %	54 %	20 %
Zdrave ženske	31 %	48 %	21 %	26 %	54 %	20 %
Ženske z osteoporozo	33 %	47 %	20 %	26 %	54 %	20 %

Preglednica XXIV: Primerjava frekvence genotipov polimorfizmov 12496C>T (TXNa) in -795A>G (TXNb) v vzorcih različnih populacij.

Skupine preiskovancev	TXNa (frekvence genotipov)			TXNb (frekvence genotipov)		
	CC	CT	TT	AA	AG	GG
Slovenci	32 %	48 %	20 %	29 %	52 %	19 %
Evropejci	27 %	52 %	21 %	34 %	50 %	16 %
Afro-Američani	23 %	53 %	24 %	26 %	48 %	26 %
Azijci	29 %	40 %	31 %	30 %	48 %	22 %
Podsaharski afričani	23 %	57 %	20 %	25 %	47 %	28 %

4.2.5. Vpliv polimorfizmov TXNa in TXNb na mineralno kostno gostoto in koncentracijo biokemičnih označevalcev kostne premene

Potem, ko smo izbranim preiskovancem določili genotipe obeh vrst polimorfizmov, smo jih, glede na dobljeni rezultat razdelili v tri skupine:

➤ Polimorfizem **12496C>T (TXNa):**

- normalni homozigot C/C,
- mutiran homozigot T/T,
- heterozigot C/T.

➤ Polimorfizem **-795A>G (TXNb):**

- normalni homozigot A/A,
- mutiran homozigot G/G,
- heterozigot A/G.

Naš cilj je bil ugotoviti morebitno povezavo med polimorfizmi 12496C>T (TXNa) in/ali -795A>G (TXNb) ter vrednostmi MKG kot osnovnega pokazatelja osteoporoze. Preveriti smo želeli kako se vrednosti spremenljivk porazdeljujejo med različnimi genotipskimi podskupinami in ali so njihove povprečne vrednosti značilno različne med posameznimi

genotipskimi podskupinami. V ta namen smo uporabili različne statistične teste: ANOVA, Post Hoc, Kruskal-Wallis in ANCOVA ter izvedli tudi haplotipske analize. Uporabili smo razpoložljive parametre, ki smo jih imeli na razpolago za vse preiskovance, in sicer: vrednosti BMDls, BMDfn in BMDtot ter koncentracije biokemičnih označevalcev kostne premene, RANKL, sOPG, sBALP, pOC in CTX. Na voljo smo imeli tudi podake o starosti, spolu, potrjeni diagnozi osteoporoze ter pri ženskah še čas nastopa menopavze in dobo njenega trajanja.

4.2.6. Statistična obdelava rezultatov v okviru polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v genu za tioreodoksin

Želeli smo preveriti, ali obstajajo statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih MKG in biokemičnih označevalcev kostne premene med posameznimi genotipi, določenimi znotraj skupin in podskupin preiskovancev. Za vsako populacijsko skupino smo izvedli še haplotipsko študijo, pri čemer smo si pomagali s podatki iz **Preglednice XXV**.

Preglednica XXV: Tabela za statistično ovrednotenje izsledkov haplotipske študije.

12496C>T (TXNa)	-795A>G (TXNb)	C_promA	C_promG	T_promA	T_promG
CC	promAA	2	0	0	0
	promAG	1	1	0	0
	promGG	0	2	0	0
CT	promAA	1	0	1	0
	promAG	1	1	1	1
	promGG	0	1	0	1
TT	promAA	0	0	2	0
	promAG	0	0	1	1
	promGG	0	0	0	2

(Legenda: prom – promotor, 0 – 0 kopij CA/CG/TA/TG, 1 – 1 kopija CA/CG/TA/TG, 2 – 2 kopiji CA/CG/TA/TG)

Posamezne alele obeh polimorfizmov smo združili v haplotipe - CA, CG, TA in TG, s pripadajočimi podskupinami 0, 1 in 2. Haplotipi so skupine bližnjih alelov, ki se nahajajo na istem kromosomu, zaradi česar se dedujejo skupaj. Oseba ima lahko prisotnih več

polimorfizmov, ki imajo v kombinaciji drugačne učinke kot posamično, zato je pri študiju polimorfizma zelo pomembna analiza haplotipov. Haplotipska študija daje kvalitetnejšo informacijo o sočasni vpletenosti različnih polimorfizmov v preiskovanem genu. Velja namreč, da čeprav večina genov učinkuje samostojno, pa aditivno analiziranje njihovega delovanja lahko pripomore k lažjemu in bolj informativnemu spremljanju nastanka bolezni ali uspešnosti zdravljenja.

Promotor je nukleotidno zaporedje na 5'koncu določenega gena, v katerem se prične prepisovanje mRNA. V promotorski regiji so vezavna mesta za encim polimerazo mRNA in druge transkripcijske dejavnike, od katerih je odvisna intenzivnost izražanja gena. Spremembe v nukleotidnem zaporedju promotorja (promotorski polimorfizmi) lahko pomembno vplivajo na uspešnost uravnavanja genske ekspresije.

4.2.6.1. Preiskovanke in polimorfizma 12496C>T in -795A>G

Statistično smo obdelali rezultate vseh 592 vzorcev. Ker smo proučevali dva različna polimorfizma, smo ju zaradi lažje interpretacije rezultatov in boljše preglednosti med seboj ločili. Analizo smo uspešno zaključili pri 527 vzorcih v okviru polimorfizma TXNa in pri 577 v okviru polimorfizma TXNb.

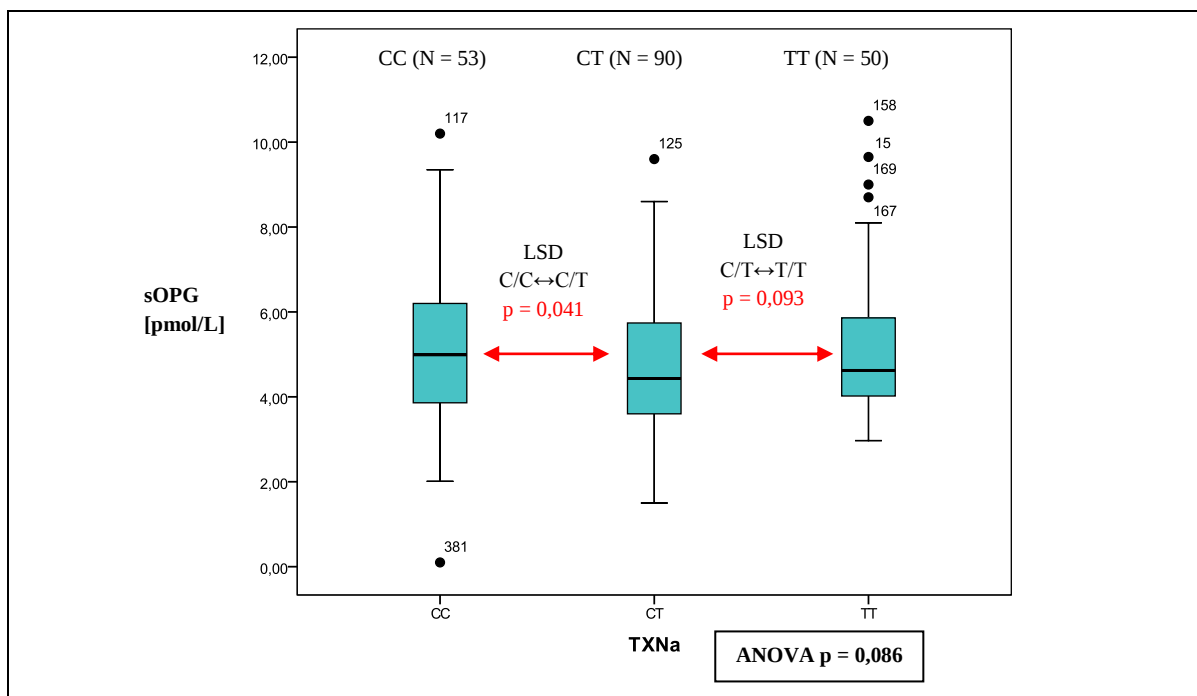
Preglednica XXVI: Alelne frekvence polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v skupini preiskovank.

Polimorfizem	Genotip	Frekvenca (št.,%)	Polimorfizem	Genotip	Frekvenca (št.,%)
TXNa			TXNb		
12496C>T	CC	166 (31 %)	-795A>G	AA	151 (26 %)
	CT	252 (48 %)		AG	312 (54 %)
	TT	109 (21 %)		GG	114 (20 %)
	<i>Skupno</i>	527		<i>Skupno</i>	577

a.) Polimorfizem 12496C>T (TXNa) v skupini preiskovank

S testom ANOVA smo ugotovili statistično mejno značilno razliko ($p = 0,086$) povprečnih vrednosti sOPG. Osteoprotegerin (sOPG) je receptor, ki z receptorjem RANK tekmuje za vezavo liganda RANKL. RANK izražajo hematopoetske prednice osteoklastnih celic, pri čemer stimulira njihovo diferenciacijo v zrele osteoklaste. Zvišane vrednosti sOPG torej

nakazujejo povečano aktivnost osteoklastov. Izvedli smo tudi teste Post Hoc, med katerimi je LSD pokazal statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih koncentracij sOPG med genotipoma C/C in C/T ($p = 0,041$) ter mejno signifikanco ($p = 0,093$) med C/T in T/T. Osebe z genotipom C/C (nemutiran homozigot) so imele v povprečju značilne višje povprečne vrednosti, v primerjavi z genotipom T/T (**Graf 7**).

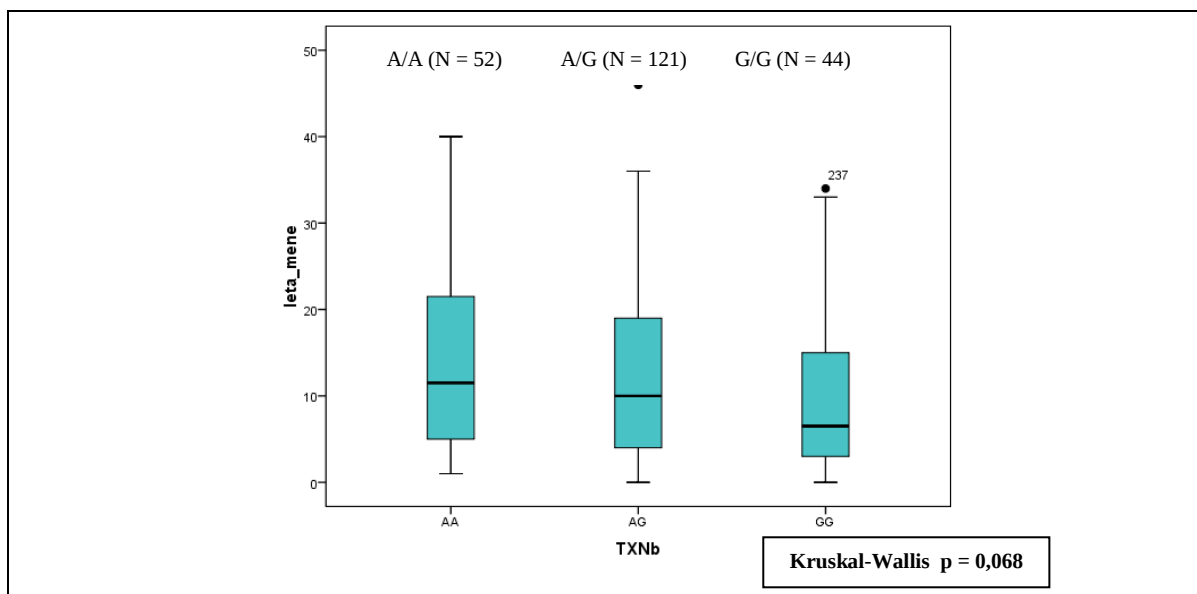


Graf 7: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) sOPG preiskovank v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa – test ANOVA (C/C - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, C/T - heterozigot).

S testom ANCOVA pa nismo mogli izključiti vplivov starosti in ITM ($p = 0,402$) na povprečne vrednosti sOPG, kar pomeni, da nanje ne vpliva le vrsta ugotovljenega genotipa.

b.) Polimorfizem -795A>G (TXNb) v populaciji ženskih preiskovank

Ko smo izvedli test Kruskal-Wallis, smo lahko ugotovili le mejno statistično značilno razliko ($p = 0,068$) za spremenljivko trajanja mene, "leta_mena" (**Graf 8**). Njene povprečne vrednosti so bile višje v primeru genotipa A/A. S testi ANOVA, Post Hoc in ANCOVA pa nismo zaznali statistično značilnih razlik v povprečnih vrednostih spremenljivk med posameznimi genotipskimi podskupinami.



Graf 8: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivke "leta_mene" v povezavi s polimorfizmi v genu TXNb, pri vseh preiskovankah (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

c.) Haplotipska študija v populaciji ženskih preiskovank

Haplotipsko študijo smo sočasno izvedli zato, ker omogoča spremljanje vpliva enega polimorfizma na drugega. V populaciji vseh preiskovank, smo s haplotipsko študijo zabeležili statistično pomemben rezultat v primeru T_promG za spremenljivko leta_mene ($p = 0,037$), in sicer v okviru testa Kruskal-Wallis.

4.2.6.2. Zdrave preiskovanke in polimorfizma 12496C>T in -795A>G

Statistično smo obdelali rezultate, določene v vzorcih 314 preiskovank, kar prikazuje **Preglednica XXVII**. Pri tem smo uspešno izvedli analizo 279 vzorcev v okviru polimorfizmov TXNa in 304 v okviru polimorfizmov TXNb.

Preglednica XXVII: Genotipske frekvence polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v skupini zdravih preiskovank.

Polimorfizem	Genotip	Frekvenca (št., %)	Polimorfizem	Genotip	Frekvenca (št., %)
TXNa			TXNb		
(12496C>T)	CC	85 (31 %)	-795A>G	AA	81 (26 %)
	CT	135 (48 %)		AG	163 (54 %)
	TT	59 (21 %)		GG	60 (20 %)
	Skupno	279		Skupno	304

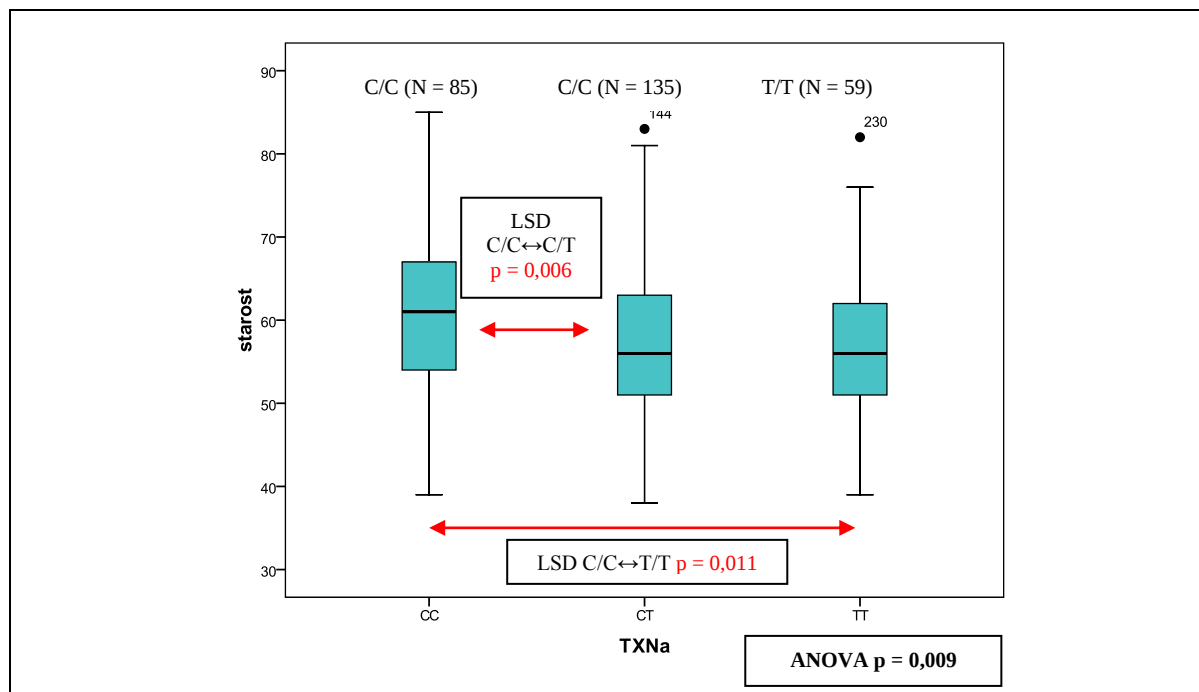
a.) Polimorfizmi 12496C>T (TXNa) v skupini zdravih preiskovank

S pomočjo testa ANOVA smo za spremenljivko “starost” (**Graf 9**) dokazali statistično značilne razlike ($p = 0,009$) med posameznimi genotipskimi podskupinami. To smo potrdili tudi s testi Post Hoc med genotipskimi podskupinami C/C in C/T ter C/C in T/T (**Preglednica XXVIII**).

Preglednica XXVIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivke “starost” s testi Post Hoc v skupini zdravih preiskovank, v okviru polimorfizmov 12496C>T (TXNa).

Spremenljivka	Test Post Hoc	Genotipi	Signifikanca
starost	SCHEFFE	CC – CT	$p = 0,021$
		CC – TT	$p = 0,038$
	LSD	CC – CT	$p = 0,006$
		CC – TT	$p = 0,011$
	BONFERRONI	CC – CT	$p = 0,017$
		CC – TT	$p = 0,032$

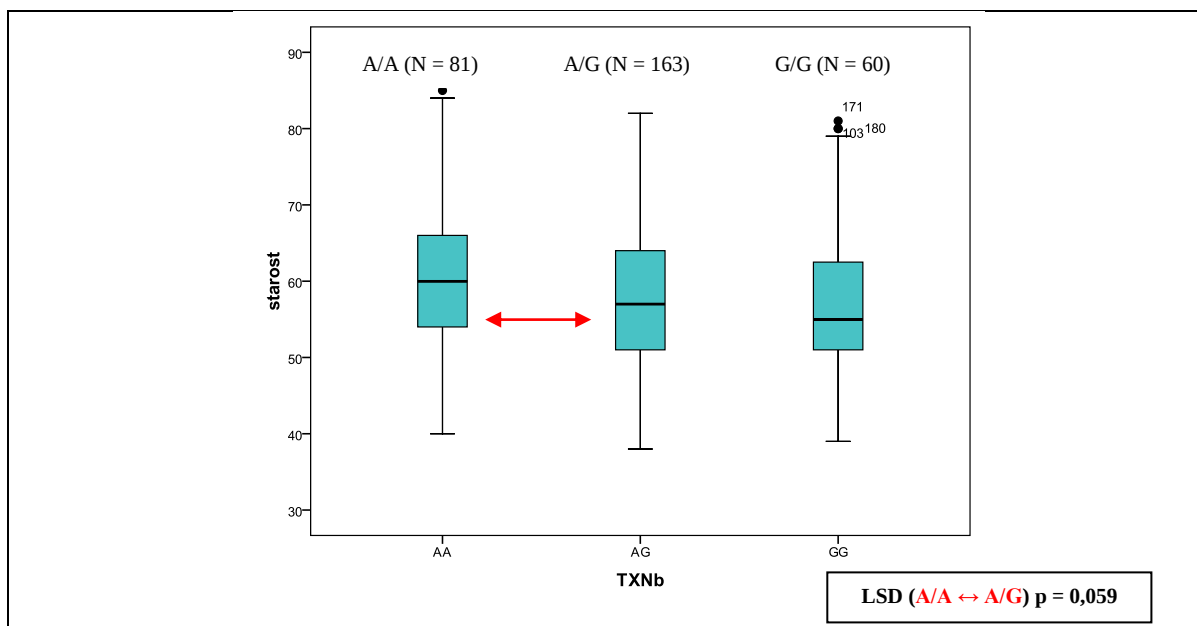
Medtem ko smo s testom Kruskal-Wallis dokazali statistično značilne razlike v vrednostih spremenljivk “leta mene” ($p = 0,031$), pa s testom ANCOVA nismo zaznali statistično pomembnih razlik.



Graf 9: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) starosti v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa, pri zdravih preiskovankah - ANOVA (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

a.) Polimorfizmi -795A>G (TXNb) v skupini zdravih preiskovank

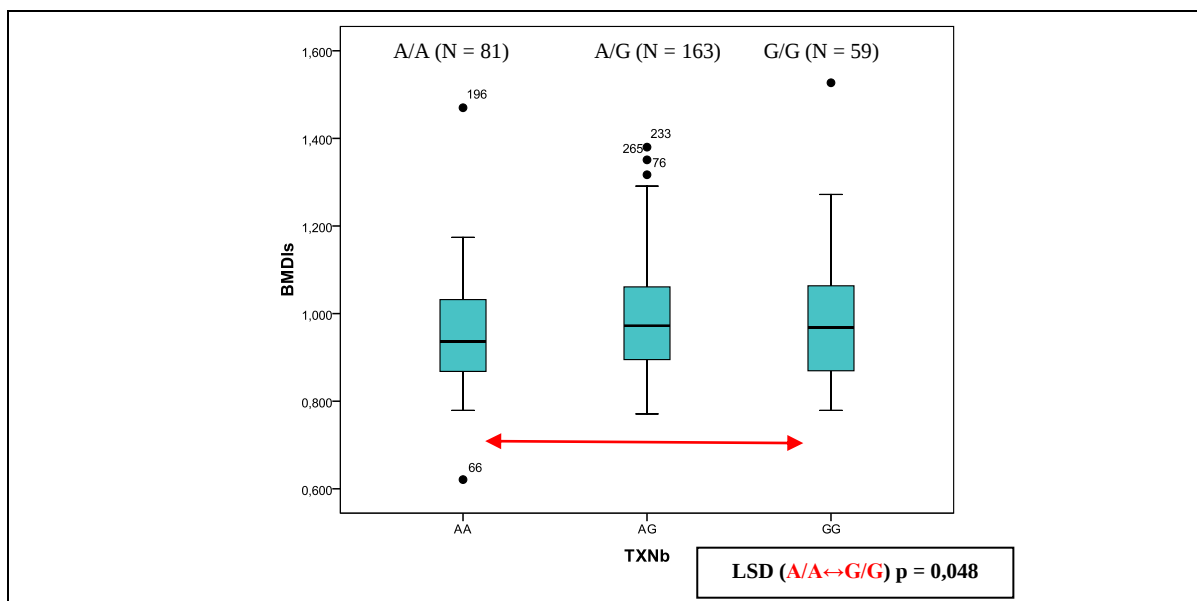
S testom ANOVA nismo dokazali nobenih statistično značilnih razlik med vrednostmi spremenljivk. Test LSD Post Hoc pa je zaznal mejno statistično značilno razliko v povprečnih vrednostih starosti ($p = 0,059$) in BMDls ($p = 0,048$), in sicer med genotipoma A/A in A/G. Pri tem so bile osebe z genotipom A/A (nemutiran homozigot) v povprečju statistično značilno starejše, v primerjavi s tistimi z genotipom G/G (**Graf 10**).



Graf 10: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) starosti, v povezavi s polimorfizmi v genu TXNb, pri zdravih preiskovankah – test LSD Post Hoc (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

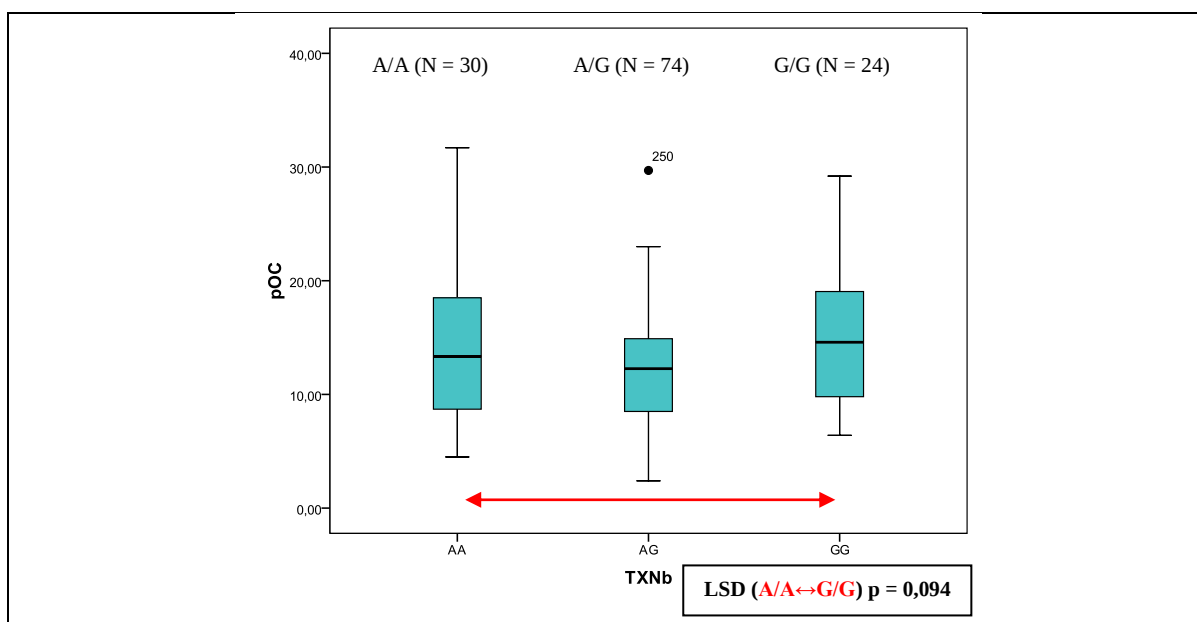
S testi Post Hoc smo ugotovili tudi mejno statistično značilno razliko v povprečnih vrednostih koncentracij pOC ($p = 0,094$) med genotipskima podskupinama A/A in G/G.

Osebe z genotipom A/A (nemutiran homozigot) so imele v povprečju nižje vrednosti spremenljivk BMDls in pOC, v primerjavi s tistimi z genotipom G/G (mutiran homozigot). Zato lahko trdimo, da je genotip G/G prednostno povezan z višjimi vrednostmi MKG (**Graf 11**).



Graf 11: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDIs za gen TXNb pri zdravih preiskovankah - test LSD Post Hoc (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

Tudi vrednosti pOC so bile v primeru genotipa G/G višje kot pri A/A (**Graf 12**), zato lahko trdimo, da ima omenjeni polimorfizem vpliv na ravni osteokalcina (pOC), ki je označevalec za kostno tvorbo, oziroma aktivnost osteoblastov.



Graf 12: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pOC v povezavi s polimorfizmi v genu TXNb, pri zdravih preiskovankah - test LSD Post Hoc (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

S testoma Kruskal-Walis in ANCOVA nismo uspeli dokazati nobene statistično pomembne razlike.

b.) Haplotipska študija v skupini zdravih preiskovank

S haplotipsko študijo smo ugotovili, da imajo zdrave preiskovanke z alelom T opazne razlike v vrednostih biokemičnih označevalcev sBALP ($p = 0,043$), sOPG ($p = 0,072$) in pOC ($p = 0,095$), v kolikor je v promotorskem polimorfizmu prisoten alel G (**Preglednica XXIX**).

Preglednica XXIX: Povzetek rezultatov v obliki povprečnih vrednosti (srednje vrednosti $\pm$ SD) po statistični obdelavi spremenljivk v haplotipski študiji, v skupini zdravih preiskovank.

Prisotni alel	Test	Spremenljivka	0	1	2	Signifikanca (p)
C_promA	ANOVA	starost	56,90 $\pm$ 9,713 N = 100	57,83 $\pm$ 9,513 N = 145	62,15 $\pm$ 9,903 N = 33	0,025
	Kruskal-Wallis	leta mene	10,39 $\pm$ 8,985 N = 152			0,060
T_promA	ANOVA	starost	59,33 $\pm$ 10,295 N = 132	56,76 $\pm$ 9,037 N = 139	58,00 $\pm$ 10,017 N = 7	0,094
T_promG	ANOVA	starost	59,91 $\pm$ 10,165 N = 124	56,5209,169 $\pm$ N = 136	56,11 $\pm$ 8,851 N = 18	0,013
		pOC	13,596 $\pm$ 5,660 N = 53	12,347 $\pm$ 5,093 N = 58	16,771 $\pm$ 5,715 N = 7	0,095
		sBALP	10,244 $\pm$ 4,022 N = 34	9,162 $\pm$ 3,371 N = 47	13,162 $\pm$ 5,301 N = 6	0,043
		sOPG	4,726 $\pm$ 1,685 N = 56	4,229 $\pm$ 1,027 N = 58	5,103 $\pm$ 0,854 N = 8	0,072
	Kruskal-Wallis	leta mene	10,39 $\pm$ 8,985 N = 152			0,054

(Legenda: prom – promotor, 0 – 0 kopij CA/CG/TA/TG, 1 – 1 kopija CA/CG/TA/TG, 2 – 2 kopiji CA/CG/TA/TG)

Ugotovitve:

- **T_promG:** vrednosti spremenljivke, biokemičnega označevalca pOC v genu TXNa, se zmanjšujejo proti genotipu T/T, v genu TXNb pa naraščajo proti genotipu G/G. S haplotipsko študijo smo ugotovili višje vrednosti pOC v primeru, ko sta bila hkrati prisotna alela T/T in G/G. Pri spremenljivki sBALP smo v primeru gena TXNa zabeležili nižje vrednosti pri genotipu T/T, v genu TXNb pa pri genotipu G/G. S študijo smo dokazali, da vrednosti sBALP naraščajo v smeri

prisotnosti alelov T/T in G/G. Ugotovili smo tudi, da se vrednosti spremenljivke *sOPG* v primeru gena TXNa zmanjšujejo v smeri genotipa T/T, v primeru gena TXNb pa njene vrednosti naraščajo proti genotipu G/G. Najvišje vrednosti *sOPG* smo tako ugotovili v primeru sočasne prisotnosti genotipov T/T in G/G.

4.2.6.3. Preiskovanke s potrjeno osteoporozo in polimorfizma 12496C>T in -795A>G

V statistično obravnavo smo vključili 266 preiskovank, uspešno pa smo lahko ovrednotili 238 vzorcev v primeru gena TXNa ter 261 vzorcev v primeru gena TXNb.

Preglednica XXX: Frekvence v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo pri polimorfizmu 12496C>T (TXNa) in -795A>G (TXNb).

Polimorfizem	Genotip	Frekvenca (št., %)	Polimorfizem	Genotip	Frekvenca (št., %)
TXNa			TXNb		
(12496C>T)	CC	78 (33 %)	-795A>G	AA	69 (26 %)
	CT	112 (47 %)		AG	140 (54 %)
	TT	48 (20 %)		GG	52 (20 %)
	Skupno	238		Skupno	261

a.) Polimorfizmi 12496C>T (TXNa) v skupini osteoporotičnih preiskovank

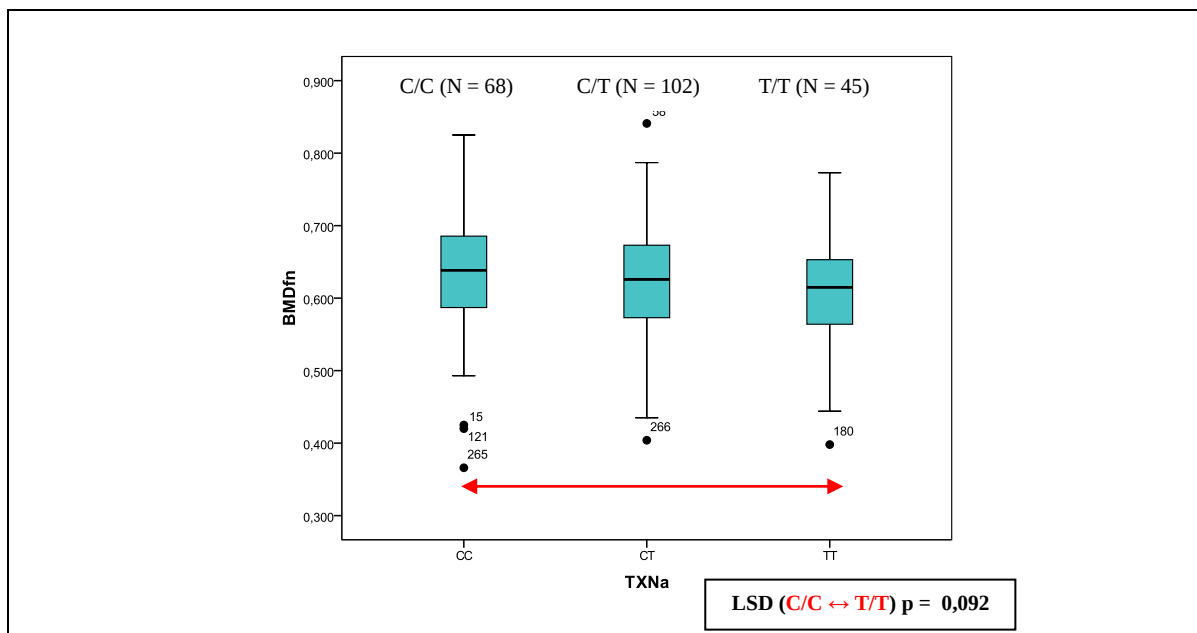
S pomočjo testa ANOVA smo ugotovili, da so povprečne vrednosti spremenljivke "starost" statistično značilno različne med posameznimi genotipskimi skupinami ($p = 0,024$). To ugotovitev smo potrdili tudi s testi Post Hoc, natančneje s testom LSD, pri čemer smo ugotovili tudi mejno statistično značilne razlike pri spremenljivkah "leta mene", BMDfn, BMDls, t_{fn} , t_{tot} ter *sOPG*, in sicer med genotipoma C/C in T/T (**Preglednica XXXI**).

Preglednica XXXI: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk pri polimorfizmih 12496C>T (TXNa) s testi Post Hoc, v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.

Spremenljivka	Test Post Hoc	Genotip	Signifikanca
starost	SCHEFFE	CC - TT	$p = 0,024$
	LSD	CC - TT	$p = 0,006$
	BONFERRONI	CC - TT	$p = 0,019$

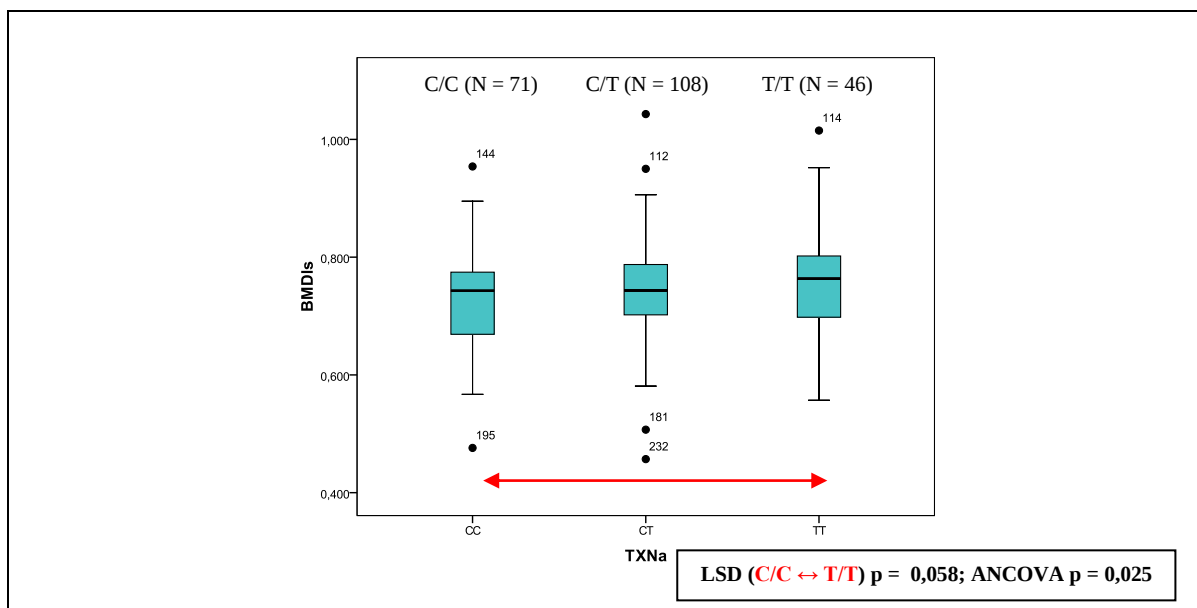
<i>Leta mene</i>	LSD	CC - TT	$p = 0,082$
<i>BMDfn</i>	LSD	CC - TT	$p = 0,092$
<i>t_fn</i>	LSD	CC - TT	$p = 0,077$
<i>t_tot</i>	LSD	CC - TT	$p = 0,099$
<i>BMDls</i>	LSD	CC - TT	$p = 0,058$
<i>sOPG</i>	LSD	CC - TT	$p = 0,068$

Osebe z genotipom C/C (nemutiran homozigot) so imele v povprečju statistično značilno višje vrednosti spremenljivk BMDfn, *t_fn* in *t_tot*, v primerjavi s tistimi z genotipom T/T (mutiran homozigot) (**Graf 13**). Preučevani polimorfizem očitno vpliva na znižane vrednosti MKG, posledica česar je večja verjetnost za nastanek osteoporoze.



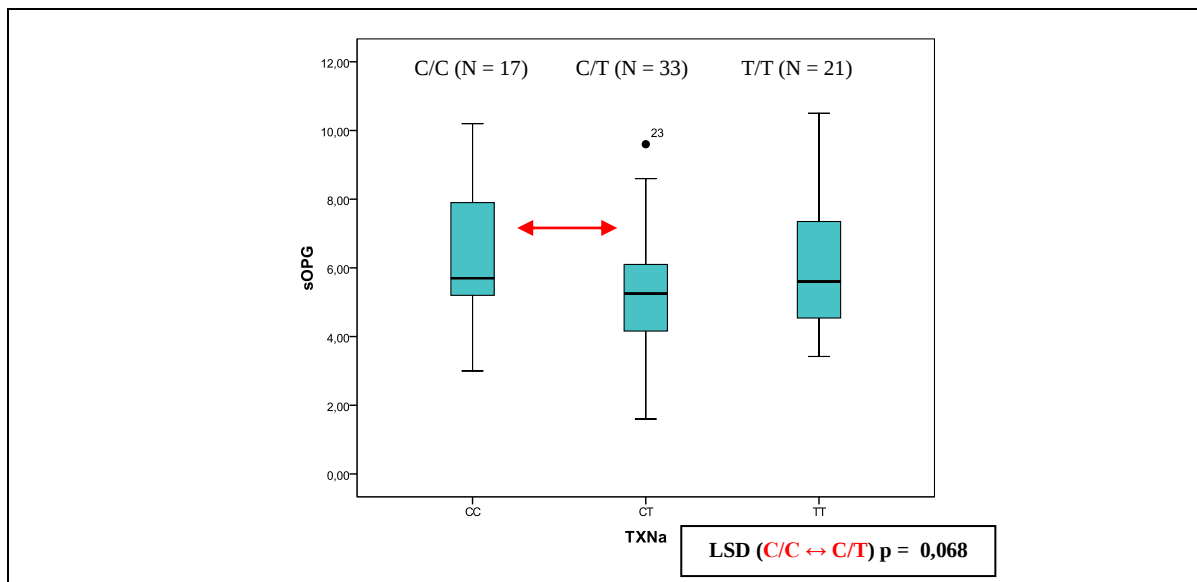
Graf 13: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDfn v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo - test LSD Post Hoc (C/C - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, C/T - heterozigot).

Osebe z genotipom T/T so imele v primerjavi z genotipom C/C v povprečju statistično značilno višje vrednosti spremenljivk starost, leta mene in BMDls (**Graf 14**). Preiskovanke z genotipom T/T imajo očitno prednost v smislu povezanosti z BMDls. S testom ANCOVA smo nato izključili vplive starosti in ITM ($p = 0,025$) na spremenljivko BMDls, kar potrjuje ugotovljeni vpliv genotipa na to spremenljivko.



Graf 14: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDIs v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo - test LSD Post Hoc (C/C - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, C/T - heterozigot).

Osebe z genotipom T/T so imele tudi nižje vrednosti sOPG v primerjavi s tistimi z genotipom C/C (**Graf 15**).



Graf 15: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) sOPG v povezavi s polimorfizmi v genu TXNa, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo – test LSD Post Hoc (C/C - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, C/T - heterozigot).

S testom Kruskal-Wallis v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo nismo zaznali statistično pomembnih razlik.

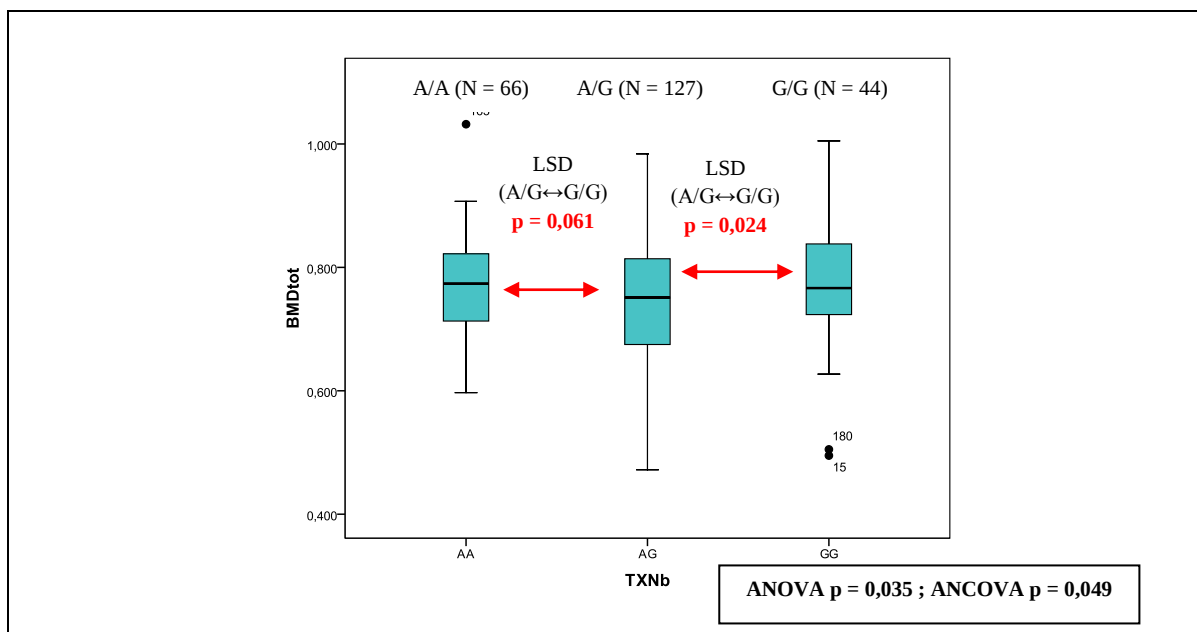
b.) Polimorfizmi -795A>G (TXNb) v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo

Z analizo s testom ANOVA smo ugotovili, da so povprečne vrednosti spremenljivk “leta mene” ($p = 0,050$), BMDtot ($p = 0,035$) in t_{tot} ($p = 0,036$) statistično značilno različne med posameznimi genotipskimi podskupinami. S testi Post Hoc (Scheffe, LSD in Bonferroni) smo omenjene ugotovitve potrdili, pri čemer smo primerjali genotipa A/A in G/G ter med genotipoma A/G in G/G (**Preglednica XXXII**).

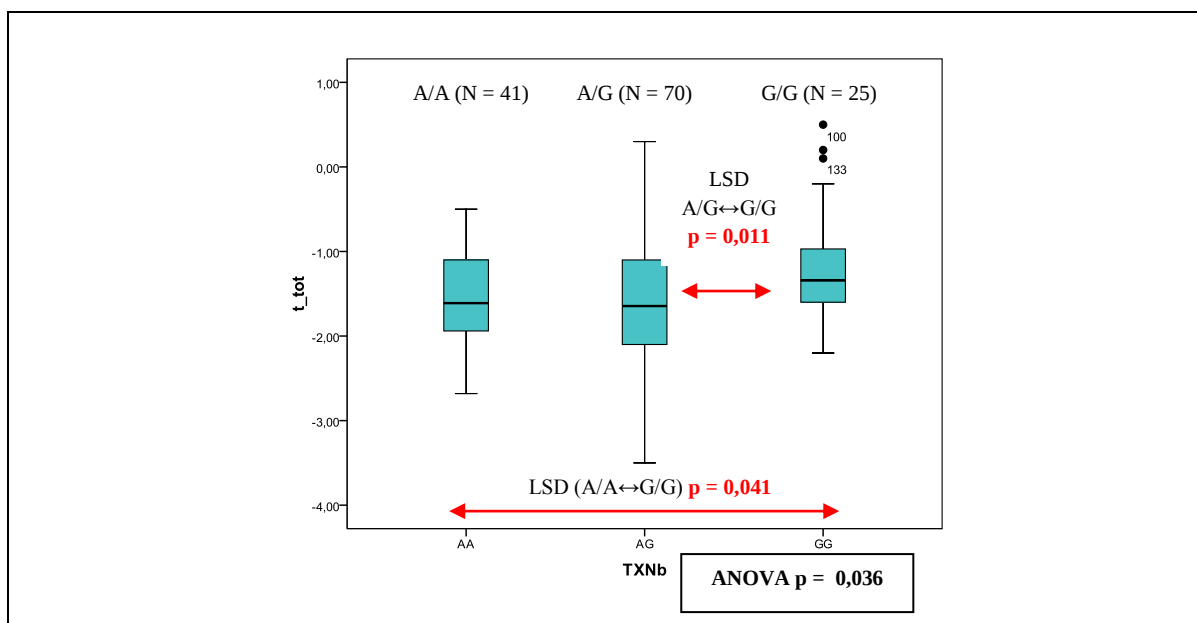
Preglednica XXXII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v primeru polimorfizmov -795A>G(TXNb) s testi Post Hoc, v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.

Spremenljivka	Test Post Hoc	Genotip	Signifikanca
leta mene	SCHEFFE	AG – GG	$p = 0,050$
	LSD	AA – GG	$p = 0,089$
		AG – GG	$p = 0,015$
	BONFERRONI	AG – GG	$p = 0,045$
višina	LSD	AA – GG	$p = 0,086$
BMDtot	SCHEFFE	GG – AG	$p = 0,077$
	LSD	AA – AG	$p = 0,061$
		AG – GG	$p = 0,024$
	BONFERRONI	AG – GG	$p = 0,072$
t_{tot}	SCHEFFE	AG – GG	$p = 0,039$
	LSD	AA – GG	$p = 0,041$
		AG – GG	$p = 0,011$
	BONFERRONI	AG – GG	$p = 0,033$

Ugotovili smo, da so imele osebe z genotipom A/A (nemutiran homozigot) v povprečju značilno višje vrednosti spremenljivke “leta mene”, v primerjavi s tistimi z genotipom G/G. Pri preiskovankah z genotipom G/G pa smo v povprečju izmerili statistično značilne višje vrednosti spremenljivk BMDtot in t_{tot} , v primerjavi s tistimi z genotipom A/A (**Grafa 16 in 17**). Preučevani polimorfizem torej izrazito vpliva na MKG in t-vrednosti.



Graf 16: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDtot glede na polimorfizem v genu TXNb, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo - test ANOVA (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).



Graf 17: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) t_tot glede na polimorfizme v genu TXNb, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo - test ANOVA (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

Izvedli smo tudi test ANCOVA in ugotovili, da lahko izključimo vpliv starosti in ITM na spremenljivko BMDtot ($p = 0,049$). S tem smo še dodatno potrdili pomembnost vpliva

genotipov na to spremenljivko. S testom Kruskal-Wallis pa tudi v tem primeru nismo zaznali statistično pomembnih razlik.

c.) Haplotipska študija v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo

Rezultati haplotipske študije za teste ANOVA smo zbrali v **Preglednici XXXIII**.

Preglednica XXXIII: Povzetek rezultatov v obliki povprečnih vrednosti (srednje vrednosti $\pm$ SD) po statistični analizi spremenljivk v haplotipski študiji, v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo.

Prisotnost alelov	Test	Spremenljivka	0	1	2	Signif. (p)
C_promA	ANOVA	starost	65,96 $\pm$ 8,029 N = 76	62,86 $\pm$ 9,742 N = 122	62,81 $\pm$ 8,443 N = 26	0,054
C_promG	ANOVA	t_fn	-2,428 $\pm$ 0,716 N = 54	-2,347 $\pm$ 0,846 N = 58	-1,520 $\pm$ 0,856 N = 5	0,052
		BMDtot	0,757 $\pm$ 0,095 N = 94	0,751 $\pm$ 0,093 N = 111	0,827 $\pm$ 0,153 N = 8	0,097
		t_tot	-1,615 $\pm$ 0,692 N = 53	-1,523 $\pm$ 0,797 N = 58	-0,820 $\pm$ 0,733 N = 5	0,079
T_promA	ANOVA	leta mene	12,00 $\pm$ 8,152 N = 23	19,14 $\pm$ 11,179 N = 29	22,33 $\pm$ 9,713 N = 3	0,027
		t_tot	-1,374 $\pm$ 0,756 N = 53	-1,650 $\pm$ 0,761 N = 57	-1,858 $\pm$ 0,494 N = 6	0,090
T_promG	ANOVA	leta mene	15,11 $\pm$ 7,997 N = 28	19,38 $\pm$ 12,179 N = 24	3,33 $\pm$ 2,082 N = 3	0,027
		mena	48,98 $\pm$ 3,925 N = 50	49,12 $\pm$ 4,723 N = 41	54,50 $\pm$ 2,646 N = 4	0,047

(Legenda: prom – promotor, 0 – 0 kopij CA/CG/TA/TG, 1 – 1 kopija CA/CG/TA/TG, 2 – 2 kopiji CA/CG/TA/TG)

Ugotovitve:

- **C_promG:** povprečne vrednosti spremenljivke **t_fn** naraščajo v smeri genotipa C/C v genu TXNa, v genu TXNb pa proti genotipu G/G. Opazili smo tudi, da vrednosti še posebej naraščajo, v kolikor sta sočasno prisotna alela C/C in G/G. V primeru spremenljivke **BMDtot** smo ugotovili, da so višje vrednosti prisotne pri osebah z genotipom C/C, v genu TXNb pa so njene vrednosti upadale v smeri genotipa G/G. Višje vrednosti spremenljivke **t_tot** smo zabeležili v prisotnosti genotipa C/C v genu TXNa. Višje vrednosti omenjene spremenljivke pa so bile prisotne tudi pri osebah z genotipom G/G, v genu TXNb. S haplotipsko študijo smo dokazali, da so bile povprečne vrednosti **t_tot** višje pri tistih osebah, ki imajo sočasno prisotna alela C/C in G/G v preiskovanih genih.

- **T_promA:** ugotovili smo, da povprečne vrednosti spremenljivke t_{tot} upadajo v smeri genotipa T/T v genu TXNa, v genu TXNb pa v smeri genotipa A/A. Sočasna prisotnost alelov T/T in A/A je pomenila, da imajo takšna osebe nižje povprečne vrednosti omenjene spremenljivke.

4.2.6.4. Moški preiskovanci in polimorfizmi 12496C>T in -795A>G

V statistično obravnavo smo vključili 115 preiskovancev, ki jih zaradi majhnega števila nismo delili v podskupine. Statistično smo uspešno analizirali 99 vzorcev v primeru preučevanja polimorfizmov v genu TXNa, in 112 v primeru polimorfizmov v genu TXNb.

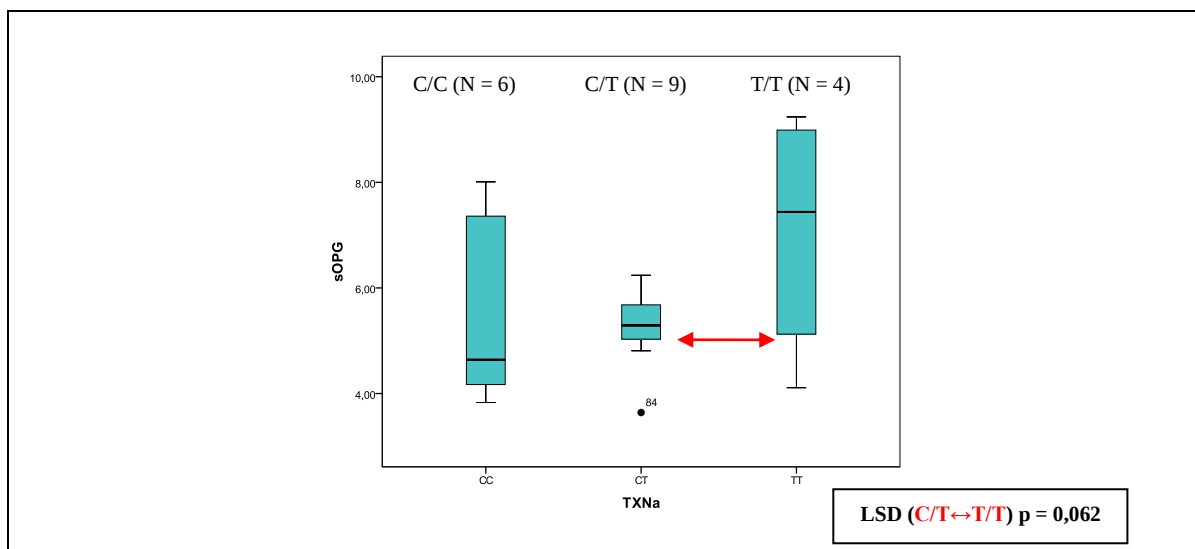
Preglednica XXXIV: Alelne frekvence v skupini moških preiskovancev.

Polimorfizem	Genotip	Frekvenca (št., %)	Polimorfizem	Genotip	Frekvenca (št., %)
TXNa			TXNb		
(12496C>T)	CC	32 (32 %)	-795A>G	AA	45 (40 %)
	CT	49 (50 %)		AG	47 (42 %)
	TT	18 (18 %)		GG	20 (18 %)
	Skupno	99		Skupno	112

a.) Polimorfizmi v genih TXNa (12496G>A) v skupini moških preiskovancev

S testom ANOVA nismo zaznali nobenih statistično pomembnih razlik, s testom LSD Post Hoc pa le statistično mejno značilne razlike v koncentracijah sOPG ($p = 0,062$) med genotipoma C/T in T/T (gen TXNa). Osebe z genotipom T/T so imele v povprečju višje vrednosti sOPG v primerjavi s tistimi z genotipom C/C (**Graf 18**).

Povišana koncentracija sOPG je znak povečane osteoklastne aktivnosti, zato rezultat ni presenetljiv, saj ob postopnem zmanjševanju ravni testosterona s staranjem, prisotnih kroničnih boleznih in življenjskih razvadah, kot na primer uživanje alkohola in kajenje, postane tudi moška populacija dovzetna za nastanek osteoporoze. Ker pa je bila skupina preiskovancev majhna, lahko o povečanem tveganju za nastanek osteoporoze le domnevamo.



Graf 18: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) koncentracij sOPG glede na polimorfizme v genu TXNa, pri moških preiskovancih - test LSD Post Hoc (C/C - nemutiran homozigot, T/T - mutiran homozigot, C/T - heterozigot).

b.) Polimorfizmi v genu TXNb (-795A>G) v skupini moških preiskovancev

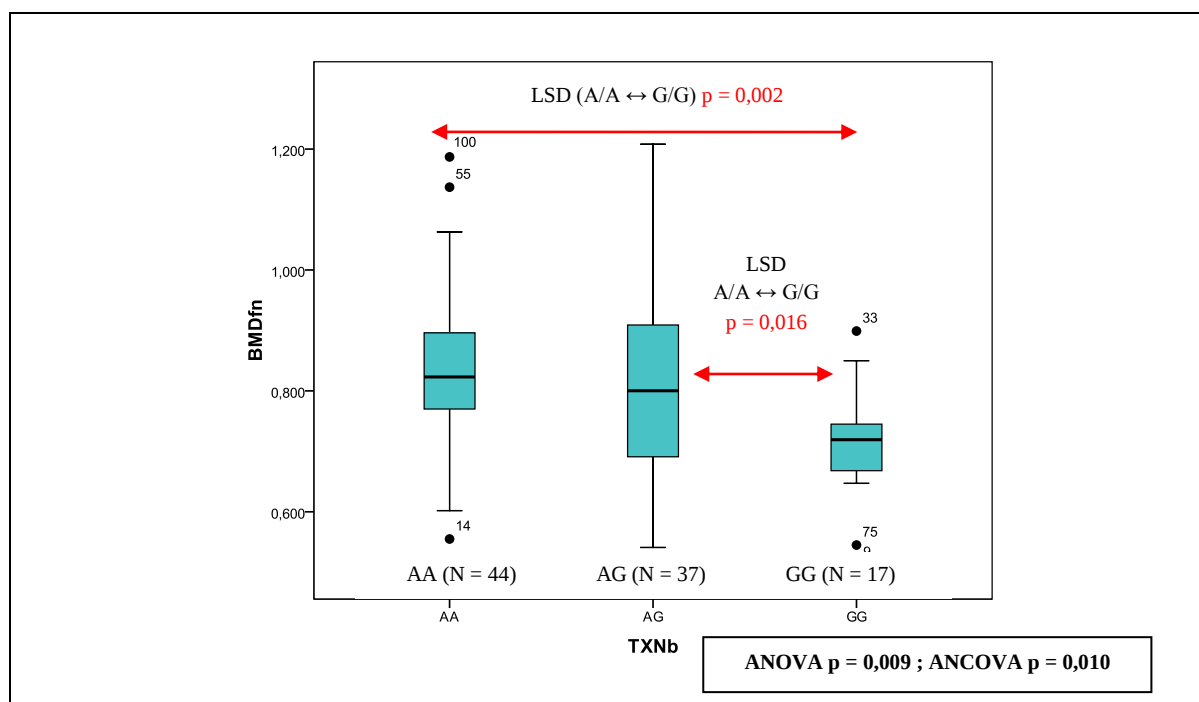
S testom ANOVA smo ugotovili, da so povprečne vrednosti spremenljivk BMDfn ($p = 0,009$), t_fn ($p = 0,052$), BMDtot ($p = 0,035$), BMDls ($p = 0,003$) in t_ls ($p = 0,014$) statistično značilno različne med posameznimi genotipskimi podskupinami. Pri osebah z genotipom G/G so bile njihove povprečne vrednosti značilno nižje, v primerjavi s tistimi z genotipom A/A (**Grafi 19, 20 in 21**). Proučevani polimorfizem je torej povezan z vrednostmi MKG oziroma vpliva na njeno zmanjšanje in s tem na razvoj osteoporoze. Vrednosti MKG so bile namreč manjše pri mutiranih homozigotih.

Izvedli smo tudi teste Post Hoc, pri čemer smo z vsemi (Scheffe, LSD in Bonferroni) potrdili statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih BMDfn, t_fn, BMDtot, t_tot, BMDls in t_ls tako med genotipoma A/A in G/G kot med genotipoma A/G in G/G (**Preglednica XXXV**).

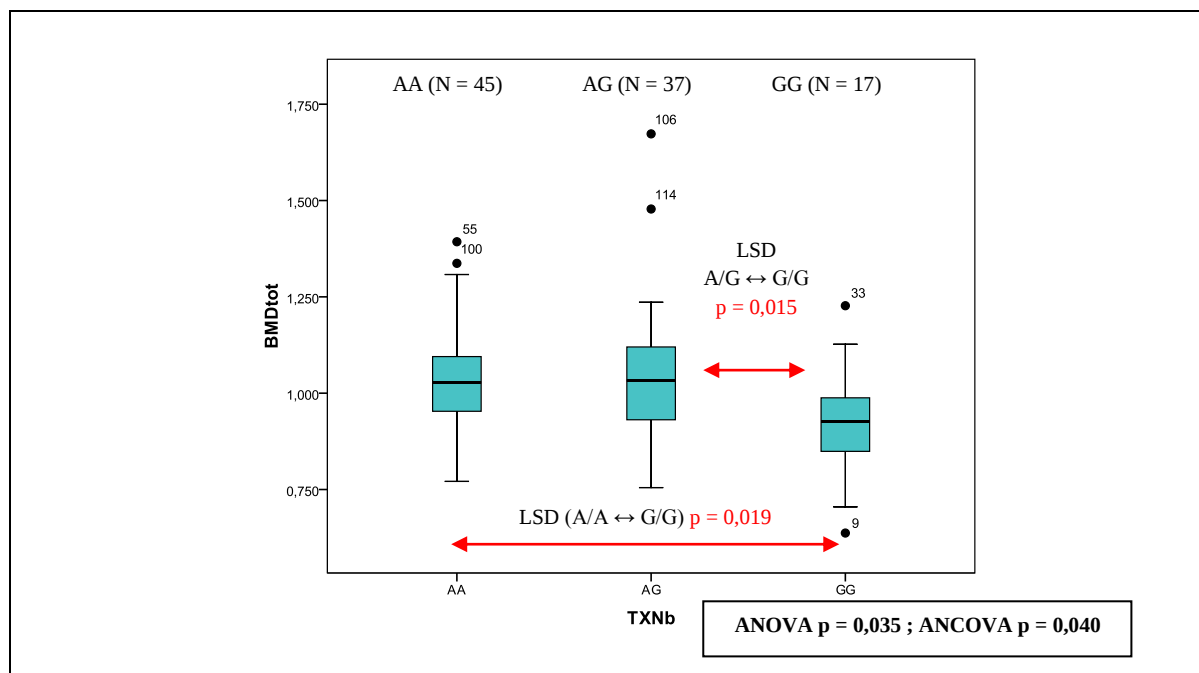
Preglednica XXXV: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk s testi Post Hoc, v skupini moških preiskovancev.

Spremenljivka	Test Post Hoc	Genotipi	Signifikanca
BMDfn	SCHEFFE	GG – AA	p = 0,009
		GG – AG	p = 0,054
	LSD	GG – AA	p = 0,002
		GG – AG	p = 0,016

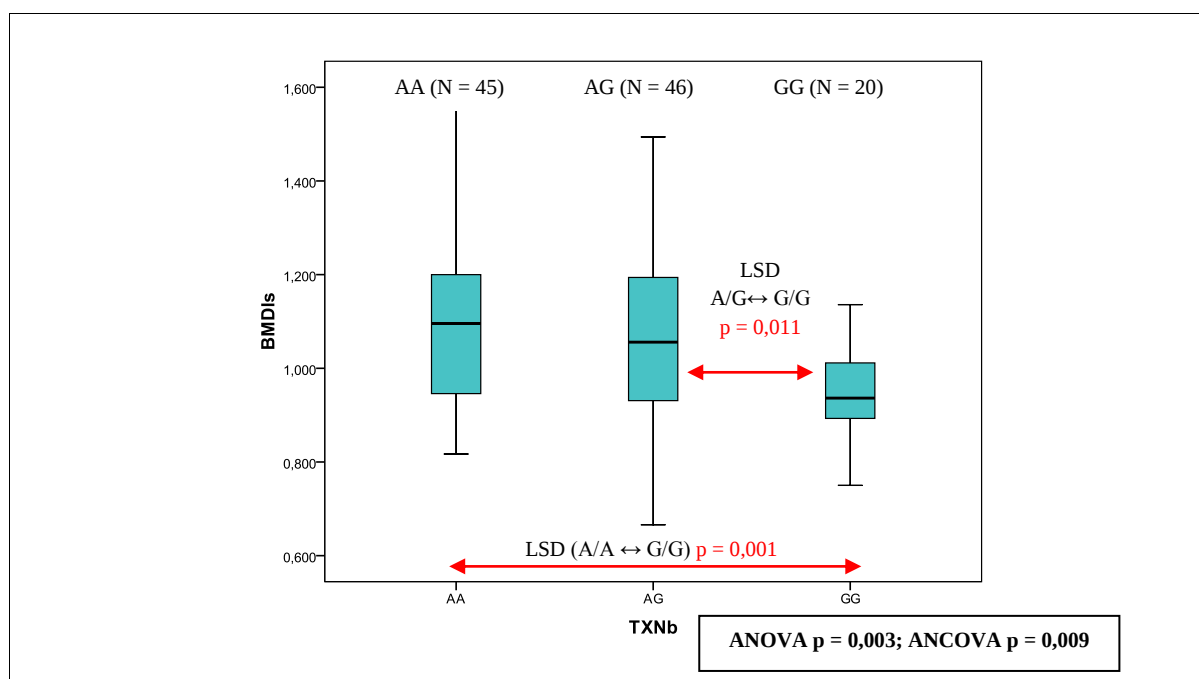
	BONFERRONI	GG – AA	p = 0,007
		GG – AG	p = 0,048
t_{fn}	SCHEFFE	AA – GG	p = 0,052
	LSD	AA – GG	p = 0,015
		AG – GG	p = 0,065
	BONFERRONI	AA – GG	p = 0,046
BMD_{tot}	SCHEFFE	GG – AA	p = 0,062
		GG – AG	p = 0,052
	LSD	GG – AA	p = 0,019
		GG – AG	p = 0,015
	BONFERRONI	GG – AA	p = 0,056
		GG – AG	p = 0,046
t_{tot}	LSD	AA – GG	p = 0,059
BMD_{ls}	SCHEFFE	GG – AA	p = 0,003
		GG – AG	p = 0,035
	LSD	GG – AA	p = 0,001
		GG – AG	p = 0,011
	BONFERRONI	GG – AA	p = 0,002
		GG – AG	p = 0,033
t_{ls}	SCHEFFE	GG – AA	p = 0,016
		GG – AG	p = 0,059
	LSD	GG – AA	p = 0,004
		GG – AG	p = 0,018
	BONFERRONI	GG – AA	p = 0,012
		GG – AG	p = 0,053
pOC	LSD	GG – AA	p = 0,089
sOPG	LSD	AA – AG	p = 0,098
		AA – GG	p = 0,099



Graf 19: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) BMDfn glede na polimorfizme v genu TXNb, pri moških preiskovancih - test ANOVA (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

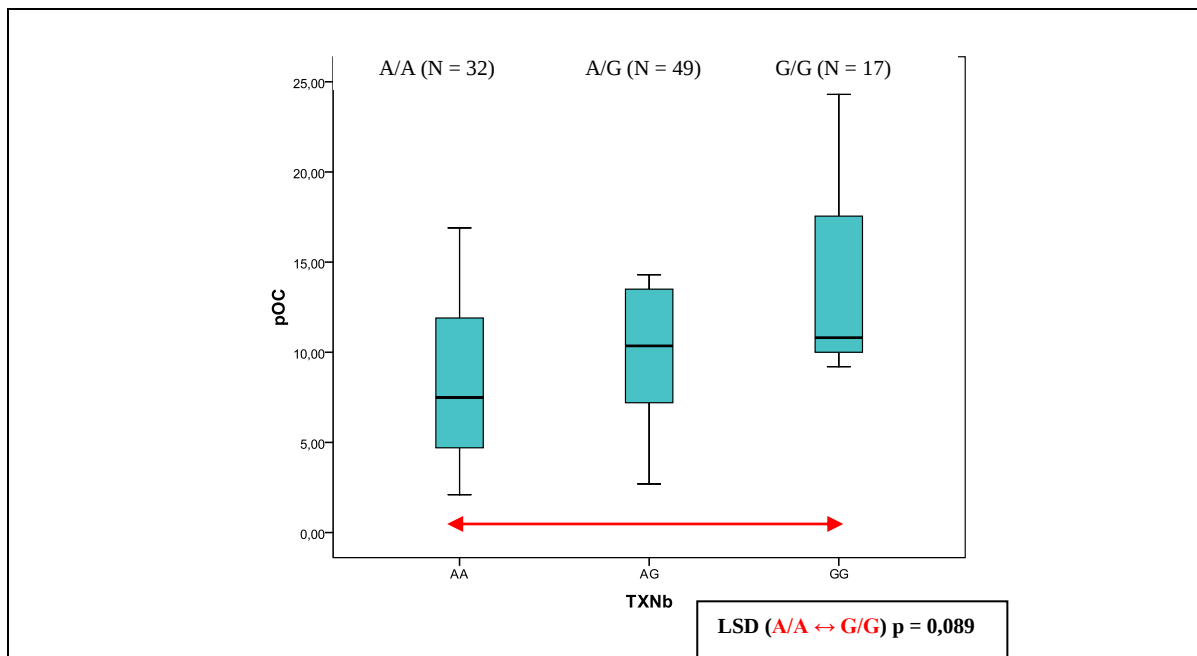


Graf 20: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDtot glede na polimorfizem v genu TXNb, pri moških preiskovancih – test ANOVA (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).



Graf 21: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) BMDIs glede na polimorfizem v genu TXNb, pri moških preiskovancih - test ANOVA (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

S testom LSD Post Hoc smo odkrili tudi statistično značilne razlike v koncentracijah pOC ($p = 0,089$) med genotipoma A/A in G/G (**Graf 22**) ter pOPG med genotipoma A/A in A/G ter A/A in G/G (**Graf 23**).

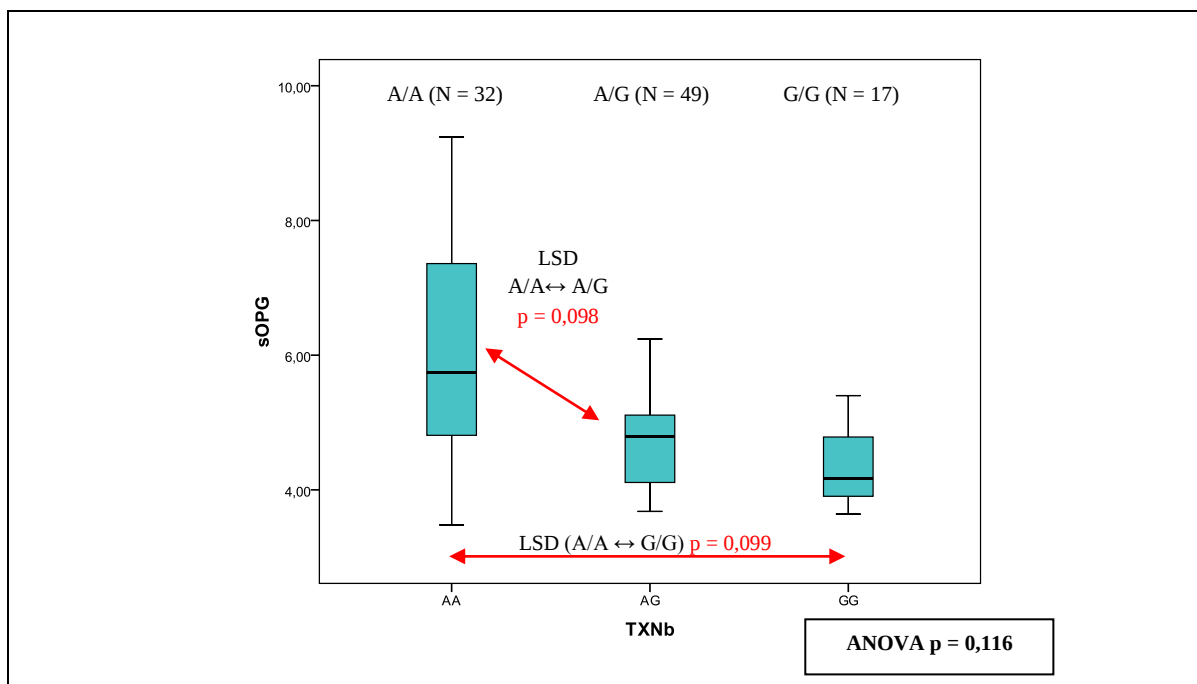


Graf 22: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) pOC glede na polimorfizme v genu TXNb, pri moških preiskovancih - test ANOVA (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

Povprečne vrednosti spremenljivke pOC, ki smo jih zabeležili v prisotnosti genotipa G/G so bile znatno višje kot pri osebah z genotipom A/A. Kljub majhnemu številu vzorcev, lahko predvidevamo, da ima preiskovani polimorfizem vpliv na omenjeno spremenljivko. Zavedamo pa se, da bi morali povečati število preiskovancev, v kolikor bi to trditev želeli zanesljivo potrditi.

Ugotovili smo, da so bile vrednosti sOPG pri nemutiranih homozigotih občutno višje, v primerjavi z mutiranimi. Zato lahko trdimo, da proučevani polimorfizem najverjetneje nima vpliva na zviševanje vrednosti sOPG.

Izvedli smo tudi test ANCOVA in z njim izključili vpliv starosti in ITM na vse vrste meritev MKG, tako na vratu stegenice (BMD_{fn}, $p = 0,010$) kot na ledvenih vretencih (BMD_{ls}, $p = 0,009$) in celotnemu kolku (BMD_{tot}, $p = 0,040$).



Graf 23: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) sOPG glede na polimorfizme v genu TXNb, pri moških preiskovancih - test ANOVA (A/A - nemutiran homozigot, G/G - mutiran homozigot, A/G - heterozigot).

c.) Haplotipska študija v skupini moških preiskovancev

S to študijo smo preverili vpliv enega polimorfizma na drugega in pri osebah z alelom T ugotovili značilne razlike glede na prisotnost promG ali promA. Pri osebah z alelom C omenjenih razlik nismo opazili, razen v primerih, ko je bil sočasno prisoten promG.

Preglednica XXXVI: Povzetek rezultatov povprečnih vrednosti (srednje vrednosti $\pm$ SD), dobljenih s statistično analizo spremenljivk v okviru haplotipske študije skupine moških preiskovancev.

Prisotnost alelov	Test	Spremenljivka	0	1	2	Signif. (p)
C_promG	ANOVA	BMDls	1,091 $\pm$ 0,181 N = 53	1,026 $\pm$ 0,167 N = 41	0,944 $\pm$ 0,051 N = 4	0,083
		pOC	7,850 $\pm$ 4,655 N = 12	10,367 $\pm$ 2,663 N = 6	24,300 $\pm$ N = 1	0,005
T_promA	ANOVA	Višina	171,48 $\pm$ 5,174 N = 48	170,29 $\pm$ 6,078 N = 45	171,40 $\pm$ 6,768 N = 5	0,012
		BMDfn	0,782 $\pm$ 0,136 N = 43	0,835 $\pm$ 0,144 N = 38	0,897 $\pm$ 0,162 N = 5	0,098
		BMDls	1,023 $\pm$ 0,166 N = 48	1,073 $\pm$ 0,162 N = 45	1,260 $\pm$ 0,253 N = 5	0,010
		t_ls	-0,708 $\pm$ 1,423 N = 48	-0,354 $\pm$ 1,372 N = 45	1,260 $\pm$ 2,145 N = 5	0,016
		sOPG	5,211 $\pm$ 1,631	5,251 $\pm$ 0,51	8,040 $\pm$ 1,664	0,012

			N = 8	N = 8	N = 3	
T_promG	ANOVA	BMDfn	0,837±0,145 N = 53	0,783±0,128 N = 31	0,593±0,107 N = 2	0,020
		t_fn	-1,063±1,183 N = 54	-1,470±1,001 N = 31	-2,450±0,778 N = 2	0,088
		BMDtot	1,054±0,168 N = 54	0,988±0,125 N = 31	0,766±0,182 N = 2	0,012
		t_tot	-0,156±1,118 N = 54	-0,415±0,909 N = 31	-1,750±1,202 N = 2	0,080

(Legenda: prom – promotor, 0 – 0 kopij CA/CG/TA/TG, 1 – 1 kopija CA/CG/TA/TG, 2 – 2 kopiji CA/CG/TA/TG)

Ugotovitve:

- **C_promG:** vrednosti spremenljivke BMDls v genu TXNa so upadale v smeri genotipa C/C, v genu TXNb pa v smeri G/G. Nižje vrednosti spremenljivke smo tako opazili pri osebah, ki sočasno izražajo oba alela, C/C in G/G. Ugotovili smo, da so bile vrednosti spremenljivke pOC v primeru prisotnosti genotipa C/C v genu TXNa višje, prav tako pa tudi ob prisotnosti genotipa G/G v genu TXNb. V haplotipski študiji pa smo obravnavali le eno osebo, ki je sočasno izražala alela C/C in G/G in imela visoko povprečno vrednost pOC.
- **T_promA:** ugotovili smo, da vrednosti spremenljivke BMDfn naraščajo v smeri genotipa T/T v genu TXNa, prav tako pa tudi v smeri genotipa A/A v genu TXNb. S haplotipsko študijo smo dokazali, da vrednosti omenjene spremenljivke naraščajo v primeru sočasne prisotnosti genotipov T/T in A/A. Spremenljivki BMDls in t_ls: opazili smo višje vrednosti pri osebah z genotipom T/T, v genu TXNb pa vrednosti obeh spremenljivk naraščajo v smeri genotipa A/A. S haplotipsko študijo smo dokazali, da vrednosti BMDls in t_ls v primeru sočasne prisotnosti obeh genotipov, torej T/T in A/A. Spremenljivka sOPG: osebe z genotipom T/T v genu TXNa, so imele višje vrednosti, tako kot tiste, z genotipom A/A v genu TXNb. S haplotipsko študijo smo dokazali, da so vrednosti preučevane spremenljivke najvišje v primeru sočasne prisotnosti genotipov T/T in A/A.
- **T_promG:** vrednosti spremenljivk BMDfn in t_fn so naraščale v smeri genotipa T/T v genu TXNa, v primeru gena TXNb pa so upadale v smeri prisotnosti genotipa G/G. Spremenljivki BMDtot in t_tot: osebe z genotipom T/T v genu TXNa so imele nižje vrednosti spremenljivk, prav tako tudi tiste z genotipom G/G

v genu TXNb. Haplotipska študija: statistično značilne nižje vrednosti obeh spremenljivk pri osebah s sočasno prisotnostjo alela T/T in G/G.

4.2.7. Potencialni vplivi preiskovanih polimorfizmov 12496C>T in -795A>G v populacijah preiskovancev

S statistično obdelavo podatkov smo ugotavljali ali polimorfizmi 12496C>T in -795A>G v genu za TXN, vplivajo na značilne razlike pri izbranih spremenljivkah. Na ta način smo prišli do naslednjih izsledkov:

- Skupina preiskovank:
 - Polimorfizem 12496C>T statistično značilno vpliva na razlike v vrednostih spremenljivke sOPG.
 - Polimorfizem -795A>G statistično značilno vpliva na razlike vrednostih spremenljivke "leta mene".
- Skupina zdravih preiskovank:
 - Polimorfizem 12496C>T statistično značilno vpliva na razlike v vrednostih spremenljivk "starost" in "leta mene".
 - S testom LSD Post Hoc smo ugotovili statistično značilne razlike v vrednostih spremenljivk pOC in BMDIs med genotipskima podskupinama A/A in G/G znotraj polimorfizma -795A>G. Povprečne vrednosti spremenljivke pOC so bile višje pri genotipu G/G. Zaradi tega lahko trdimo, da ima omenjeni polimorfizem vpliv na povišanje vrednosti omenjenega biokemičnega označevalca. V prisotnosti genotipa G/G pa smo opazili tudi višje vrednosti spremenljivk BMDIs.
 - S haplotipsko študijo smo prišli do zanimivih rezultatov. Opazili smo, da imajo preiskovanke z izraženim alelom T opazne razlike v vrednostih biokemičnih označevalcev: BALP, sOPG in pOC, v kolikor sočasno izražajo tudi alel G v polimorfizmu -795A>G promotorja za gen TXNb.
- Skupina preiskovank s potrjeno osteoporozo:
 - Polimorfizem 12496C>T statistično značilno vpliva na razlike v vrednostih spremenljivke "starost". S testi Post Hoc smo potrdili statistično značilne razlike med vplivi genotipov C/C in T/T na vrednosti spremenljivk BMDfn,

t_{fn} , t_{tot} , BMDls in sOPG. Pri vseh, razen pri BMDls, smo namreč opazili nižje vrednosti v prisotnosti genotipa T/T (mutiran homozigot). Sklepamo lahko, da omenjeni polimorfizem povečuje možnost za pojav osteoporoze. Sočasno pa smo opazili, da so bile povprečne vrednosti spremenljivke BMDls višje pri osebah z genotipom T/T. Izvedli smo tudi test ANCOVA in z njim izključili vpliv starosti in ITM na vrednosti BMDls, s čimer smo še dodatno dokazali pomembnost vpliva genotipa T/T na omenjeno spremenljivko.

- Polimorfizem -795A>G statistično značilno vpliva na razlike v vrednostih spremenljivk "leta mene", BMDtot in t_{tot} . S testom LSD Post Hoc smo v primeru spremenljivke t_{tot} ugotovili značilne razlike glede na prisotnost genotipov A/A in G/G. Povprečne vrednosti obeh spremenljivk so bile nižje pri osebah z genotipom G/G (mutiran homozigot), kar pomeni, da lahko prisotnost omenjenega polimorfizma povežemo z večjo možnostjo za pojav osteoporoze. S testom ANCOVA smo uspeli izključiti vplive spremenljivk "starost" in ITM na vrednosti BMDtot in tako še dodatno potrdili vpliv omenjenega genotipa na vrednosti BMDtot.
- Izvedli smo tudi haplotipsko študijo in dobili zanimiv rezultat za spremenljivki t_{tot} in BMDtot. Opazili smo namreč, da so imele preiskovanke z alelom C opazno različne vrednosti obeh spremenljivk, v kolikor so sočasno izražali tudi alel G v polimorfizmu -795A>G promotorja za gen TXNb.
- Skupina moških preiskovancev:
 - Pri študiji polimorfizma 12496C>T smo s pomočjo testov Post Hoc ugotovili statistično značilne razlike v vrednostih spremenljivke sOPG. Višje povprečne vrednosti osteoprotegerina so bile še posebej izrazite v primeru prisotnosti genotipa T/T. Povečana koncentracija sOPG kaže na povečano osteoklastno aktivnost. Zaradi s staranjem pogojenega postopnega zmanjševanja ravni testosterona, večji pojavnosti kroničnih boleznih ter življenjskih razvad, lahko tudi pri moški populaciji pride do obolenja za osteoporozo. V tem primeru lahko samo sklepamo na povečano tveganje za nastanek osteoporoze, ker pa je bila naša skupina preiskovancev majhna, bi

bilo zanesljivejše zaključke potrebno izvesti študijo na večjem številu oseb moškega spola.

- Polimorfizem -795A>G statistično značilno vpliva na razlike v vrednostih spremenljivk BMDfn, t_fn, BMDtot, BMDls, t_ls in sOPG. Povprečne vrednosti vseh omenjenih spremenljivkah so bile nižje pri osebah z genotipom T/T (mutiran homozigot). Ker pa smo imeli na voljo premajhno število preiskovancev lahko le predvidevamo, da navedeni polimorfizem pomembno negativno vpliva na vrednosti omenjenih spremenljivk vrste BMD, s tem pa na večjo možnost za pojav osteoporoze. S pomočjo testov Post Hoc smo poleg tega, da smo potrdili navedene ugotovitve, ugotovili tudi statistično značilne razlike v vrednostih spremenljivke pOC. Povprečne vrednosti so bile namreč pri preiskovancih z genotipom G/G precej višje. Predvidevamo torej lahko, da omenjeni polimorfizem vpliva pozitivno na vrednosti pOC.
- V okviru haplotipske študije smo ugotovili, da prisotnost alela T pomembno vpliva na razlike v vrednostih spremenljivk vrste BMD. Opazili smo namreč, da imajo preiskovanci z alelom T opazne razlike v vrednostih spremenljivke BMDfn, v kolikor sočasno izražajo tudi katerikoli od promotorskih alelskih polimorfizmov. V primeru spremenljivk BMDls in t_ls je imel alel T pomemben vpliv le ob sočasni prisotnosti alela A v promotorskem polimorfizmu -795A>G. Za razlike v vrednostih spremenljivk t_fn, BMDtot in t_tot pa je bila ob prisotnosti alela T pomembna tudi sočasna izraženost alela G v promotorskem polimorfizmu -795A>G gena TXNb.

5. SKLEP

Z našim raziskovalnim delom smo želeli ugotoviti ali polimorfizmi 12496C>T in -795A>G v genu za tioredoksin ter Ala66Ser (G>T) v genu za tioredoksinsko reduktazo 2, vplivajo na mineralno kostno gostoto (MKG) in izbrane biokemične označevalce kostne premene.

V raziskavo smo vključili skupno 721 preiskovancev, ki so jim izmerili vrednosti MKG in relevantne biokemične označevalce kostne premene. Preiskovance smo najprej razdelili v dve osnovni skupini glede na spol. Zaradi večjega vzorca ženske populacije in zaradi dejstva, da ženske pogosteje obolevajo za osteoporozo kot moški, smo jih razdelili v še dve podskupini, in sicer v skupino zdravih preiskovank in skupino preiskovank s potrjeno diagnozo osteoporoze. Genotipizacijo polimorfizmov smo izvedli z različnimi metodami: verižno reakcijo s polimerazo (PCR), denaturacijsko tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (DHPLC) in verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR), ki smo jih predhodno optimizirali.

Klinični pomen polimorfizmov Ala66Ser, 12496 C>T in -795 A>G znotraj skupin in podskupin smo vrednotili s statističnimi analizami in ugotovili, da je:

- genotip GG v preiskovanem polimorfizmu Ala66Ser prisoten pri 56 %, genotip GT pri 34 % ter genotip TT (mutiran homozigot) pri 10 % oseb v testiranem vzorcu slovenske populacije;
- v preiskovanem polimorfizmu 12496 C>T genotip CC prisoten pri 32 %, genotip CT pri 48 % in genotip TT (mutiran homozigot) pri 20 % oseb v preiskovanem vzorcu slovenske populacije;
- znotraj preiskovanega polimorfizma -795 A>G genotip AA prisoten pri 29 %, genotip AG pri 52 % ter genotip GG (mutiran homozigot) pri 19 % oseb v testiranem vzorcu slovenske populacije;
- v ženski populaciji:
 - polimorfizem Ala66Ser povezan s povprečnimi vrednostmi spremenljivke t_{tot} ($p_{t_{\text{tot}}} = 0,047$) tako, da so imele preiskovanke z genotipom TT značilno nižje vrednosti t_{tot} , v primerjavi s tistimi z genotipom GG;

- alel T polimorfizma 12496 C>T mejno statistično značilno povezan z nižjimi vrednostmi koncentracije biokemičnega označevalca OPG ($p_{\text{OPG}} = 0,086$);
- v skupini zdravih preiskovank:
 - polimorfizem Ala66Ser povezan s povprečnimi vrednostmi koncentracije biokemičnega označevalca OPG ($p_{\text{OPG}} = 0,012$) tako, da so imele osebe z genotipom TT značilno višje vrednosti omenjene spremenljivke, v primerjavi z osebami z genotipom GG. Pri tem smo izključili vplive starosti in ITM ($p_{\text{OPG}} = 0,046$) in s tem potrdili dejanski vpliv genotipa na OPG;
 - haplotipska študija pokazala, da so imele preiskovanke z alelom T (12496C>T) statistično značilno različne vrednosti koncentracij biokemičnih označevalcev BALP ($p_{\text{BALP}} = 0,043$), OPG ($p_{\text{OPG}} = 0,072$) in OC ($p_{\text{OC}} = 0,095$), takrat ko sočasno izražajo tudi alel G promotorskega polimorfizma (-795G>A) za gen TXNb;
- v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo:
 - v primeru polimorfizma 12496C>T izključen vpliv starosti in ITM na MKG ledvenih vretenc ($p_{\text{BMDls}} = 0,025$);
 - polimorfizem -795A>G povezan s povprečnimi vrednostmi spremenljivk t_{tot} ($p_{t_{\text{tot}}} = 0,036$) in BMD_{tot} ($p_{\text{BMD}_{\text{tot}}} = 0,035$), in sicer tako, da so imele preiskovanke z genotipom AA značilno nižje vrednosti od tistih z genotipom GG, pri čemer smo uspeli dokazati, da starost in ITM nimata vpliva na vrednosti BMD_{tot} ($p_{\text{BMD}_{\text{tot}}} = 0,049$);
- v skupini preiskovancev moškega spola:
 - polimorfizem -795A>G, pri osebah z genotipom GG povezan s statistično značilno nižjimi povprečnimi vrednostmi spremenljivk BMD_{fn} ($p_{\text{BMD}_{\text{fn}}} = 0,009$), t_{fn} ($p_{t_{\text{fn}}} = 0,052$), BMD_{tot} ($p_{\text{BMD}_{\text{tot}}} = 0,035$), BMD_{ls} ($p_{\text{BMD}_{\text{ls}}} = 0,003$) in t_{ls} ($p_{t_{\text{ls}}} = 0,014$), v primerjavi s tistimi, ki so izražale genotip AA, ob tem pa smo uspeli tudi dokazati, da tako starost kot ITM ne vplivata na povprečne vrednosti mineralnih kostnih gostot ($p_{\text{BMD}_{\text{fn}}} = 0,010$;

- $p_{\text{BMDls}} = 0,009$; $p_{\text{BMDtot}} = 0,040$), s čemer smo še dodatno potrdili pomembnost vloge preučevanega genotipa;
- haplotipska študija pokazala, da so bile pri preiskovancih z alelom T (12496C>T) prisotne statistično značilne razlike v vrednostih mineralnih kostnih gostot, v kolikor sta bila v promotorskem polimorfizmu gena TXNb prisotna bodisi alel G ali A;
 - bila za preiskovance, ki so sočasno izražali genotipa TT in AA, značilna pojavnost statistično pomembnih razlik v koncentracijah biokemičnega označevalca OPG ($p_{\text{OPG}} = 0,012$) in vrednostih BMDfn ($p_{\text{BMDfn}} = 0,098$), BMDls ($p_{\text{BMDls}} = 0,010$) in njihove t-vrednosti ($p_{t_{ls}} = 0,016$);
 - bila za preiskovance, ki so sočasno izražali genotipa TT in GG, značilna pojavnost statistično pomembnih razlik v vrednostih BMDfn ($p_{\text{BMDfn}} = 0,020$), BMDtot ($p_{\text{BMDtot}} = 0,012$) in njihovih t-vrednosti ($p_{t_{fn}} = 0,088$; $p_{t_{tot}} = 0,080$).

Na osnovi navedenih izsledkov lahko sklepamo, da je polimorfizem -795A>G v genu za tioredoksin bolj izražen pri moških kot pri ženskah. Opazili smo, da omenjeni polimorfizem vpliva na značilne razlike v vrednostih vseh preiskovanih vrst mineralne kostne gostote. Tako smo nižje vrednosti MKG ugotovili pri mutiranih homozigotih z genotipom GG. Glede na to bi lahko sklepali, da omenjeni polimorfizem povečuje možnost nastanka osteoporoze, vendar pa je bila skupina moških preiskovancev premajhna, da bi lahko to zanesljivo potrdili. Rezultati prav tako kažejo, da bi bilo smiselno raziskati mehanizme vplivov preiskovanih polimorfizmov na izražanje aktivnosti encimov TRX in TXNRD2 ter njihovo posredno povezavo z vplivi androgenov.

V diplomski nalogi smo med seboj primerjali tudi podskupini znotraj ženske populacije, in sicer zdrave preiskovanke in tiste s potrjeno osteoporozo. Pri proučevanju polimorfizma Ala66Ser v genu ta TXNRD2 nismo zaznali statistično pomembnih razlik med omenjenima preiskovanima skupinama, na kar bi lahko kazale že same frekvence posameznih genotipov. V skupini zdravih preiskovank so bili namreč genotipi GG, GT in TT zastopani pri 57%, 35% in 8%, v skupini bolnic s potrjeno osteoporozo pa pri 56%, 32% in 12% testiranih oseb. Prav tako tudi nismo ugotovili statistično značilnih razlik pri proučevanju polimorfizma 12496C>T v genu za TRX, kjer je bil genotip CC prisoten pri

31%, CT pri 48%, TT pa pri 21% zdravih preiskovank, medtem ko so bili ti deleži v skupini žensk s potrjeno osteoporozo 33% za genotip CC, 47% za genotip CT in 20% za genotip TT. Pri primerjanju razlik v genotipskih frekvencah, ugotovljenih znotraj obeh podskupin preiskovank pa moramo biti zelo previdni, da ne naredimo napačnih zaključkov. Zato je še toliko bolj pomembno, da vedno opravimo vsa relevantna statistična testiranja, ki nam omogočajo, da ne prezremo morebitnih pomembnih razlik med primerjanimi podatki. Statistično pomembne razlike med omenjenima podskupinama preiskovank smo namreč zaznali v primeru polimorfizma -795A>G, kjer smo, kljub povsem enakim porazdelitvam frekvenc genotipov, in sicer 26% AA, 54% AG in 20% GG, ugotovili, da ta pomembno vpliva na različne vrednosti MKG celotnega kolka ($p_{\text{BMDtot}} = 0,035$) in njene t-vrednosti ($p_{\text{t_tot}} = 0,036$).

6. LITERATURA

1. Kumar P, Clark M: Clinical medicine, 4th Ed., W.B. Saunders, Edinburgh, 1998: 502-511.
2. Kocjan T, Kocjančič A: Vse kar moram vedeti o osteoporozi. Slovensko osteološko društvo, 2003: 5-30.
3. Manolagas S C, Birth and Death of Bone cells: Basic regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of osteoporosis. Endocrine Rewiews, 2002; 21(2): 115-137.
4. Hernández-Gil F-T I, Gracia A M A, Pingarrón del C M, Jerez L B: Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of Bone tissue. Med Oral Cir Bucal, 2006; 11: E47-51.
5. Kocjančič A: Presnovne bolezni. V: Kocjančič A, Mrevlje F: Interna medicina, EWO d.o.o. in DZS d.d., Ljubljana, 1998: 711-736.
6. Rang H, Dale M, Ritter J, Moor P: Bone metabolism. V: Pharmacology, Churchill Livingstone, London, 2003: 446-61.
7. Kocijančič A: Osteoporoza. Fam Vestn, 2000; 51: 351-352.
8. Žorž G: Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. J ISIS, 2006; 15(3): 34-6.
9. Kocjančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. J Zdrav vestnik, 2002; 71: 571-3.
10. Kocjančič A: Osteoporoza: diagnostika in zdravljenje. J Farm Vestn, 1999, 50: 1-6.
11. Legan M: Histološke značilnosti kosti pri nekaterih presnovnih kostnih boleznih. Med Razgl, 2004; 43: 245-253.
12. Schmid A, Wenzel A F: Osteoporoza: prepoznavanje, preprečevanje, zdravljenje. Slovenska knjiga d.o.o., Ljubljana, 1999.
13. <http://emedicine.medscape.com/article/128567-overview> [18.1.2011]
14. Toyabe S: World health Organization fracture risk assessment tool in the assessment of fractures after falls in hospital. BMC Health Services Research, 2010, 10:106.
15. Franić D: Novi vidiki diagnostike in zdravljenje osteoporoze. Zdrav Vest, 2009; 78: I-143-50.
16. Fürst J: Predpisovanje zdravil za preprečevanje in zdravljenje osteoporoze. Zdrav Vest, 2002; 71: I-49-50.

17. Rizzoli R, Brandi M L: The role of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Bone*, 2008; 42: 246-249.
18. Silverman S L: New Selective Estrogen receptor Modulators (SERMs) in Development. *Curr Osteoporos Rep*, 2010; 8: 151-153.
19. Šuput D: Izvor in reakcije prostih radikalov ter reaktivnih kisikovih zvrsti. V: Ribarič S, Šuput D: Temelji patološke fiziologije, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009: 19-24.
20. Agarwal A, Gupta S: role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005; 3:28.
21. Vergani L, Floreani M, Russell A: Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J Biochem*, 2004; 271: 3646-56.
22. Perdih A, Pečar S: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. *J Farm Vestn*, 2006; 57: 24-29.
23. Yuji N, Lee M-C-il, Kato Y, Nagai R, Yonei Y: Oxidative Stress Markers. *Anti-Aging Medicine*, 2010; 7(5): 36-44.
24. http://www.jaica.com/e/pdf/product_catalog.pdf [8.2.2011]
25. Osborne S A: The Thioredoxin System: Gene structure and Expression Studies in response to Oxidative stress. Faculty of Science, Griffith University, 2004: 3-13
26. Hawkes W C, Alkan Z: Regulation of redox Signaling by Selenoproteins. *Biol Trace Elem Res*, 2010; 134:235-251.
27. Cadenas C, Franckenstein D: Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. Cadenas et al. *Breast Cancer Research*, 2010; 12:R44.
28. Mukherjee A, Martin S G: The thioredoxin system: a key target in tumor and endothelial cells. *The British Journal of Radiology*, 2008; 81: S57-S68.
29. Karlenius T C, Tonissen K F: Thioredoxin and cancer: A role for Thioredoxin in all state of Tumor Oxygenation. *Cancers*, 2010; 2: 209-232.
30. Koháryová M, Kollárová M: Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2008; 27: 71-84.
31. Dammeyer P, Damdimopoulos A E: Induction of Cell membrane Protrusions by the N-terminal Glutaredoxin Domain of a Rare Splice Variant of Human

- Thioredoxin Reductase 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008; 283(5): 2814-2821.
32. Damdimopoulos A E, Miranda-Vizuet A: An Alternative Splicing Variant of the Selenoprotein Thioredoxin reductase Is a Molecular of Estrogen Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279(37): 38721-38729.
33. Kim S J, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y: High Thioredoxin Expression Is Associated with Resistance to Docetaxel in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 2005; 11(23): 8425-8430.
34. <http://www.genecards.org/>
35. Sun Y, Rigas B: The thioredoxin System Mediates Redox-Induced Cell Death in Human Colon Cancer Cells: Implications for the Mechanisms of Action of Anticancer Agents. *Cancer Res* 2008; 68: (20).
36. Nalvarte I, Damdimopoulos A E: Overexpression of Enzymatically Active Human Cytosolic and Mitochondrial Thioredoxin Reductase in HEK-293 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279 (52): 54510-54517.
37. Deroo B J, Hewitt S C: Estradiol Regulates the Thioredoxin Antioxidant System in the Mouse Uterus. *The Endocrine Society*, 2004; 145(12): 5485-5492.
38. Patenaude A, Ven Murthy M R: Mitochondrial Thioredoxin system. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279(26): 27302-27314.
39. Ross S J, Findlay V J: Thioredoxin Peroxidase Is Required for the Transcriptional response to Oxidative Stress in Budding Yeast. *Moleculr Biology of the cell*, 2000; 11: 2631-2642.
40. Ganther H E: Seleniim metabolism, selenoproteins and mechanism of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 1999; 20(9): 1657-1666.
41. Gasdaska J R, Harney J W, Gasdaska P Y: Regulation of Human Thioredoxin reductase Expression and Activity by 3'-Untranslated Region Selenocysteine Insertion Sequence and mRNA Instability Elements. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274(36): 25379-25385.
42. Nishiyama A, Masutani H, Nakamura H: Redox Regulating by Thioredoxin and Thioredoxin-Binding proteins. *IUBMB*, 2001; 52:29-33.

43. Nishinaka Y, Nakamura H, Masutani H: Redox Control of Cellular Function by Thioredoxin; A New Therapeutic Direction in Host Defence. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentales*, 2001; 49:285-292.
44. Gregory M S-J: Thioredoxin and Oxidative stress. Faculty of Science, Griffith University, 2003.
45. Aitken C J, Hodge J M: Regulation of Human Osteoclast Differentiation by Thioredoxin Binding Protein-2 and Redox-Sensitive Signaling. *Journal of Bone and Mineral research*, 2004; 19(12): 2057-2064.
46. Biterova E I, Turanov A A: Crystal structures of oxidized and reduced mitochondrial thioredoxin reductase provide molecular details of the reaction mechanism. *PNAS*, 2005; 102(42): 15018-15023.
47. Finkel T, Holbrook N J: Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature*, 2000; 408: 239-247.
48. Hsieh C-C, Kuroo M: The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging. *AGING*, 2010; 2(9): 597-611.
49. Lean J M, Davies J T, Fuller K: A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003; 112(6): 915-923.
50. Bai X, Lu D, Liu A, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP, Zeng WS, Cheng BL, Luo SQ: Reactive Oxygen Species Stimulates Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Expression in osteoblast. *J Biol Chem*, 2005; 280(17): 17497-17506.
51. Hsieh C-C, Papaconstantinou J: Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice. *The FASEB Journal*, 2006; 20:259-268.
52. Troedsson C, Lee R F, Stokes V, Walters T L: Development of a Denaturing High-Performance Liquid Chromatography Method for Detection of Protist Parasites of Metazoans. *American Society for Microbiology*, 2008; 74(14): 4336-4345.
53. Danielson P B, Shelton R J, LaBerge G S: Clinical Applications of Denaturing High-performance Liquid Chromatography-based Genotyping. *CMJ*, 2003; 44(4): 447-454.

7. PRILOGE

7.1. Priloga 1: Rezultati genotipizacije

Preglednica XXXVII: Zbrani podatki genotipizacije za TXNa (rs2776), TXNb (rs2301241) in TXNRD2 (rs5748469 ; A66S (C>A)). Rezultati v stolpcu z oznako TXNa so označeni z 0, 1 in 2, kjer 0 pomeni prisotnost genotipa C/C, 1 prisotnost genotipa C/T in 2 prisotnost genotipa T/T. V stolpcu, označenim s TXNb pomeni rezultat 0 genotip A/A, 1 genotip A/G in 2 genotip G/G. V stolpcu TXNRD2 pa rezultati označeni z 0 pomenijo prisotnost genotipa G/G, 1 prisotnost genotipa C/T in 2 prisotnost genotipa T/T.

zap št	oznaka	TXNa	TXNb	TXNRD2	zap št	oznaka	TXNa	TXNb	TXNRD2
666	1Y		1	2	713	48Y	1	1	1
667	2Y	1	2	1	714	49Y	0	0	0
668	3Y		2	1	715	50Y		1	1
669	4Y	1	1	0	716	51Y	2	0	
670	5Y	1	0	0	717	52Y	2	1	1
671	6Y	1	1	1	718	53Y	2	2	1
672	7Y		1	0	719	54Y	0	1	1
673	8Y	1	2	1	720	55Y	0	1	0
674	9Y	1	2	1	721	56Y	1	1	0
675	10Y	0	1	1	722	57Y	0	1	1
676	11Y	1	0	1	723	58Y	2	2	
677	12Y	2	0		724	59Y	1	2	1
678	13Y	1	2	1	725	60Y	0	2	
679	14Y	1	1		726	61Y	1	1	0
680	15Y	1	0		727	62Y	2	1	
681	16Y	0	1		728	63Y	0	2	1
682	17Y	2	2	0	729	64Y	1	1	
683	18Y		1	0	730	65Y	2	0	1
684	19Y	1	1	0	731	66Y	1	1	1
685	20Y	0	0	1	732	67Y	1	2	1
686	21Y		1	0	733	68Y	2	1	
687	22Y	1	1	0	734	69Y	1	1	0
688	23Y	1	1	1	735	70Y	1	0	
689	24Y	1	1	1	736	71Y	1	0	0
690	25Y	1	2		737	72Y	0	2	1
691	26Y	2	2	1	738	73Y	1	1	1
692	27Y	2	1	0	739	74Y	1	0	0
693	28Y	1	2	2	740	75Y	1	2	
694	29Y	2	2	0	741	76Y	2	1	0
695	30Y	0	0	1	742	77Y	2	1	

696	31Y	0	0		743	78Y	1	0	
697	32Y	2	0	1	744	79Y	1	1	
698	33Y	1	2	0	745	80Y	1	2	0
699	34Y	0	0		746	81Y	1	1	1
700	35Y		0	1	747	82Y	1	0	1
701	36Y	1	2	0	748	83Y	0	1	
702	37Y	1	1	1	749	84Y		2	0
703	38Y	0	0	1	750	85Y	2	1	
704	39Y	1	1	0	751	86Y	1	0	2
705	40Y	2	1	0	752	87Y	1	1	0
706	41Y		1		753	89Y	1	2	
707	42Y	0	2		754	90Y		1	1
708	43Y		1	1	755	91Y	2	1	
709	44Y		0		756	92Y	2	1	1
710	45Y	0	1	2	757	93Y			
711	46Y	0	0	1	758	94Y			0
712	47Y	0	0	1	759	95Y		1	1
760	96Y	2	2	1	807	217Y	0	0	
761	97Y	2	1		808	219Y	1	1	1
762	98Y	1	1		809	220Y	1	0	1
763	99Y		1	1	810	218Y		2	2
764	100Y			1	811	221Y	1	1	1
765	101Y	1	0	1	812	222Y	0	1	1
766	102Y	2	2	1	813	223Y	0	1	1
767	103Y	0	1	2	814	224Y	0	0	
768	104Y				815	225Y	0	0	0
769	105Y		1	1	816	226Y	0	0	
770	106Y	0	0	1	817	227Y	0	0	0
771	107Y	1	1		818	228Y		0	0
772	108Y				819	229Y	2	2	1
773	109Y		1		820	230Y	1	1	
774	110Y		1	1	821	231Y	1	0	0
775	111Y	0	2	0	822	232Y	1	1	0
776	112Y	1			823	233Y	1	0	
777	113Y		0		824	234Y	0	2	0
778	114Y	2	1		825	168Y	0	2	2
779	189Y	0	2	0	826	169Y	1	2	0
780	190Y	0	1	0	827	170Y	1	1	1
781	191Y	1	0	1	913	115Y	1	1	0
782	192Y	0	0	1	914	116Y		1	0
783	193Y	0	1		915	117Y	1	2	1
784	194Y	1	0	0	916	118Y	2	1	0
785	195Y	0	1	0	917	119Y	0	0	0
786	196Y		1		918	120Y		1	0

787	197Y	1	2		919	121Y		1	0
788	198Y	2	1		920	122Y	0	0	0
789	199Y		1	1	921	123Y	1	1	0
790	200Y	2	1	1	922	124Y	0	1	1
791	201Y	1	2	0	923	125Y	1	0	1
792	202Y	0	0		924	126Y	2	1	1
793	203Y	1	1	2	925	127Y	1	1	0
794	204Y	1	1	0	926	128Y	0	1	0
795	205Y	1	2	0	927	129Y	2	2	2
796	206Y	1	1	0	928	130Y	1	2	0
797	207Y	2	1	1	929	131Y	0	2	2
798	208Y	0	2		930	132Y	1	0	2
799	209Y	0	2	0	931	88Y	2	1	
800	210Y	2	1		932	133Y	2	1	2
801	211Y	0	0	0	933	134Y	2	1	2
802	212Y		0		934	135Y	1	1	0
803	213Y	1	1	0	935	136Y	1	2	1
804	214Y		2	1	936	137Y	0	0	1
805	215Y	1	2		937	138Y	1	1	2
806	216Y	0	1		938	139Y	1	1	1
939	140Y	0	0	0	986	230Y	0	0	1
940	141Y	2	1	1	987	231Y	1	0	1
941	142Y	1	1		988	232Y	1	0	
942	143Y	1	1		989	233Y	0	0	1
943	144Y	2	1		990	234Y	1	2	
944	145Y	1	1	0	991	235Y	2	2	0
945	146Y	0	1	1	992	236Y	1	1	
946	147Y	1	2	1	993	237Y	1	0	2
947	148Y	1	0	0	994	238Y	0	0	0
948	149Y	1	1	0	995	239Y		1	1
949	150Y	1	1	0	996	240Y	1	0	
950	151Y	2	1		997	241Y	1	0	1
951	152Y	1	0	0	998	242Y	1	2	1
952	153Y	2	0		999	243Y	1	1	
953	154Y	1	1	0	1000	244Y	0	1	1
954	155Y	0	1		1001	245Y	1	2	1
955	156Y	1	1	0	1002	246Y	1	0	
956	157Y	1	1	0	1003	247Y	P	0	1
957	158Y	0	1		1004	248Y	0	1	
958	159Y	1	1	1	1005	249Y	2	0	1
959	160Y	1	1	0	1006	250Y	0	1	0
960	161Y	1	1		1007	251Y	2	1	1
961	162Y		0		1008	252Y	1	1	0
962	163Y	1	0	0	1009	253Y	1	1	1

963	164Y	1	1	2	1010	254Y	1	1	1
964	165Y	1	1	0	1011	255Y	1	1	1
965	166Y	0	1	0	1012	256Y	1	0	1
966	167Y	1	1	0	1013	257Y	0	0	2
967	171Y	2	1		1014	258Y	1	0	1
968	172Y	1	0	0	1015	259Y	0	2	1
969	173Y	2	0	1	1016	260Y	1	0	2
970	174Y		1	1	1017	261Y	1	2	1
971	175Y		1		1018	262Y		0	
972	176Y				1019	263Y	0	0	
973	177Y	0	1		1020	264Y	0	1	
974	178Y	1	1	0	1021	265Y	0	0	
975	179Y	0	1		1022	266Y	2	1	1
976	180Y	1	1		1023	267Y	0	1	
977	181Y	1	1	0	1024	268y			
978	182Y	0	0	1	1025	269y	0	0	
979	183Y	2	2	0	1026	270Y	0	0	
980	184Y	0	1	0	1027	271Y	0	1	
981	185Y	0	0		1028	272Y	0	0	1
982	186Y	1	1	1	1029	273Y	2	1	
983	187Y	1	1	1	1030	274Y	1	2	1
984	188Y	1	2	1	1031	275Y	0	1	
985	229Y	0	0	1	1032	276Y	2	1	
1033	277Y	1	0	0	1080	325Y	1	0	1
1034	278Y	1	0	1	1081	326Y	1	1	0
1035	279Y	0	0	1	1082	327Y	2	0	0
1036	280Y	2	0		1083	328Y	1	0	1
1037	281Y	2	1		1084	329Y	2	2	0
1038	282Y		1		1085	330Y	1	2	2
1039	283Y	1	1	0	1086	331Y	1	2	0
1040	284Y	1	2	1	1087	332Y	0	1	
1041	285Y	0	0		1088	333Y	0	1	
1042	286Y	1	0	1	1089	334Y		1	0
1043	287Y	1	1		1090	335Y	0	0	
1044	288Y	0	1		1091	336Y	1	0	0
1045	289Y	1	0		1092	337Y	2	1	2
1046	290Y	0	0	0	1093	338Y	2	1	0
1047	291Y				1094	339Y	1	2	0
1048	292Y				1095	340Y	0	0	
1049	293Y		1	1	1096	341Y	0	0	
1050	294Y		1	0	1097	342Y	0	1	
1051	295Y		0	0	1098	343Y	1	1	0
1052	296Y	0	2		1099	344Y	2	2	1
1053	297Y				1100	345Y	1	1	2

1054	298Y	1	2	1	1101	346Y	1	2	0
1055	299Y		0	0	1102	347Y	0	0	
1056	300Y	2	0		1103	348Y	1	2	
1057	301Y	0	1	0	1104	349Y	1	1	0
1058	302Y		0	1	1105	350Y	2	1	2
1059	303Y	2	1	1	1106	351Y	1	0	0
1060	304Y	1	0	0	1107	352Y	0	0	
1061	305Y	1	1	1	1108	353Y	1	1	
1062	306Y	0	0	0	1109	354Y	0	1	0
1063	307Y	0	0	1	1110	355Y	0	1	0
1064	308Y	1	2	0	1111	356Y	0	1	0
1065	309Y	0	1	1	1112	357Y	0	0	0
1066	310Y		1	0	1113	358Y	1	1	2
1067	311Y	2	2	0	1114	359Y	1	0	
1068	312Y	1	1	0	1115	360Y	1	1	2
1069	313Y	1	2	2	1116	361Y	2	0	0
1070	314Y	0	2		1117	362Y	1	1	0
1071	315Y	0	1	1	1118	363Y	2	1	1
1072	316Y	1	1	0	1119	364Y	0	1	0
1073	317Y		0	0	1120	365Y	1	0	0
1074	318Y	1	1	0	1121	366Y	0	1	0
1075	320Y	0	0	2	1122	367Y	1	0	1
1076	321Y	1	0	1	1123	368Y	0	1	0
1077	322Y	0	0	0	1124	369Y	2	0	0
1078	323Y	2	1	0	1125	370Y	0	0	0
1079	324Y	1	1	0	1126	371Y	0	1	1
1127	372Y	0	1		129f	Fosamax	0	1	2
1128	373Y	1	1		130f	Fosamax	1		0
1129	374Y	1	1		131f	Fosamax	0	1	
1130	375Y	1	0	1	134f	Fosamax	1	2	1
1131	376Y		2	0	135f	Fosamax	0	0	2
1132	377Y	0	0	0	136f	Fosamax	2	0	1
1133	378Y				137f	Fosamax	0	2	
1134	379Y	0	0	0	138f	Fosamax	1	1	1
1135	380Y	1	1	1	139f	Fosamax	1	2	
1136	381Y	1	1	0	140f	Fosamax	0	0	
1137	382Y	0	0		141f	Fosamax	0	1	
1138	383Y	0	0	0	142f	Fosamax	1	0	
1139	384Y		1		146f	Fosamax	0	0	
1140	385Y	1	1		148f	Fosamax	2	2	
1141	386Y	1	0		149f	Fosamax	0	0	0
1142	387Y	1	0	1	155f	Fosamax	1	2	0
1143	388Y	1	2	1	156f	Fosamax	0	0	0
1144	389Y	0	1	2	158f	Fosamax	2	2	1

1145	390Y	0	1	1	159f	Fosamax	0	1	1
1146	391Y	2	0	0	160f	Fosamax	0	1	0
1147	118	0	1	0	161f	Fosamax	0	0	0
1148	319Y	1	1	1	163f	Fosamax	1	0	0
1149	392Y	2	2		167f	Fosamax	0	1	0
1150	393Y	1	1		168f	Fosamax	1	1	0
100f	Fosamax	0	0	1	169f	Fosamax	1	1	0
101f	Fosamax	0	0	0	170f	Fosamax	2	2	1
102f	Fosamax				171f	Fosamax			
103f	Fosamax	1	1	0	174f	Fosamax	2	0	0
106f	Fosamax	1	0	0	175f	Fosamax	0	1	0
108f	Fosamax	1	1	1	176f	Fosamax	1	1	0
109f	Fosamax	1	1	1	93f	Fosamax	1	2	1
110f	Fosamax	1	0		94f	Fosamax	0	1	
111f	Fosamax	1	1		95f	Fosamax		1	2
112f	Fosamax	0	1	0	96f	Fosamax	0	1	0
113f	Fosamax		0		97f	Fosamax	1	2	0
114f	Fosamax	0	0		98f	Fosamax	2	1	0
115f	Fosamax	1	1		99f	Fosamax		1	0
117f	Fosamax	0	2	0	1	opg	0	2	1
118f	Fosamax	1	1		2	opg	0	1	1
119f	Fosamax	1	1	2	3	opg	0	2	1
120f	Fosamax	1	2		4	opg	0	2	1
121f	Fosamax	0	1		5	opg	1	2	2
122f	Fosamax	1	2		6	opg	0	0	
123f	Fosamax	2	2	0	7	opg	1	0	
124f	Fosamax	1	1	1	8	opg	0	1	
125f	Fosamax	1	1	0	9	opg	2	1	
126f	Fosamax	1	1		10	opg	1	0	0
11	opg	1	0	1	58	opg	1	0	0
12	opg	1	0	1	59	opg	2	1	0
13	opg	1	2	0	60	opg	2	2	0
14	opg		1		61	opg	1	0	0
15	opg	2	1	2	62	opg			0
16	opg	0	2	1	63	opg	0	0	0
17	opg	1	2		64	opg	1	1	0
18	opg	2	1	0	65	opg	2	2	2
19	opg	1	1	1	66	opg	2	0	0
20	opg	0	0	0	67	opg	1	0	0
21	opg	2	2		68	opg	0	1	1
22	opg	1	1	1	69	opg		1	0
23	opg	0	2	1	70	opg	1	1	
24	opg	1	0	0	71	opg	2	1	
25	opg	0	1	0	72	opg		0	0

26	opg	1	1	2	73	opg	1	0	0
27	opg	1	0	1	74	opg			0
28	opg	1	1	0	75	opg	2	1	0
29	opg	1	1	0	76	opg		1	0
30	opg	2	1	0	77	opg	2	0	0
31	opg	0	0	1	78	opg	1	1	2
32	opg	2	2	0	79	opg	1	1	
33	opg	1	0	0	80	opg	0	0	
34	opg	1	1	0	81	opg	2	1	0
35	opg	0	0	0	82	opg	1	1	1
36	opg	1	2	0	83	opg	1	1	0
37	opg	0	2	1	84	opg	1	1	
38	opg	1	1	1	85	opg		0	0
39	opg	0	1	1	86	opg	2	1	1
40	opg	2	1	1	87	opg	0	2	
41	opg	1	1	0	88	opg	0	1	0
42	opg	1	2	0	89	opg	1	1	2
43	opg	1	2	0	90	opg	2	1	
44	opg	2	0		91	opg	2	2	
45	opg	0	1	0	92	opg	2	1	
46	opg	1	1	0	93	opg			
47	opg	1	0	2	94	opg	1	1	
48	opg	1	0	1	95	opg	0	1	
49	opg	1	0	0	96	opg	0	1	0
50	opg	2	1	0	97	opg	2	2	0
51	opg	2	2	0	98	opg	2	1	0
52	opg	1	2	2	99	opg	1	2	0
53	opg	0	2	2	100	opg	1	1	0
54	opg	2	1		101	opg		1	0
55	opg	1	2	0	102	opg	1	1	
56	opg		1	0	103	opg	0	1	0
57	opg	0	1	0	104	opg	1	0	0
105	opg	1	1	0	621	ralo	2	1	1
106	opg	1	1	0	622	ralo	0	1	0
107	opg	1	2	1	623	ralo	1	2	0
108	opg	1	1		624	ralo	1	1	0
109	opg				625	ralo	1	0	2
110	opg	2	1	0	626	ralo	1	1	0
111	opg	1	1	0	627	ralo	2	1	2
112	opg	2	1	1	628	ralo	0	1	2
113	opg	1	0	0	629	ralo	2	1	2
114	opg	1	1		630	ralo	0	0	0
115	opg	2	1	0	631	ralo	1	0	0
116	opg	0	1	0	632	ralo	2	1	0

117	opg	1	1	0	633	ralo	2	1	2
587	ralo		1	0	634	ralo	1	1	0
588	ralo	0	2	0	635	ralo	1	1	1
589	ralo	2	1	0	636	ralo	1	0	0
590	ralo		2	1	637	ralo	0	1	0
591	ralo		1	0	638	ralo	1	1	0
592	ralo	1	2	0	639	ralo	2	0	0
593	ralo	0	1	1	640	ralo	1	2	0
594	ralo	2	1	1	659	ralo	2	1	0
595	ralo	0	1	0	660	ralo	1	1	0
596	ralo	1	1	0	661	ralo	2	1	
597	ralo	2	2	0	662	ralo	0	0	0
598	ralo	0	1	0	663	ralo	1	1	0
599	ralo	2	1	0	664	ralo	2	2	0
600	ralo	2	1	0	665	ralo	0	0	0
601	ralo	0	0	0	666	ralo	1	2	0
602	ralo	1	0	0	667	ralo	0	1	0
603	ralo	1	2	0	1002Z	ZIT	0	1	2
604	ralo	1	1	0	1003Z	ZIT	2	2	2
605	ralo	1	1	0	1004Z	ZIT	0	0	0
606	ralo	1	1	1	1005Z	ZIT	0	0	
607	ralo	2	0		1006Z	ZIT	1	1	0
608	ralo	1	1	0	1007Z	ZIT	1	1	1
609	ralo	0	1	0	1008Z	ZIT	1	0	2
610	ralo	1	1	0	1009Z	ZIT	0	1	1
611	ralo	1	1	1	1010Z	ZIT	0	0	
612	ralo	1	0	0	1011Z	ZIT	0	1	0
613	ralo	1	2	0	1012Z	ZIT	0	1	1
614	ralo	0	2	2	1021Z	ZIT	0	0	
615	ralo	1	1	0	1028Z	ZIT	0	0	1
616	ralo	2	1	0	1030Z	ZIT	2	0	
617	ralo	0	0	1	1031Z	ZIT	0	1	0
618	ralo	0	2	0	1032Z	ZIT	1	0	0
619	ralo	2	1	0	1033Z	ZIT		2	1
620	ralo	1		0	1034Z	ZIT	0	1	1
1035Z	ZIT	1	1	0	1092Z	ZIT	1	0	0
1036Z	ZIT	1	0	0	1093Z	ZIT	2	1	
1037Z	ZIT	1	1	0	1094Z	ZIT	1	1	
1038Z	ZIT	1	1	1	1095Z	ZIT	2	1	
1039Z	ZIT	1	1		1097Z	ZIT	1	1	
1040Z	ZIT	0	1	0	1098Z	ZIT	2	1	1
1041Z	ZIT	0	0	0	1100Z	ZIT	P	1	0
1042Z	ZIT	2	1	0	1101Z	ZIT	1	1	
1043Z	ZIT	0	0	0	1102Z	ZIT	0	2	

1045Z	ZIT	0	0	0	1103Z	ZIT	0	1	0
1049Z	ZIT	2	2	1	1104Z	ZIT	0	1	2
1051Z	ZIT	1	0	0	1105Z	ZIT	P	2	
1052Z	ZIT	1	0		1106Z	ZIT	P	2	1
1053Z	ZIT	2	2	0	1107Z	ZIT	P	1	1
1054Z	ZIT	2	0		1108Z	ZIT	0	1	1
1055Z	ZIT	1	1		1110Z	ZIT	1	1	
1056Z	ZIT	2	0						
1057Z	ZIT	1	2	2					
1058Z	ZIT	1	1	0					
1059Z	ZIT		0						
1060Z	ZIT	2	1	0					
1061Z	ZIT		0	0					
1062Z	ZIT	1	1	2					
1064Z	ZIT	2	2	1					
1065Z	ZIT	1	1						
1066Z	ZIT	1	1	0					
1067Z	ZIT	1	1	2					
1068Z	ZIT	1	1	0					
1069Z	ZIT	0	0	0					
1070Z	ZIT	1	1	1					
1071Z	ZIT	1	1	0					
1072Z	ZIT	0	1	0					
1074Z	ZIT	0	1	0					
1075Z	ZIT	2	1	0					
1076Z	ZIT	0	0	0					
1077Z	ZIT	0	1						
1078Z	ZIT	1	2	1					
1079Z	ZIT	1	1						
1081Z	ZIT	0	1	1					
1082Z	ZIT	1	1						
1083Z	ZIT	0	0						
1085Z	ZIT		0						
1087Z	ZIT	1	0						
1088Z	ZIT		2						
1089Z	ZIT	2	2						
1090Z	ZIT		0	0					
1091Z	ZIT	1	2	0					

7.2. Priloga 2: Rezultati statistične obdelave

7.2.1. Ženska populacija

7.2.1.1. TXNa (rs2776; g124960)

Preglednica XXXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA in rezultati statistične analize preiskovank (BMDfn - MKG vratu stegenice; t_{fn} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMDtot – MKG kolka; t_{tot} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; t_{ls} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	$X \pm SD$			SIGNIFIKANCA (p)
	CC	CT	TT	
starost	61,52 $\pm$ 10,648 N=161	60,12 $\pm$ 9,19 N=247	61,21 $\pm$ 10,284 N=107	0,334
višina	160,00 $\pm$ 6,123 N=161	160,93 $\pm$ 6,460 N=249	159,77 $\pm$ 6,001 N=108	0,175
BMDfn	0,709 $\pm$ 0,126 N=151	0,707 $\pm$ 0,120 N=236	0,700 $\pm$ 0,129 N=104	0,841
t_{fn}	-1,315 $\pm$ 1,167 N=123	-1,339 $\pm$ 1,120 N=188	-1,394 $\pm$ 1,132 N=83	0,883
BMDtot	0,849 $\pm$ 0,144 N=151	0,849 $\pm$ 0,139 N=234	0,843 $\pm$ 0,145 N=102	0,931
t_{tot}	-0,626 $\pm$ 1,096 N=122	-0,693 $\pm$ 1,058 N=186	-0,669 $\pm$ 1,132 N=81	0,869
lnBMDls	-0,166 $\pm$ 0,198 N=158	-0,145 $\pm$ 0,183 N=248	-0,141 $\pm$ 0,176 N=107	0,458
t_{ls}	-1,436 $\pm$ 1,465 N=129	-1,298 $\pm$ 1,425 N=99	-1,391 $\pm$ 1,330 N=86	0,673
lnpOC	2,789 $\pm$ 0,567 N=69	2,834 $\pm$ 0,637 N=116	2,75 $\pm$ 0,659 N=55	0,772
sBALP	11,316 $\pm$ 4,999 N=53	11,379 $\pm$ 4,692 N=96	11,626 $\pm$ 6,109 N=45	0,951
sOPG	5,267 $\pm$ 2,027 N=53	4,681 $\pm$ 1,420 N=90	5,170 $\pm$ 1,752 N=50	0,086
CTX_1	4043,84 $\pm$ 1981,08 N=19	3182,62 $\pm$ 1633,99 N=47	3578,10 $\pm$ 2152,92 N=21	0,224

Preglednica XXXIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank (ITM – indeks telesne mase; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B).

SPREMENLJIVKA	N	$X \pm SD$	SIGNIFIKANCA (p)
<i>mena</i>	302	49,67 $\pm$ 4,172	0,367
<i>leta_mena</i>	223	12,28 $\pm$ 9,74	0,286
<i>masa</i>	583	69,22 $\pm$ 12,132	0,333
<i>ITM</i>	503	26,930 $\pm$ 4,590	0,718
<i>RANKL</i>	235	0,391 $\pm$ 0,482	0,523

Preglednica XL: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, ki smo ga izvedli pri preiskovankah (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc; OPG - osteoprotegerin).

Spremenljivka (kovariata: starost + lnITM)	Signifikanca (p)
<i>BMDfn</i>	0,296
<i>BMDtot</i>	0,246
<i>lnBMDls</i>	0,212
<i>sOPG</i>	0,402

Preglednica XLI: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testa LSD Post Hoc za skupino preiskovank (OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
<i>sOPG</i>	LSD	CC – CT	p= 0,047
		CT – TT	p= 0,093
<i>CTX</i>	LSD	CC – CT	p= 0,090

7.2.1.2. TXNb (rs2301241 ; a _ 795g)

Preglednica XLII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize pri preiskovankah (BMDfn - MKG vratu stegenice; *t*_{fn} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMDtot – MKG kolka; *t*_{tot} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; *t*_{ls} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	$X \pm SD$			SIGNIFIKANCA (p)
	AA	AG	GG	
<i>starost</i>	61,90 $\pm$ 9,332 N=149	60,37 $\pm$ 10,318 N=306	60,53 $\pm$ 9,655 N=109	0,292
<i>višina</i>	161,12 $\pm$ 5,21	160,24 $\pm$ 6,395	159,95 $\pm$ 6,609	0,258

	N=150	N=306	N=111	
BMDfn	0,701±0,113 N=147	0,706±0,132 N=289	0,713±0,120 N=104	0,751
t_{fn}	-1,444±1,121 N=122	-1,333±1,199 N=233	-1,263±1,004 N=85	0,505
BMDtot	0,846±0,129 N=145	0,844±0,151 N=288	0,862±0,137 N=103	0,517
t_{tot}	-0,769±1,078 N=120	-0,686±1,146 N=231	-0,551±1,002 N=84	0,380
lnBMDls	-0,168±0,178 N=149	-0,146±0,192 N=305	-0,146±0,180 N=107	0,481
t_{ls}	-1,502±1,315 N=124	-1,364±1,482 N=248	-1,328±1,401 N=88	0,601
lnpOC	2,856±0,588 N=62	2,782±0,644 N=141	2,756±0,624 N=52	0,655
sBALP	11,828±4,780 N=49	11,087±5,015 N=13	11,348±5,600 N=42	0,696
sOPG	4,782±1,714 N=49	4,943±1,717 N=118	5,074±1,509 N=39	0,714
CTX_1	2971,90±1866,40 N=21	3617,12±1971,97 N=50	3764,76±2070,43 N=21	0,361

Preglednica XLIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank (ITM – indeks telesne mase; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B).

SPREMENLJIVKA	N	X±SD	SIGNIFIKANCA (p)
mena	302	49,67±4,172	0,323
leta_mena	223	12,28±9,741	0,068
masa	583	69,22±12,132	0,232
ITM	503	26,93±4,59	0,797
RANKL	235	0,931±0,482	0,950

Preglednica XLIV: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc; OPG - osteoprotegerin).

Spremenljivka (kovariata: starost + lnITM)	Signifikanca (p)
BMDfn	0,685
BMDtot	0,394
lnBMDls	0,460

7.2.1.3. Haplotipska študija v skupini vseh preiskovank

Preglednica XLV: Tabela za vrednotenje rezultatov po statistični obdelavi v okviru haplotipske študije.

		C_promA	C_promG	T_promA	T_promG
CC	promAA	2	0	0	0
	promAG	1	1	0	0
	promGG	0	2	0	0
CT	promAA	1	0	1	0
	promAG	1	1	1	1
	promGG	0	1	0	1
TT	promAA	0	0	2	0
	promAG	0	0	1	1
	promGG	0	0	0	2

Preglednica XLVI: Alelne frekvence, določene s haplotipsko študijo.

	C_promA	C_promG	T_promA	T_promG
0	184 (35,1%)	228 (43,5%)	248 (47,3%)	241 (46,1%)
1	279 (53,2%)	273 (52,1%)	259 (49,4%)	252 (48,2%)
2	61 (11,6%)	23 (4,4%)	17 (3,2%)	30 (5,7%)

a.) **C_promA**

SPREMENLJIVKA	<i>X</i>±<i>SD</i>			SIGNIFIKANCA (p)
	0	1	2	
starost	60,89±10,012 N= 179	60,27±9,952 N= 274	62,44±9,216 N= 59	0,303
višina	159,93±6,318 N=181	160,49±6,415 N=274	161,38±5,415 N=60	0,278
BMD_{fn}	0,708±0,123 N=172	0,703±0,124 N=260	0,718±0,126 N=58	0,675
t_{fn}	-1,303±1,076 N=137	-1,400±1,147 N=210	-1,206±1,253 N=47	0,504
BMD_{tot}	0,855±0,142 N=170	0,842±0,140 N=258	0,859±0,149 N=58	0,569
t_{tot}	-0,578±1,075 N=135	-0,744±1,060 N=207	-0,584±1,200 N=47	0,331
lnBMD_{ls}	-0,145±0,178 N=178	-0,150±0,188 N=273	-0,165±0,205 N=59	0,772
t_{ls}	-1,360±1,378 N=143	-1,376±1,426 N=222	-1,314±1,517 N=48	0,962
ALP	1,0867±0,237 N=15	1,0422±0,241 N=27	1,095±0,456 N=6	0,839
lnpOC	2,764±0,642 N=92	2,798±0,610 N=125	2,987±0,568 N=21	0,332
sBALP	11,371±5,855 N=76	11,186±4,270 N=99	13,167±6,191 N=17	0,338
sOPG	5,123±1,732 N=78	4,952±1,624 N=101	4,275±2,102 N=13	0,249

CTX_1	3658,42±2141,08 N=36	3234,6±1517,6 N=48	464,0±3007,3 N=3	0,245
--------------	-------------------------	-----------------------	---------------------	-------

b.) C_promG

SPREMENLJIVKA	X±SD			SIGNIFIKANCA (p)
	0	1	2	
starost	61,42±9,722 N= 224	60,23±10,027 N= 265	60,55±9,961 N= 22	0,328
višina	160,38±5,794 N=226	160,57±6,627 N=266	158,64±6,744 N=22	0,455
BMDfn	0,703±0,121 N=219	0,707±0,126 N=250	0,728±0,124 N=20	0,859
t_fn	-1,01±1,132 N=178	-1,300±1,155 N=198	-1,210±0,974 N=17	0,769
BMDtot	0,846±0,137 N=215	0,847±0,145 N=250	0,891±0,147 N=20	0,549
t_tot	-0,708±1,099 N=174	-0,648±1,081 N=197	-0,399±0,955 N=17	0,523
lnBMDls	-0,150±0,178 N=224	-0,147±0,196 N=264	-0,191±0,161 N=21	0,748
t_ls	-1,383±1,319 N=183	-1,300±1,516 N=211	-1,833±1,122 N=18	0,383
ALP	1,074±0,328 N=17	1,048±0,233 N=30	1,300± N=1	0,646
lnpOC	2,822±0,604 N=103	2,793±0,628 N=122	2,766±0,713 N=12	0,737
sBALP	11,768±5,561 N=84	11,228±4,886 N=96	10,686±4,175 N=11	0,864
sOPG	4,949±1,737 N=88	4,930±1,590 N=92	5,649±2,400 N=11	0,569
CTX_1	3399,47±2055,32 N=38	3291,81±1491,17 N=42	4961,83±2585,70 N=6	0,210

c.) T_promA

SPREMENLJIVKA	X±SD			SIGNIFIKANCA (p)
	0	1	2	
starost	61,08±10,269 N= 240	60,28±9,562 N= 255	62,76±9,543 N= 17	0,462
višina	160,09±6,230 N=242	160,64±6,316 N=256	161,06±6,505 N=17	0,559
BMDfn	0,711±0,124 N=228	0,703±0,124 N=245	0,681±0,114 N=17	0,534
t_fn	-1,277±1,122 N=184	-1,380±1,139 N=197	-1,722±1,243 N=13	0,320
BMDtot	0,854±0,141	0,845±0,143	0,830±0,126	0,686

	N=227	N=242	N=17	
<i>t_tot</i>	-0,584±1,062 N=182	-0,725±1,094 N=194	-0,956±1,186 N=13	0,282
<i>lnBMDls</i>	-1,53±0,194 N=237	-0,143±0,179 N=256	-0,223±0,176 N=17	0,220
<i>t_ls</i>	-1,322±1,463 N=192	-1,357±1,378 N=208	-2,062±1,233 N=13	0,190
<i>ALP</i>	1,055±0,293 N=28	1,068±0,246 N=18	1,120±0,057 N=2	0,943
<i>lnpOC</i>	2,778±0,581 N=108	2,831±0,643 N=121	2,685±0,792 N=9	0,688
<i>sBALP</i>	11,407±5,413 N=83	11,391±4,988 N=102	12,404±4,157 N=7	0,879
<i>sOPG</i>	5,123±1,734 N=81	4,829±1,653 N=104	5,457±2,164 N=7	0,383
<i>CTX_1</i>	3709,47±1872,66 N=34	388,18±1839,94 N=51	1318,50±17,678 N=2	0,189

d.) T_promG

SPREMENLJIVKA	X±SD			SIGNIFIKANCA (p)
	0	1	2	
<i>starost</i>	61,43±10,211 N=236	60,16±9,659 N= 246	59,86±9,345 N= 29	0,331
<i>višina</i>	160,19±6,037 N=236	160,37±6,548 N=248	159,33±5,915 N=30	0,408
<i>BMDfn</i>	0,703±0,119 N=225	0,708±0,127 N=235	0,715±0,138 N=29	0,826
<i>t_fn</i>	-1,419±1,132 N=184	-1,274±1,146 N=185	-1,292±1,103 N=24	0,462
<i>BMDtot</i>	0,845±0,134 N=223	0,850±0,149 N=234	0,860±0,141 N=28	0,846
<i>t_tot</i>	-0,720±1,062 N=181	-0,628±1,118 N=184	-0,561±1,009 N=23	0,641
<i>lnBMDls</i>	-0,166±0,186 N=233	-0,139±0,187 N=247	-0,116±0,181 N=29	0,175
<i>t_ls</i>	-1,478±1,369 N=191	-1,274±1,472 N=197	-1,116±1,293 N=24	0,250
<i>ALP</i>	1,042±0,286 N=23	1,073±0,234 N=21	1,125±0,384 N=4	0,831
<i>lnpOC</i>	2,786±0,567 N=105	2,821±0,662 N=119	2,751±0,666 N=14	0,869
<i>sBALP</i>	11,319±4,550 N=82	11,439±5,497 N=100	12,352±6,235 N=10	0,836
<i>sOPG</i>	5,163±1,876 N=85	4,788±1,613 N=96	5,166±0,787 N=11	0,316
<i>CTX_1</i>	3397,66±1922,01 N=35	3481,33±1837,74 N=46	3749,50±1913,63 N=6	0,911

7.2.1.3. TXNRD2 (rs5748469 ; A66S (G > T))

Preglednica XLVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovank (BMDfn - MKG vratu stegenice; t_{fn} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMDtot – MKG kolka; t_{tot} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; t_{ls} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	X $\pm$ SD			SIGNIFIKANCA (p)
	GG	GT	TT	
starost	59,12 $\pm$ 9,475 N=241	61,95 $\pm$ 10,240 N=148	60,98 $\pm$ 7,872 N=42	0,018
višina	160,1 $\pm$ 6,511 N=245	160,26 $\pm$ 6,193 N=148	160,43 $\pm$ 6,208 N=42	0,792
BMDfn	0,713 $\pm$ 0,127 N=231	0,707 $\pm$ 0,127 N=143	0,684 $\pm$ 0,116 N=38	0,412
t_{fn}	-1,178 $\pm$ 1,149 N=172	-1,426 $\pm$ 1,139 N=125	-1,600 $\pm$ 1,063 N=30	0,064
BMDtot	0,855 $\pm$ 0,152 N=227	0,847 $\pm$ 0,131 N=143	0,819 $\pm$ 0,151 N=37	0,360
t_{tot}	-0,511 $\pm$ 1,107 N=168	-0,777 $\pm$ 1,057 N=15	-0,923 $\pm$ 1,183 N=29	0,047
lnBMDls	-0,147 $\pm$ 0,182 N=241	-0,153 $\pm$ 0,178 N=146	-0,174 $\pm$ 0,185 N=42	0,624
t_{ls}	-1,255 $\pm$ 1,373 N=181	-1,557 $\pm$ 1,334 N=128	-1,622 $\pm$ 1,389 N=34	0,099
lnpOC	2,831 $\pm$ 0,675 N=135	2,758 $\pm$ 0,534 N=53	2,813 $\pm$ 0,524 N=20	0,775
sBALP	11,126 $\pm$ 5,669 N=111	10,891 $\pm$ 3,855 N=41	10,025 $\pm$ 4,985 N=16	0,730
sOPG	4,773 $\pm$ 1,679 N=114	5,017 $\pm$ 1,591 N=41	5,417 $\pm$ 1,886 N=18	0,282
CTX_1	3243,63 $\pm$ 1966,07 N=49	3819,11 $\pm$ 2258,59 N=18	3422,00 $\pm$ 1606,54 N=6	0,588

Preglednica XLVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank (ITM – indeks telesne mase; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B).

SPREMENLJIVKA	N	X $\pm$ SD	SIGNIFIKANCA (p)
mena	302	49,67 $\pm$ 4,172	0,474
leta_mena	223	12,28 $\pm$ 9,741	0,043
masa	583	69,22 $\pm$ 12,132	0,286
ITM	503	26,93 $\pm$ 4,59	0,504
RANKL	235	0,391 $\pm$ 0,482	0,858

Preglednica XLIX: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc).

Spremenljivka (kovariata: starost + lnITM)	Signifikanca (p)
BMDfn	0,066
BMDtot	0,093
lnBMDls	0,555

Preglednica L: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovank.

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
starost	SCHEFFE	GG – GT	p= 0,020
	LSD	GG – GT	p= 0,005
	BONFERRONI	GG – GT	p= 0,015
t_fn	LSD	GG – GT	p= 0,065
		GG – TT	p= 0,062
t_tot	LSD	GG – GT	p= 0,041
		GG – TT	p= 0,063
t_ls	LSD	GG – GT	p= 0,055

7.2.2. Zdrave ženske

7.2.2.1. TXNa (rs2776; g124960)

Preglednica LI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank (ITM – indeks telesne mase; BMDfn - MKG vratu stegenice; t_fn – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMDtot – MKG kolka; t_tot – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	X $\pm$ SD			SIGNIFIKANCA (p)
	CC	CT	TT	
starost	60,75 $\pm$ 10,505 N= 85	57,03 $\pm$ 9,209 N= 135	56,56 $\pm$ 9,222 N= 59	0,009
višina	161,40 $\pm$ 5,303 N=85	162,44 $\pm$ 6,274 N=135	161,47 $\pm$ 5,874 N=59	0,362
lnITM	3,308 $\pm$ 0,174 N=76	3,299 $\pm$ 0,191 N=123	3,273 $\pm$ 0,153 N=52	0,541
BMDfn	0,769 $\pm$ 0,121 N=83	0,771 $\pm$ 0,106 N=134	0,769 $\pm$ 0,115 N=59	0,991
t_fn	-0,929 $\pm$ 1,067	-0,903 $\pm$ 0,947	-0,939 $\pm$ 0,923	0,966

	N=84	N=134	N=59	
BMDtot	0,922±0,129 N=83	0,918±0,132 N=132	0,924±0,119 N=58	0,947
t_tot	-0,270±1,043 N=83	-0,335±0,963 N=132	-0,254±0,967 N=58	0,832
BMDls	0,974±0,140 N=84	0,96±0,133 N=135	0,973±0,128 N=59	0,749
pOC	13,706±5,577 N=35	12,840±4,775 N=55	13,150±6,598 N=28	0,767
sBALP	10,133±4,734 N=21	9,652±3,320 N=43	10,002±4,131 N=23	0,881
sOPG	4,779±1,860 N=36	4,349±1,147 N=57	4,510±1,077 N=29	0,346
CTX_1	3847,75±2027,39 N=16	3119,23±1645,58 N=43	3449,50±2177,72 N=20	0,389

Preglednica LII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank (RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B; t_ls – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls).

SPREMENLJIVKA	N	X±SD	SIGNIFIKANCA
mena	181	49,94±4,079	0,259
leta_mene	152	10,39±8,985	0,031
masa	314	71,90±13,041	0,479
RANKL	166	0,415±0,456	0,374
t_ls	313	-0,753±1,163	0,495

Preglednica LIII: Rezultati statistične analize spremenljivk testa v okviru ANCOVA, pri zdravih preiskovankah (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc).

Spremenljivka (kovariata: starost + lnITM)	Signifikanca (p)
BMDfn	0,296
BMDtot	0,158
BMDls	0,889

Preglednica LIV: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini zdravih preiskovank.

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
starost	SCHEFFE	CC – CT	p= 0,021
		CC – TT	p= 0,038
	LSD	CC – CT	p= 0,006
		CC – TT	p= 0,011
	BONFERRONI	CC – CT	p= 0,017
		CC – TT	p= 0,032

7.2.2.2. TXNb (rs2301241 ; a _ 795g)

Preglednica LV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank (ITM – indeks telesne mase; BMD_{fn} – MKG vratu stegenice; t_{fn} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMD_{fn}; BMD_{tot} – MKG kolka; t_{tot} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMD_{tot}; BMD_{ls} – MKG ledvenih vretenc; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	X $\pm$ SD			SIGNIFIKANCA (p)
	AA	AG	GG	
starost	59,85 $\pm$ 9,767 N= 81	57,36 $\pm$ 9,414 N= 163	57,37 $\pm$ 10,266 N= 60	0,141
višina	162,22 $\pm$ 5,187 N=81	161,83 $\pm$ 6,043 N=163	161,67 $\pm$ 6,482 N=60	0,837
lnITM	3,312 $\pm$ 0,191 N=70	3,288 $\pm$ 0,178 N=151	3,277 $\pm$ 0,166 N=54	0,508
BMD_{fn}	0,757 $\pm$ 0,112 N=81	0,776 $\pm$ 0,118 N=161	0,774 $\pm$ 0,104 N=60	0,474
t_{fn}	-0,985 $\pm$ 1,030 N=81	-0,871 $\pm$ 1,016 N=162	-0,914 $\pm$ 0,884 N=60	0,700
BMD_{tot}	0,910 $\pm$ 0,128 N=79	0,924 $\pm$ 0,134 N=161	0,923 $\pm$ 0,125 N=59	0,713
t_{tot}	-0,351 $\pm$ 1,034 N=79	-0,275 $\pm$ 1,014 N=161	-0,283 $\pm$ 0,989 N=59	0,856
BMD_{ls}	0,954 $\pm$ 0,120 N=81	0,990 $\pm$ 0,136 N=163	0,980 $\pm$ 0,141 N=59	0,141
pOC	14,333 $\pm$ 6,961 N=30	12,453 $\pm$ 4,940 N=74	14,696 $\pm$ 5,969 N=24	0,132
sBALP	10,467 $\pm$ 3,402 N=20	9,301 $\pm$ 3,725 N=53	10,395 $\pm$ 4,401 N=21	0,368
sOPG	4,433 $\pm$ 1,500 N=32	4,466 $\pm$ 1,423 N=75	4,598 $\pm$ 0,959 N=25	0,891
CTX₁	2823,39 $\pm$ 1859,95 N=18	3544,98 $\pm$ 2031,02 N=46	3628,05 $\pm$ 2024,64 N=20	0,371

Preglednica LVI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank (RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B; t_{ls} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMD_{ls}).

SPREMENLJIVKA	N=	X $\pm$ SD	SIGNIFIKANCA
mena	181	49,94 $\pm$ 4,079	0,135
leta_mene	152	10,39 $\pm$ 8,985	0,376
masa	314	71,90 $\pm$ 13,041	0,327
RANKL	166	0,415 $\pm$ 0,456	0,827
t_{ls}	313	-0,753 $\pm$ 1,163	0,470

Preglednica LVII: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri zdravih preiskovankah (*BMDfn* - MKG vratu stegenice; *BMDtot* – MKG kolka; *BMDls* – MKG ledvenih vretenc).

Spremenljivka (kovariata: starost + <i>lnITM</i>)	Signifikanca (<i>p</i>)
<i>BMDfn</i>	0,258
<i>BMDtot</i>	0,529
<i>BMDls</i>	0,313

Preglednica LVIII: Povzetek rezultatov statistične obdelave spremenljivk v okviru testa LSD Post Hoc, v skupini zdravih preiskovank (*BMDls* – MKG ledvenih vretenc; OC – osteokalcin).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (<i>p</i>)
starost	LSD	AA – AG	p= 0,059
<i>BMDls</i>	LSD	AA – GG	p= 0,048
<i>pOC</i>	LSD	AA – GG	p= 0,094

7.2.2.3. *TXNRD2* ((rs5748469 ; A66S (G > T))

Preglednica LIX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank (*ITM* – indeks telesne mase; *BMDfn* - MKG vratu stegenice; *t_{fn}* – t-vrednost, izračunana na podlagi *BMDfn*; *BMDtot* – MKG kolka; *t_{tot}* – t-vrednost, izračunana na podlagi *BMDtot*; *BMDls* – MKG ledvenih vretenc; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	X $\pm$ SD			SIGNIFIKANCA (<i>p</i>)
	GG	GT	TT	
starost	55,96 $\pm$ 9,980 N= 130	59,88 $\pm$ 10,325 N= 81	56,89 $\pm$ 8,036 N= 18	0,022
višina	161,70 $\pm$ 6,269 N=130	161,79 $\pm$ 5,656 N=81	162,72 $\pm$ 6,210 N=18	0,799
<i>lnITM</i>	3,293 $\pm$ 0,191 N=115	3,298 $\pm$ 0,180 N=77	3,244 $\pm$ 0,159 N=17	0,538
<i>BMDfn</i>	0,777 $\pm$ 0,120 N=130	0,771 $\pm$ 0,113 N=81	0,750 $\pm$ 0,131 N=17	0,654
<i>t_{fn}</i>	-0,821 $\pm$ 1,018 N=130	-0,936 $\pm$ 0,946 N=81	-1,225 $\pm$ 1,181 N=17	0,265
<i>BMDtot</i>	0,932 $\pm$ 0,143 N=126	0,914 $\pm$ 0,118 N=81	0,883 $\pm$ 0,160 N=17	0,313
<i>t_{tot}</i>	-0,205 $\pm$ 1,032 N=126	-0,353 $\pm$ 0,961 N=81	-0,642 $\pm$ 1,319 N=17	0,211
<i>BMDls</i>	0,980 $\pm$ 0,128 N=130	0,971 $\pm$ 0,123 N=80	0,976 $\pm$ 0,111 N=18	0,863
<i>pOC</i>	12,872 $\pm$ 5,940	13,815 $\pm$ 6,033	13,309 $\pm$ 5,157	0,786

	N=64	N=26	N=11	
sBALP	9,526±4,329 N=51	9,482±2,861 N=17	9,383±3,557 N=8	0,995
sOPG	4,077±1,103 N=68	4,843±1,465 N=26	4,736±0,927 N=11	0,012
CTX_1	3235,63±1995,35 N=46	3554,13±2354,64 N=15	3422,00±1606,54 N=6	0,866

Preglednica LX: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize zdravih preiskovank (RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B; t_ls – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls).

SPREMENLJIVKA	N=	$X \pm SD$	SIGNIFIKANCA
mena	181	49,94±4,079	0,650
leta_mene	152	10,39±8,985	0,421
masa	314	71,90±13,041	0,698
RANKL	166	0,415±0,456	0,937
t_ls	313	-0,753±1,163	0,911

Preglednica LXI: Rezultati statistične obdelave spremenljivk v okviru testa ANCOVA, zdravih preiskovank (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc; OPG - osteoprotegerin).

Spremenljivka (kovariata: starost + lnITM)	Signifikanca (p)
BMDfn	0,343
BMDtot	0,352
BMDls	0,941
sOPG	0,046

Preglednica LXII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini zdravih preiskovank (OPG – osteoprotegerin).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
Starost	SCHEFFE	GG – GT	p= 0,023
	LSD	GG – GT	p= 0,006
	BONFERRONI	GG – GT	p= 0,018
sOPG	SCHEFFE	GG – GT	p= 0,023
	LSD	GG – GT	p= 0,006
		GG – TT	p= 0,091
	BONFERRONI	GG – GT	p= 0,018

7.2.3. Ženske s potrjeno osteoporozo

7.2.3.1. TXNa (rs2776 ; g124960)

Preglednica LXIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo (ITM – indeks telesne mase; BMDfn - MKG vratu stegenice; t_fn – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMDtot – MKG kolka; t_tot – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB ; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	X $\pm$ SD			SIGNIFIKANCA (p)
	CC	CT	TT	
starost	62,19 $\pm$ 10,760 N= 73	63,84 $\pm$ 7,707 N= 107	66,85 $\pm$ 8,730 N= 46	0,024
mena	49,33 $\pm$ 3,756 N= 33	48,85 $\pm$ 4,912 N=41	49,55 $\pm$ 4,595 N=22	0,817
leta_mene	14,06 $\pm$ 8,074 N=17	15,26 $\pm$ 8,729 N=23	20,53 $\pm$ 14,192 N=15	0,179
višina	158,30 $\pm$ 6,651 N=73	158,90 $\pm$ 6,143 N=109	157,70 $\pm$ 5,660 N=47	0,527
ITM	26,509 $\pm$ 3,928 N=57	26,541 $\pm$ 4,069 N=91	26,148 $\pm$ 2,944 N=40	0,854
BMDfn	0,636 $\pm$ 0,089 N=68	0,622 $\pm$ 0,077 N=102	0,610 $\pm$ 0,081 N=45	0,227
t_fn	-2,147 $\pm$ 0,919 N=39	-2,421 $\pm$ 0,708 N=54	-2,515 $\pm$ 0,764 N=24	0,140
BMDtot	0,760 $\pm$ 1,07 N=68	0,760 $\pm$ 0,087 N=102	0,738 $\pm$ 0,103 N=44	0,384
t_tot	-1,384 $\pm$ 0,778 N=39	-1,568 $\pm$ 0,717 N=54	-1,714 $\pm$ 0,803 N=23	0,232
BMDls	0,727 $\pm$ 0,092 N=71	0,746 $\pm$ 0,083 N=108	0,759 $\pm$ 0,094 N=46	0,140
lnRANKL	-1,234 $\pm$ 0,813 N=14	-1,415 $\pm$ 0,133 N=24	-1,615 $\pm$ 0,976 N=10	0,666
pOC	24,271 $\pm$ 12,400 N=34	27,050 $\pm$ 12,125 N=61	25,814 $\pm$ 13,311 N=27	0,581
sBALP	12,093 $\pm$ 5,088 N=32	12,781 $\pm$ 5,182 N=53	13,323 $\pm$ 7,377 N=22	0,726
sOPG	6,301 $\pm$ 2,027 N=17	5,254 $\pm$ 1,666 N=33	6,080 $\pm$ 2,096 N=21	0,121
CTX_1	5089,67 $\pm$ 1595,76 N=3	3864,00 $\pm$ 1533,42 N=4	5150,00 $\pm$ N=1	0,568

Preglednica LXIV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo (t_{ls} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls).

SPREMENLJIVKA	N	X $\pm$ SD	SIGNIFIKANCA (p)
<i>masa</i>	258	65,74 $\pm$ 9,929	0,544
<i>t_{ls}</i>	148	-2,792 $\pm$ 0,849	0,567

Preglednica LXV: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc; OPG – osteoprotegerin).

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	Signifikanca (p)
<i>BMDfn</i>	0,218
<i>BMDtot</i>	0,501
<i>BMDls</i>	0,025
<i>sOPG</i>	0,154

Preglednica LXVI: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo (BMDfn – MKG vratu stegenice; t_{fn} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; t_{tot} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; OPG – osteoprotegerin).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
<i>starost</i>	SCHEFFE	CC – TT	p= 0,024
	LSD	CC – TT	p= 0,006
	BONFERRONI	CC – TT	p= 0,019
<i>leta mene</i>	LSD	CC – TT	p= 0,082
<i>BMDfn</i>	LSD	CC – TT	p= 0,092
<i>t_{fn}</i>	LSD	CC – TT	p= 0,077
<i>t_{tot}</i>	LSD	CC – TT	p= 0,099
<i>BMDls</i>	LSD	CC – TT	p= 0,058
<i>sOPG</i>	LSD	CC – CT	p= 0,068

7.2.3.2. TXNb (rs2301241 ; a _ 795g)

Preglednica LXVII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo (ITM – indeks telesne mase; BMDfn - MKG vratu stegenice; t_{fn} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMDtot – MKG kolka; t_{tot} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega

dejavnika κB ; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	X $\pm$ SD			SIGNIFIKANCA (p)
	AA	AG	GG	
<i>starost</i>	64,49 $\pm$ 8,169 N= 67	63,63 $\pm$ 10,346 N= 134	64,50 $\pm$ 7,282 N= 4	0,766
<i>mena</i>	48,63 $\pm$ 4,248 N=32	49,08 $\pm$ 4,573 N=61	50,00 $\pm$ 3,395 N=18	0,558
<i>leta_mene</i>	16,61 $\pm$ 8,431 N=18	18,78 $\pm$ 11,530 N=32	9,91 $\pm$ 7,816 N=11	0,050
<i>višina</i>	159,70 $\pm$ 6,038 N=68	158,26 $\pm$ 6,382 N=134	157,70 $\pm$ 6,052 N=50	0,172
<i>ITM</i>	26,778 $\pm$ 4,316 N=54	26,201 $\pm$ 3,706 N=105	26,330 $\pm$ 3,411 N=43	0,663
<i>BMDfn</i>	0,632 $\pm$ 0,066 N=66	0,619 $\pm$ 0,089 N=128	0,630 $\pm$ 0,085 N=44	0,517
<i>t_fn</i>	-2,350 $\pm$ 0,643 N=41	-2,388 $\pm$ 0,877 N=71	-2,099 $\pm$ 0,759 N=25	0,287
<i>BMDtot</i>	0,769 $\pm$ 0,080 N=66	0,742 $\pm$ 0,101 N=127	0,70 $\pm$ 0,107 N=44	0,035
<i>t_tot</i>	-1,574 $\pm$ 0,601 N=41	-1,631 $\pm$ 0,834 N=70	-1,182 $\pm$ 0,718 N=25	0,036
<i>BMDls</i>	0,744 $\pm$ 0,100 N=67	0,739 $\pm$ 0,086 N=133	0,748 $\pm$ 0,075 N=47	0,812
<i>lnRANKL</i>	-1,177 $\pm$ 1,030 N=16	-1,354 $\pm$ 1,104 N=26	-1,556 $\pm$ 0,792 N=11	0,642
<i>pOC</i>	25,96 $\pm$ 11,281 N=32	27,195 $\pm$ 12,224 N=67	22,304 $\pm$ 14,080 N=28	0,220
<i>sBALP</i>	12,766 $\pm$ 5392 N=29	12,666 $\pm$ 5,487 N=60	12,301 $\pm$ 6,559 N=21	0,956
<i>sOPG</i>	5,439 $\pm$ 1,937 N=17	5,775 $\pm$ 1,879 N=43	5,925 $\pm$ 1,935 N=14	0,754
<i>CTX_1</i>	3863,00 $\pm$ 2009,95 N=3	4446,75 $\pm$ 801,28 N=4	6499,00 $\pm$ N=1	0,350

Preglednica LXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo (t_{ls} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls).

SPREMENLJIVKA	N	X $\pm$ SD	SIGNIFIKANCA (p)
<i>masa</i>	258	65,74 $\pm$ 9,929	0,379
<i>t_ls</i>	148	-2,792 $\pm$ 0,849	0,228

Preglednica LXIX: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka, BMDls – MKG ledvenih vretenc).

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	Signifikanca (p)
BMDfn	0,704
BMDtot	0,049
BMDls	0,910

Preglednica LXX: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo (BMDtot – MKG kolka; t_tot – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; OC – osteokalcin).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
Leta mene	SCHEFFE	AG – GG	p= 0,050
	LSD	AA – GG	p= 0,089
		AG – GG	p= 0,015
	BONFERRONI	AG – GG	p= 0,045
višina	LSD	AA - GG	p= 0,086
BMDtot	SCHEFFE	GG – AG	p= 0,077
	LSD	AA – AG	p= 0,061
		AG – GG	p= 0,024
	BONFERRONI	AG – GG	p= 0,072
t_tot	SCHEFFE	AG – GG	p= 0,039
	LSD	AA – GG	p= 0,041
		AG – GG	p= 0,011
	BONFERRONI	AG – GG	p= 0,033
pOC	LSD	AG - GG	p= 0,083

7.2.3.3. TXNRD2 (rs5748469 ; A66S G > T))

Preglednica LXXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo (ITM – indeks telesne mase; BMDfn - MKG vratu stegenice; t_fn – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMDtot – MKG kolka; t_tot – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; CTX – C-terminalni telopeptid).

SPREMENLJIVKA	X $\pm$ SD			SIGNIFIKANCA (p)
	GG	GT	TT	
starost	63,00 $\pm$ 7,263 N= 105	64,35 $\pm$ 9,669 N= 66	63,78 $\pm$ 6,324 N= 23	0,563
mena	50,00 $\pm$ 3,897 N=33	48,42 $\pm$ 5,350 N=33	49,33 $\pm$ 2,640 N=12	0,358
leta_mene	11,00 $\pm$ 7,802	17,90 $\pm$ 9,121	17,00 $\pm$ 9,466	0,054

	N=17	N=21	N=6	
<i>višina</i>	159,29±6,599 N=109	158,44±6,397 N=66	158,65±5,867 N=23	0,683
<i>ITM</i>	26,536±3,625 N=93	26,319±3,86 N=54	26,512±4,999 N=17	0,946
<i>BMDfn</i>	0,630±0,080 N=101	0,624±0,90 N=62	0,630±0,067 N=21	0,883
<i>t_fn</i>	-2,285±0,764 N=42	-2,328±0,889 N=44	-2,089±0,643 N=13	0,646
<i>BMDtot</i>	0,760±0,101 N=101	0,761±0,090 N=62	0,764±0,122 N=20	0,985
<i>t_tot</i>	-1,429±0,774 N=42	-1,557±0,738 N=44	-1,321±0,858 N=12	0,570
<i>BMDls</i>	0,748±0,085 N=105	0,742±0,078 N=65	0,747±0,099 N=23	0,906
<i>lnRANKL</i>	-1,486±0,955 N=19	-1,241±0,919 N=13	-1,576±0,967 N=7	0,690
<i>ALP</i>	1,080±0,244 N=23	1,019±0,352 N=11	0,813±0,214 N=3	0,298
<i>pOC</i>	28,113±13,776 N=71	22,063±10,788 N=27	26,033±11,814 N=9	0,123
<i>sBALP</i>	12,487±6,321 N=60	11,888±4,201 N=24	10,668±6,297 N=8	0,685
<i>sOPG</i>	5,802±1,858 N=46	5,318±1,803 N=15	6,487±2,542 N=7	0,408
<i>CTX_1</i>	3366,33±1779,02 N=3	5144,00±1179,33 N=3	± N=0	0,223

Preglednica LXXII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk v okviru testa Kruskal-Wallis ter rezultati statistične analize preiskovank s potrjeno osteoporozo (*t_ls* – *t*-vrednost, izračunana na podlagi *BMDls*).

SPREMENLJIVKA	N	$\bar{X} \pm SD$	SIGNIFIKANCA
<i>masa</i>	258	65,74±9,929	0,492
<i>t_ls</i>	148	-2,792±0,849	0,981

Preglednica LXXIII: Rezultati statistične obdelave spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovankah s potrjeno osteoporozo (*BMDfn* - MKG vratu stegenice; *BMDtot* – MKG kolka; *BMDls* – MKG ledvenih vretenc; *OC* - osteokalcin).

Spremenljivka (kovariata: starost + <i>ITM</i>)	Signifikanca (p)
<i>BMDfn</i>	0,704
<i>BMDtot</i>	0,515
<i>BMDls</i>	0,846
<i>pOC</i>	0,077

Preglednica LXXIV: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovank s potrjeno osteoporozo (OC – osteokalcin).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
leta mene	SCHEFFE	GG – GT	p= 0,062
	LSD	GG – GT	p=0,019
	BONFERRONI	GG – GT	p=0,057
pOC	LSD	GG – GT	p= 0,041

7.2.4. Moška populacija

7.2.4.1. TXNa (rs2776 ; g124960)

Preglednica LXXV: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovancev (ITM – indeks telesne mase; BMD_{fn} – MKG vratu stegenice; t_{fn} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMD_{fn}; BMD_{tot} – MKG kolka; t_{tot} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMD_{tot}; BMD_{ls} – MKG ledvenih vretenc; t_{ls} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMD_{ls}; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B; OC – osteokalcin; OPG – osteoprotegerin).

SPREMENLJIVKA	X $\pm$ SD			SIGNIFIKANCA (p)
	CC	CT	TT	
starost	67,72 $\pm$ 5,005 N=32	69,02 $\pm$ 6,323 N=49	66,88 $\pm$ 5,999 N=17	0,367
višina	171,81 $\pm$ 5,761 N=32	170,53 $\pm$ 5,719 N=49	172,47 $\pm$ 6,644 N=17	0,421
masa	83,91 $\pm$ 13,834 N=32	80,92 $\pm$ 14,117 N=49	83,06 $\pm$ 8,407 N=17	0,590
ITM	28,350 $\pm$ 3,941 N=32	27,778 $\pm$ 4,270 N=49	27,924 $\pm$ 2,360 N=17	0,810
BMD _{fn}	0,809 $\pm$ 0,138 N=30	0,813 $\pm$ 0,146 N=42	0,812 $\pm$ 0,160 N=14	0,993
t _{fn}	-1,205 $\pm$ 1,173 N=31	-1,265 $\pm$ 1,132 N=42	-1,243 $\pm$ 1,154 N=14	0,976
BMD _{tot}	1,058 $\pm$ 0,174 N=31	1,003 $\pm$ 0,143 N=42	1,011 $\pm$ 0,176 N=14	0,336
t _{tot}	-0,213 $\pm$ 1,085 N=31	-0,349 $\pm$ 1,036 N=42	-0,251 $\pm$ 1,195 N=14	0,861
BMD _{ls}	1,063 $\pm$ 0,174 N=32	1,047 $\pm$ 0,165 N=49	1,082 $\pm$ 0,212 N=17	0,764
t _{ls}	-0,401 $\pm$ 1,553 N=32	-0,552 $\pm$ 1,410 N=49	-0,218 $\pm$ 1,738 N=17	0,723
RANKL	0,167 $\pm$ 0,137	0,189 $\pm$ 0,127	0,175 $\pm$ 0,126	0,947

	N=6	N=9	N=4	
pOC	9,083±,985 N=6	10,811±3,799 N=9	7,225±4,419 N=4	0,559
sOPG	5,441±1,777 N=6	5,216±0,731 N=9	7,058±2,389 N=4	0,152

Preglednica LXXVI: Rezultati statistične obdelave spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovancih (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc; OPG - osteoprotegerin).

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	Signifikanca (p)
BMDfn	0,977
BMDtot	0,296
BMDls	0,759
sOPG	0,157

Preglednica LXXVII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testa LSD Post Hoc, v skupini preiskovancev (OPG – osteoprotegerin).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
sOPG	LSD	CT – TT	p= 0,062

7.2.4.2. TXNb (rs2301241 ; a _ 795g)

Preglednica LXXVIII: Povprečne vrednosti (srednja vrednost ± SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovancev (ITM – indeks telesne mase; BMDfn - MKG vratu stegenice; t_fn – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMDtot – MKG kolka; t_tot – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; t_ls – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB ; OC – osteokalcin; OPG – osteoprotegerin).

SPREMENLJIVKA	X±SD			SIGNIFIKANCA (p)
	AA	AG	GG	
starost	68,53±6,646 N=45	67,80±5,852 N=46	67,50±4,763 N=20	0,766
višina	171,49±6,904 N=45	170,87±5,005 N=46	171,10±4,778 N=20	0,787
masa	83,58±13,710 N=45	81,04±11,847 N=46	79,10±13,191 N=20	0,391
ITM	28,349±3,830 N=45	27,737±3,719 N=46	26,945±3,685 N=20	0,372
BMDfn	0,837±0,130 N=44	0,813±0,158 N=37	0,715±0,096 N=17	0,009
t_fn	-1,038±1,013	-1,208±1,284	-1,806±0,806	0,052

	N=45	N=37	N=17	
BMDtot	1,035±0,130 N=45	1,042±0,177 N=37	0,932±0,144 N=17	0,035
t_tot	-0,142±0,941 N=45	-0,237±1,153 N=37	-0,708±1,020 N=17	0,159
BMDls	1,100±0,184 N=45	1,059±0,172 N=46	0,943±0,105 N=20	0,003
t_ls	-0,153±1,614 N=45	-0,364±1,496 N=46	-1,311±0,932 N=20	0,014
RANKL	0,192±0,144 N=13	0,167±0,082 N=6	0,200±0,000 N=3	0,894
pOC	8,700±4,952 N=13	9,733±4,474 N=6	14,767±8,295 N=3	0,227
sOPG	6,096±1,793 N=13	4,787±0,896 N=6	4,403±0,903 N=3	0,116

Preglednica LXXIX: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovancih (BMDfn - MKG vratu stegenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc; pOC – osteokalcin; sOPG - osteoprotegerin).

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	Signifikanca (p)
BMDfn	0,010
BMDtot	0,040
BMDls	0,009
pOC	0,281
sOPG	0,338

Preglednica LXXX: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testov Post Hoc (Scheffe, LSD, Bonferroni), v skupini preiskovancev (BMDfn – MKG vratu stegenice; t_fn – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDfn; BMD tot – MKG kolka; t_tot – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot; BMDls – MKG ledvenih vretenc; t_ls – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDls; OC – osteokalcin; OPG - osteoprotegerin).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
BMDfn	SCHEFFE	GG – AA	p= 0,009
		GG – AG	p= 0,054
	LSD	GG – AA	p= 0,002
		GG – AG	p= 0,016
	BONFERRONI	GG – AA	p= 0,007
		GG – AG	p= 0,048
t_fn	SCHEFFE	AA – GG	p= 0,052
		AA – GG	p= 0,015
	LSD	AA – GG	p= 0,065
		AG – GG	p= 0,065
	BONFERRONI	AA – GG	p= 0,046
		AA – GG	p= 0,046
BMDtot	SCHEFFE	GG – AA	p= 0,062
		GG – AG	p= 0,052
	LSD	GG – AA	p= 0,019

		GG – AG	p= 0,015
	BONFERRONI	GG – AA	p= 0,056
		GG – AG	p= 0,046
<i>t_tot</i>	LSD	AA – GG	p= 0,059
<i>BMDls</i>	SCHEFFE	GG – AA	p= 0,003
		GG – AG	p= 0,035
	LSD	GG – AA	p= 0,001
		GG – AG	p= 0,011
	BONFERRONI	GG – AA	p= 0,002
		GG – AG	p= 0,033
<i>t_ls</i>	SCHEFFE	GG – AA	p= 0,016
		GG – AG	p= 0,059
	LSD	GG – AA	p= 0,004
		GG – AG	p= 0,018
	BONFERRONI	GG – AA	p= 0,012
		GG – AG	p= 0,053
<i>pOC</i>	LSD	GG – AA	p= 0,089
<i>sOPG</i>	LSD	AA – AG	p= 0,098
		AA – GG	p= 0,099

7.2.4.3. TXNRD2 (rs5748469 ; A66S (G > T))

Preglednica LXXXI: Povprečne vrednosti (srednja vrednost $\pm$ SD) spremenljivk v okviru testa ANOVA ter rezultati statistične analize preiskovancev (ITM – indeks telesne mase; *BMDfn* - MKG vratu stegenice; *t_fn* – t-vrednost, izračunana na podlagi *BMDfn*; *BMDtot* – MKG kolka; *t_tot* – t-vrednost, izračunana na podlagi *BMDtot*; *BMDls* – MKG ledvenih vretenc; *t_ls* – t-vrednost, izračunana na podlagi *BMDls*; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B; OC – osteokalcin; OPG – osteoprotegerin).

SPREMENLJIVKA	<i>X$\pm$SD</i>			SIGNIFIKANCA (p)
	GG	GT	TT	
<i>starost</i>	67,53 $\pm$ 6,128 N=38	67,19 $\pm$ 5,759 N=31	68,29 $\pm$ 6,047 N=7	0,905
<i>višina</i>	171,76 $\pm$ 6,223 N=38	170,23 $\pm$ 5,084 N=31	172,00 $\pm$ 2,449 N=7	0,478
<i>masa</i>	83,53 $\pm$ 13,94 N=38	78,71 $\pm$ 12,378 N=31	85,14 $\pm$ 11,231 N=7	0,249
<i>ITM</i>	28,295 $\pm$ 438,308 N=38	27,094 $\pm$ 3,647 N=31	28,814 $\pm$ 4,028 N=7	0,380
<i>BMDfn</i>	0,8136 $\pm$ 0,153 N=33	0,781 $\pm$ 0,128 N=27	0,876 $\pm$ 0,182 N=6	0,333
<i>t_fn</i>	-1,279 $\pm$ 1,142 N=33	-1,335 $\pm$ 1,039 N=27	-0,825 $\pm$ 1,583 N=6	0,611
<i>BMDtot</i>	1,048 $\pm$ 0,178 N=33	0,980 $\pm$ 0,113 N=27	1,115 $\pm$ 0,186 N=6	0,089
<i>t_tot</i>	-0,247 $\pm$ 1,113 N=33	-0,414 $\pm$ 0,863 N=27	0,402 $\pm$ 1,417 N=6	0,233
<i>BMDls</i>	1,041 $\pm$ 0,174	1,008 $\pm$ 0,154	1,021 $\pm$ 0,125	0,705

	N=38	N=31	N=7	
t_{ls}	-0,616±1,446 N=38	-0,791±1,384 N=31	-0,811±0,972 N=7	0,855
RANKL	0,167±0,123 N=12	0,200±0,141 N=5	0,200± N=1	0,875
pOC	9,667±5,254 N=12	9,340±3,225 N=5	9,200± N=1	0,989
sOPG	5,878±1,680 N=12	4,552±0,084 N=5	5,400± N=1	0,286

Preglednica LXXXII: Rezultati statistične analize spremenljivk v okviru testa ANCOVA, pri preiskovancih (BMDfn - MKG vratu stegnenice; BMDtot – MKG kolka; BMDls – MKG ledvenih vretenc).

Spremenljivka (kovariata: starost + ITM)	Signifikanca (p)
BMDfn	0,685
BMDtot	0,210
BMDls	0,863

Preglednica LXXXIII: Povzetek rezultatov statistične analize spremenljivk v okviru testa LSD Post Hoc, v skupini preiskovancev (BMDtot – MKG kolka; t_{tot} – t-vrednost, izračunana na podlagi BMDtot).

Spremenljivka	POST HOC test	Genotip	Signifikanca (p)
BMD tot	LSD	GG – GT	p= 0,096
		GT – TT	p= 0,058
t_{tot}	LSD	TT – GT	p= 0,089