

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ ZADRAVEC

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TOMAŽ ZADRAVEC

**VPLIV POLIMORFIZMOV V174A IN N130D V GENU ZA OATP1B1 NA
MINERALNO KOSTNO GOSTOTO**

**INFLUENCE OF POLIMORPHISMS V174A AND N130D IN GENE OF OATP1B1
ON BONE MINERAL DENSITY**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljal na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. Meritve mineralne kostne gostote so opravili na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in Mariboru ter na Kliniki za travmatologijo v Splošni bolnišnici Celje. Meritve koncentracij biokemijskih kazalcev kostne premene so opravili na Kliniki za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek, mag. farm. za izčrpno uvajanje v laboratorijsko delo, koristne nasvete pri praktičnem in pisnem delu, zaupanje pri samostojnem delu in pomoč pri vseh nastalih težavah. Zahvala gre tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo za pomoč pri laboratorijskem delu.

Posebno zahvalo posvečam tudi svoji družini, še posebej očetu in mami, ki sta mi ta študij omogočila ter me spodbujala vseh šest let, tako na finančnem, kot na čustvenem področju. Brez njiju ta pot ne bi bila dosegljiva. Posebna zahvala gre tudi sestri Tini, ki je diplomsko delo lektorirala. Zahvaljujem se puncu Kseniji, ki me je spodbujala skozi celoten študij in mi vlivala moč tudi v tistih trenutkih, ko sem mislil, da tega cilja ne bom dosegel.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	I
POVZETEK	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
1 UVOD.....	1
1.1 ZGRADBA KOSTI.....	1
1.2 KOSTNA PREMENA.....	2
1.2.1 ESTROGENI IN KOSTI.....	4
1.3 OSTEOPOROZA	6
1.3.1 ETIOPATOGENEZA OSTEOPOROZE	7
1.3.2 DEJAVNIKI TVEGANJA	7
1.3.3 RAZDELITEV OSTEOPOROZE.....	8
1.3.4 DIAGNOSTIKA OSTEOPOROZE	9
1.3.5 ZDRAVLJENJE OSTOPOROZE.....	11
1.4 ORGANSKI ANIONIŠKI PRENAŠALNI PROTEIN 1B1 (OATP1B1).....	13
1.4.1 GEN ZA OATP1B1	13
1.4.2 POLIMORFIZMA A388G (N130D) IN T521C (V174A).....	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 OPIS PREISKOVANCEV	17
3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN DNA VZORCEV	18
3.2.1 MATERIALI IN OPREMA	18
3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR).....	19

3.3.1	KASP genotipizacija	20
3.3.2	PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI IN IZVEDBA PCR REAKCIJE	22
3.3.3	MATERIALI IN OPREMA	24
3.4	STATISTIČNE METODE	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1	MODIFIKACIJA METODE IN REZULTATI GENOTIPIZACIJE	26
4.2	POGOSTOST POJAVLJANJA POLIMORFIZMOV N130D (A388G) IN V174A (T521C) PRI OATP1B1	27
4.3	DOLOČANJE HAPLOTIPOV	28
4.4	UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV A388G IN T521C TER NJUNIH HAPLOTIPOV V GENU ZA OATP1B1 Z MKG IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE	30
4.4.1	POMENOPAVZNE PREISKOVANKE	32
4.4.1.1	ZDRAVE POMENOPAVZNE PREISKOVANKE	36
4.4.1.2	OSTEOPOROZNE POMENOPAVZNE PREISKOVANKE	40
4.4.2	PREISKOVANKE, ZDRAVLJENE Z ALENDRONATOM	44
4.4.3	PREMENOPAVZNE PREISKOVANKE	47
4.4.4	MOŠKI PREISKOVANCI	51
4.4.5	PREISKOVANKE Z ZLOMOM KOSTI	53
4.4.6	POVZETEK STATISTIČNO ZNAČILNIH REZULTATOV	54
5	SKLEP	55
6	LITERATURA	57

POVZETEK

Organski anionski prenašalec 1B1 (OATP1B1) je pomemben prenašalni protein v jetrih, ki skrbi za prenos številnih endogenih in eksogenih snovi iz krvi v jetra. Med njimi sta estron-3-sulfat in 17β -estradiol-D-glukuronid. Polimorfizem T521C (V174A) sam in v kombinaciji s polimorfizmom A388G (N130D) v genu za OATP1B1 zmanjša transportno funkcijo le-tega. To ima za posledico povišano plazemsko koncentracijo estron sulfata in ostalih substratov v krvi. Ker je estron sulfat pomemben predhodnik estrogenov lokalno v kosteh, bi lahko povišana plazemska koncentracija le-tega ugodno vplivala na mineralno kostno gostoto (MKG) in s tem zmanjšala tveganje za nastanek osteoporoze. V naši raziskavi smo zato želeli ugotoviti, ali obstaja povezava med polimorfizmi A388G in T521C ter MKG in biokemijskimi kazalci kostne premene.

V raziskavo smo vključili 791 preiskovancev, ki so jim izmerili MKG ledvenih vretenc, vratu stegenice in kolka ter koncentracije biokemijskih kazalcev kostne premene. Razdelili smo jih v skupine glede na spol, menopavzni status in prisotnost osteoporoze. S KASP genotipizacijskim sistemom smo vzorcem določili genotipe za vsak polimorfizem in s statistično analizo preverili njihov vpliv na MKG in biokemijske kazalce kostne premene. Za celotno skupino preiskovancev smo ugotovili naslednje frekvence mutiranega alela: 44,3 % za polimorfizem A388G in 20,3 % za polimorfizem T521C. Pri pomenopavznih preiskovankah smo ugotovili vpliv haplotipa *1b na zvišanje koncentracije kostne alkalne fosfataze (BALP), kazalca kostne tvorbe ($p=0,037$). Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah smo ugotovili vpliv haplotipa *1b na zvišanje MKG ledvenih vretenc ($p=0,008$) ter vpliv polimorfizma A388G ter haplotipov *1a in *1b na zvišanje koncentracije BALP ($p_{A388G}=0,007$; $p_{hapl*1a}=0,031$; $p_{hapl*1b}=0,002$). Pri premenopavznih preiskovankah smo ugotovili vpliv haplotipa *1b na znižanje MKG vratu stegenice ($p=0,043$) in vpliv polimorfizma T521C in haplotipa *15 na znižanje koncentracije BALP ($p_{T521C}=0,029$; $p_{hapl*15}=0,029$). Pri preiskovankah, eno leto zdravljenih z alendronatom, smo ugotovili vpliv polimorfizma A388G ter haplotipov *1a in *15 na znižanje koncentracije deoksipiridinolina, kazalca razgradnje kosti ($p_{A388G}=0,013$; $p_{hapl*1a}=0,038$; $p_{hapl*15}=0,028$).

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da imata polimorfizma A388G in T521C ter njuni haplotipi v genu za OATP1B1 določen vpliv na MKG in biokemijske kazalce kostne premene. Za potrditev rezultatov, bi bilo potrebno raziskavo izvesti še na večjem številu preiskovancev.

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat
ACE	angiotenzin konvertaza
BALP	kostna alkalna fosfataza
BMP	kostni morfogenski protein
BRU	enota kostne remodelacije
CTX	C-terminalni telopeptid kolagena tipa 1
DNA	deoksi ribonukleinska kislina
DXA	dvojno energijska rentgenska absorpcijometrija
FGF	rastni dejavnik fibroblastov
IGF	inzulinu podoben rastni dejavnik
IL	interlevkin
ITM	indeks telesne mase
LST	jetrno specifični prenašalec
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
MKG	mineralna kostna gostota
OATP	organski anionski prenašalec
OC	osteokalcin
OPG	osteoprotegerin
PDGF	iz trombocitov izvirajoči rastni dejavnik
PTH	parathormon
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B
<i>SLCO1B1</i>	gen za organski anionski prenašalec 1B1
TGF	transformirajoči rastni dejavnik
TNF	dejavnik tumorske nekroze
TRAP	na tartrat odporna kislina fosfataza

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba kosti.....	1
Slika 2: Faze kostne premene	3
Slika 3: Metabolizem estrogenov	5
Slika 4: Gobasto kostno tkivo pri zdravi in osteoporozni kosti.....	6
Slika 5: Polimorfizmi v OATP1B1.	14
Slika 6: Shematski prikaz cikla verižne reakcije s polimerazo	19
Slika 7: Oligonukleotidni začetniki	21
Slika 8: Primer prikaza rezultatov genotipizacije.....	26

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: T-vrednosti po WHO.....	10
Preglednica II: Biokemijski kazalci kostne premene	10
Preglednica III: Haplotipi za polimorfizma A388G in T521C.....	15
Preglednica IV: Valovne dolžine ekscitacije in emisije v nm za VIC in FAM	22
Preglednica V: Volumni reagentov za en vzorec in skupno število vzorcev	23
Preglednica VI: Pogoji za izvedbo PCR-reakcije – temperatura in čas trajanja posamezne faze.....	24
Preglednica VII: Frekvence genotipov za polimorfizem A388G v posameznih skupinah .	27
Preglednica VIII: Frekvence genotipov za polimorfizem T521C v posameznih skupinah.	28
Preglednica IX: Haplotipi polimorfizmov A388G in T521C in njihove frekvence n (%)..	29
Preglednica X: Parametri vezavnega neravnovesja.....	30
Preglednica XI: Srednje vrednosti in standardne deviacije izmerjenih parametrov.....	31
Preglednica XII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem A388G.....	32
Preglednica XIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem T521C.....	33
Preglednica XIV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za haplotip *1a.....	34
Preglednica XV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za haplotip *1b.	34
Preglednica XVI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za haplotip *15.	35

Preglednica XVII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem A388G.	36
Preglednica XVIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem T521C.	37
Preglednica XIX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za haplotip *1a.	38
Preglednica XX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za haplotip *1b.	38
Preglednica XXI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za haplotip *15.	39
Preglednica XXII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem A388G.	40
Preglednica XXIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem T521C.	41
Preglednica XXIV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za haplotip *1a.	42
Preglednica XXV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za haplotip *1b.	42
Preglednica XXVI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za haplotip *15.	43

Preglednica XXVII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za polimorfizem A388G.....	44
Preglednica XXVIII Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za polimorfizem T521C.	45
Preglednica XXIX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za haplotip *1a.	45
Preglednica XXX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za haplotip *1b.	46
Preglednica XXXI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za haplotip *15.	46
Preglednica XXXII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem A388G.	47
Preglednica XXXIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem T521C.	48
Preglednica XXXIV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za haplotip *1a.	49
Preglednica XXXV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za haplotip *1b.	49
Preglednica XXXVI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za haplotip *15.	50

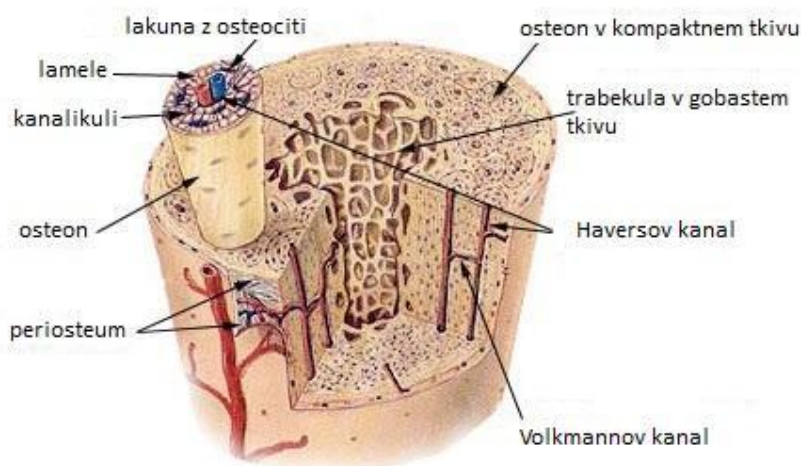
Preglednica XXXVII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških za polimorfizma A388G in T521C.	51
Preglednica XXXVIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških za haplotip *1a.	52
Preglednica XXXIX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških za haplotip *1b.....	52
Preglednica XL: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških za haplotip *15.....	52
Preglednica XLI: Rezultati χ^2 -testa (p-vrednosti) med osteoporoznimi preiskovankami z zlomom kolka in s posamezno skupino preiskovank za polimorfizma A388G in T521C ter njune haplotipe.	53
Preglednica XLII: Združeni signifikantni rezultati.	54

1 UVOD

Kosti predstavljajo ogrodje našega telesa. Človeško telo sestavlja 206 kosti, katerih naloge so varovanje notranjih organov pred poškodbami, nošenje bremena telesa in skrb, da telo ohranja svojo držo. Kosti imajo tudi pomembno nalogo skladiščenja kalcija, fosfatov, magnezija in natrija. V kosteh se nahajata rdeči in rumeni kostni mozeg, v katerih nastajajo krvne celice (1, 2).

1.1 ZGRADBA KOSTI

Kosti so zgrajene iz dveh slojev. Zunanja plast z gosto strukturo se imenuje kompaktno kostno tkivo (*substantia compacta*). Najmočnejše je izraženo v dolgih cevastih kosteh. Tam tvori votel valj, ki ga imenujemo mozgovna votlina. V njej se nahaja rumeni kostni mozeg. Notranjo plast predstavlja fina konstrukcija iz kostnih letvic, imenovana gobasto kostno tkivo (*substantia spongiosa*). Prostorji med letvicami so zapolnjeni z rdečim kostnim mozgom. Kostne celice v gobastem tkivu so tesno povezane s celicami kostnega mozga in nenehno komunicirajo med seboj. Vzdolž kompaktnega kostnega tkiva potekajo žile v posebnih kanalčkih, ki jih imenujemo Haversovi kanalčki. Na zunanji strani je kost prevlečena s pokostnico oz. s periosteumom (1). (Slika 1)



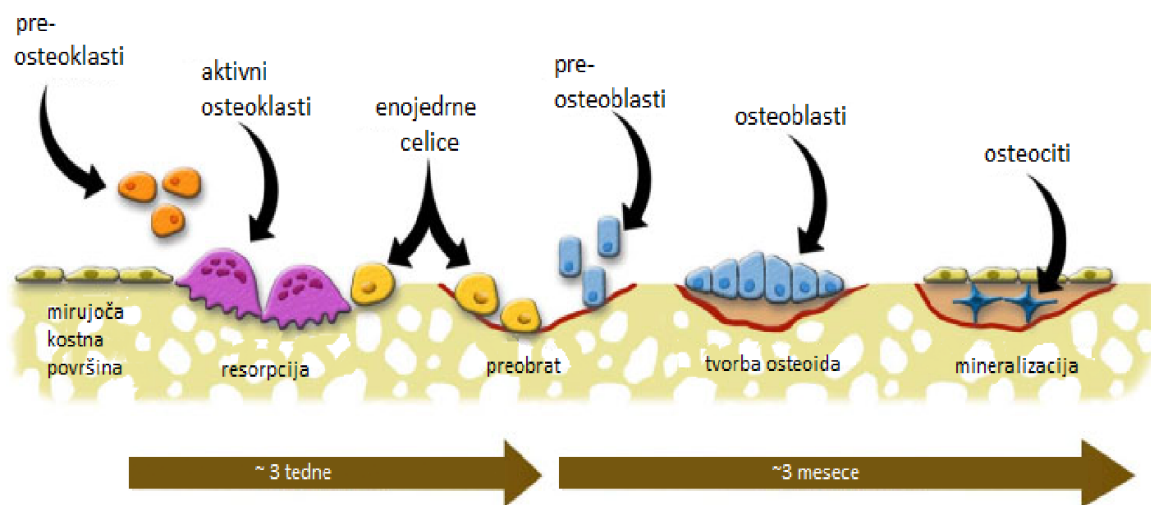
Slika 1: Zgradba kosti (prirejeno po (3))

Iz biokemičnega stališča so kosti sestavljene iz organskega in anorganskega dela. **Organski del** predstavljajo beljakovine, mukopolisaharidi in kostne celice. Med beljakovinami je najbolj pomemben kolagen tipa I (95 % vseh beljakovin). Kostne celice so osteoblasti, osteoklasti in osteociti (2). Osteoblasti nastanejo z diferenciacijo iz mezenhimskih celic ali celic strome kostnega mozga. Mezenhimske celice so pluripotente, saj se lahko razen v osteoblaste razvijejo tudi v adipocite, mozgovne podporne celice in verjetno tudi v fibroblaste, mišične celice, hrustančne celice (4). Osteoblasti sintetizirajo beljakovinski del kosti ter sodelujejo pri mineralizaciji kosti. Uravnavajo delovanje osteoklastov. Izločajo citokine, predvsem interlevkin-6 in interlevkin-11, ki so nujno potrebni za dozorevanje osteoklastov (2). Ko osteoblasti končajo cikel izgradnje kosti, se lahko pretvorijo v mirujoče osteoblaste (ang. bone lining cells), ki se nahajajo na površini kosti, iz njih lahko nastanejo osteociti ali pa propadejo (4). Osteoklasti so večjedrne celice, ki so odgovorne za resorpcijo kosti. Nastanejo iz hematopoetskih matičnih celic. Njihova razvojna pot je podobna kot pri makrofagih in dendritičnih celicah (5). Osteociti so stari osteoblasti, ki se vgradijo v kostnino ali pa se nahajajo na površini kosti. Imajo izrastke, s katerimi se povežejo med seboj in s površino kosti. Omogočajo prenos dražljajev s površine v kostnino in hitro sproščanje kalcija. **Anorganski del** kosti sestavljajo minerali, med katerimi sta najpomembnejša kalcij in fosfor, zasledimo pa tudi magnezij, natrij, citrate, fluor in druge. Kostni so glavno skladišče za kalcij, saj se v njih nahaja kar 99 % vsega kalcija v telesu v obliki kalcijevih fosfatov. Kalcijev fosfat se v kosti nahaja v dveh oblikah: kot amorfen kalcijev fosfat in kot kristali kalcijevega hidroksiapatita. V amorfnem kalcijevem fosfatu je kalcij labilno vezan in se izmenjuje s kalcijem v telesnih tekočinah (homeostaza kalcija). V kristalih hidroksiapatita je kalcij vezan stabilno (2).

1.2 KOSTNA PREMENA

Kostna premena je proces razgradnje in izgradnje kosti, ki poteka stalno in skozi vse življenje. Osnovni namen kostne premene je ohranjanje strukturne integritete kosti in presnovna funkcija (homeostaza kalcija in fosfatov). Proces razgradnje in izgradnje kosti poteka v t.i. enotah kostne premene (BRU). Normalno je v telesu aktivnih 2 do 5 milijonov

BRU. Na leto se tako obnovi 10 % kosti v telesu. Kostna premena v posamezni BRU poteka 120 dni in sicer v več fazah (Slika 2):



Slika 2: Faze kostne premene: faza aktivacije, faza resorpcije, faza preobrata, faza tvorbe osteoida in faza mirovanja (prirejeno po (6))

Resorpcija kosti poteče v približno treh tednih, tvorba osteoida in mineralizacija pa trajata več mesecev. Kostno premeno uravnava dejavniki, ki so lahko sistemski ali lokalni. Sistemsko uravnavanje kostne premene poteka preko hormonov, kot so parathormon, vitamin D, tiroksin, estrogen, testosteron, glukokortikoidi. Lokalni dejavniki so: interleukini (IL) 1, 4, 6, 11, 13 in 18, dejavnik tumorske nekroze (TNF), fibroblastni rastni dejavnik (FGF), makrofagne kolonije spodbujajoči dejavnik (M-CSF), parathormonu soroden protein (PTHrP), iz trombocitov izvirajoči rastni dejavnik (PDGF), kostni morfogeni protein (BMP), inzulinu podoben rastni dejavnik (IGF) I in II, ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANKL), osteoprotegerin (OPG) (4).

Sistem RANK/RANKL/OPG

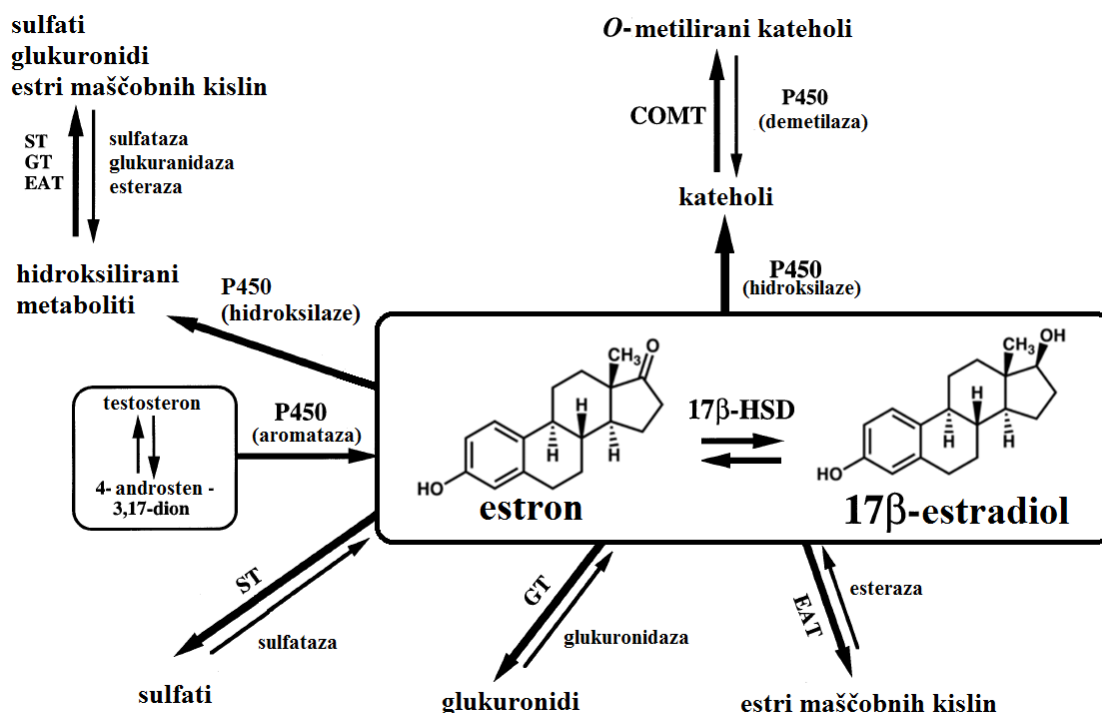
Je pomemben citokinski sistem, ki uravnava kostno razgradnjo. OPG izhaja iz TNF receptorske družine. Proizvajajo ga osteoblasti. Zavira diferenciacijo osteoklastov iz prekursorskih celic in s tem kostno resorpcijo. RANKL (imenovan tudi ligand OPG – OPGL) je predstavnik TNF-družine in spodbuja dozorevanje in preživetje osteoklastov – osteoklastogenezo. Proizvajajo ga osteoblasti in aktivirani T-limfociti. Veže se na receptor RANK, ki se nahaja na površini osteoklastov, dendritskih celic, celic gladkih mišic in

endotelnih celic. OPG je fiziološki zaviralec RANKL. Učinke OPG in RANKL lahko stimulirajo ali zavirajo številni citokini in hormoni (7):

- TGF- β (transformirajoči rastni dejavnik β) – poveča proizvodnjo OPG
- PTH – poveča proizvodnjo RANKL in zmanjša proizvodnjo OPG
- vitamin D₃ – poveča proizvodnjo RANKL
- glukokortikoidi – povečajo proizvodnjo RANKL in zmanjšajo proizvodnjo OPG
- estrogeni – povečajo proizvodnjo OPG

1.2.1 ESTROGENI IN KOSTI

Estrogeni so pomembni hormoni, ki sodelujejo pri spolnem razvoju ženske. Vlogo imajo tudi v možganih, jetrih, koži, laseh, adipocitih, imunskem sistemu in kosteh (8). Poznamo več oblik estrogenov: estron, estradiol, estriol. Med temi je najbolj učinkovit estradiol. Estriol postane pomemben med nosečnostjo, ko se njegova sinteza močno poveča. Estrogeni nastajajo predvsem v jajčnikih in placenti, nekaj pa tudi v testisih, skorji nadledvične žleze in lokalno v nekaterih tkivih. Sinteza estrogenov poteka iz androstendiona in testosterona s pomočjo encima aromataze (9). Pri tem nastane iz androstendiona estron, iz testosterona pa estradiol. Estrogeni se iz telesa izločajo z metabolno pretvorbo v neaktivne ali manj aktivne vodotopne metabolite, ki se izločijo z urinom in/ali s fecesom. Metabolizirajo se s hidroksilacijo na različnih mestih steroidnega skeleta in s konjugacijami (glukuronizacija in sulfatiranje) (slika 3). Estradiol in hidroksilirani metaboliti se lahko tudi zaestrijo z maščobnimi kislinami. Hidroksilacija poteka s pomočjo encimov družine citokrom P450. 2- in 4-hidroksilirani kateholi metabolitov estrogenov se lahko O-metilirajo z katehol-O-metiltransferazo. Estri maščobnih kislin in konjugirani estrogeni se lahko tudi hidrolizirajo do prostih estrogenov s pomočjo ustreznih encimov (esteraza, β -glukuronidaza, sulfataza) (10). Estron-3-sulfat, ki je v bistvu metabolni produkt estrona, hkrati predstavlja tudi skladišče estrogenov, saj ima dolgo razpolovno dobo in se iz njega s pomočjo steroid sulfataze lahko ponovno sprosti estron. Ostali konjugati niso tako pomembni, saj se hitreje izločijo iz telesa (11).



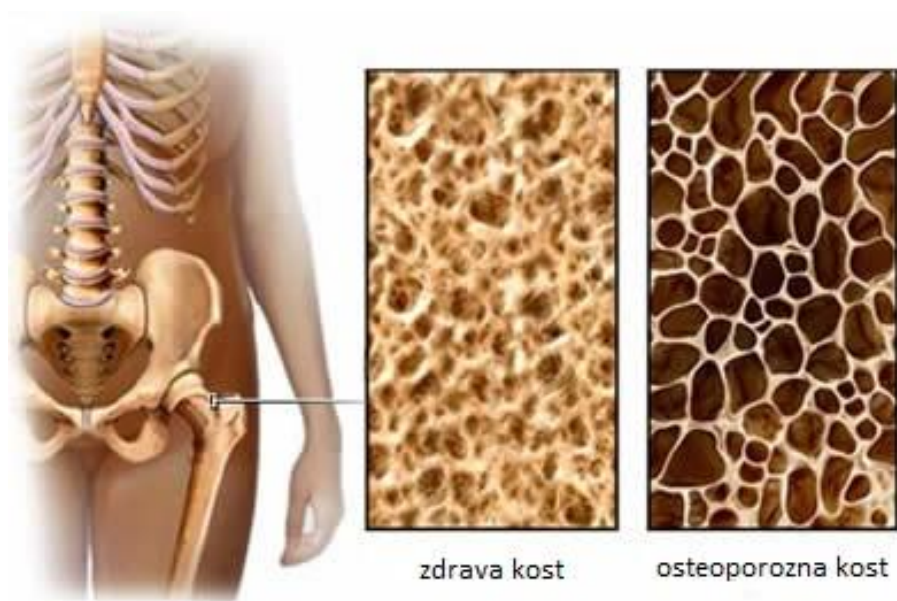
Slika 3: Metabolizem estrogenov (10) (ST – sulfotransferaza; GT – glukuronoziltransferaza; EAT – estrogen aciltransferaza; COMT – katehol-O-metil transferaza; 17β-HSD – hidrosisteroid dehidrogenaza)

Estrogeni delujejo tako, da se vežejo na estrogenski receptor (ER) v citoplazmi celice. Dimer kompleksa ER-estrogen potuje iz citoplazme v jedro celice, kjer se veže na določeno mesto na DNA in povzroči prepisovanje tarčnih genov. Poznana sta dva tipa estrogenskih receptorjev: ER α in ER β , vendar naj bi bil v kosteh pomembnejši ER α (12). Estrogeni so eni najpomembnejših sistemskih hormonov, ki vzdržujejo normalno kostno premeno. To se najbolj kaže pri ženskah po menopavzi ali po odstranitvi jajčnikov, ko se nivo estrogenov v telesu zniža in se posledično izguba kostne mase poveča. Tako so Slemenda in sodelavci v študiji na 231 pre- in pomenopavznih preiskovankah določili srednje vrednosti serumskih koncentracij estrona in estradiola. Za estron so določili $47,0 \pm 14,6$ pg/ml pri pre- in $31,8 \pm 7,8$ pg/ml pri pomenopavznih preiskovankah, za estradiol pa $47,5 \pm 18,7$ pg/ml pri pre- in $20,0 \pm 4,8$ pg/ml pri pomenopavznih preiskovankah (13). Estrogeni zmanjšajo tako razgradnjo kot tudi tvorbo kosti, vendar je tvorba manj izrazito zmanjšana. Na kosti delujejo posredno preko spodbujanja oziroma zaviranja nekaterih citokinov, ki vplivajo na razgradnjo ali tvorbo kosti (IL-1, IL-6, TGF- β , IGF-1, prostaglandin E $_2$) (4). Krumova in sodelavci so pokazali, da estrogeni z vezavo na estrogenske α receptorje (ER α) na osteoblastih povzročijo apoptozo pre-osteoklastov preko delovanja na Fas/FasL pot in tako zavirajo osteoklastogenezo (14). Fas je receptor na

celični površini in izhaja iz TNF citokinske družine. Na Fas se veže Fas ligand (FasL) in povzroči programirano celično smrt – apoptozo (12). V kosteh nastajajo estrogeni lokalno predvsem iz estron sulfata preko estrogen sulfataze in manj z aromatizacijo androgenov. Znanstveniki so v študijah ugotovili, da je stopnja nastajanja estrogenov v kosteh iz estron sulfata 20-krat večja kot iz androstendiona in 50-krat večja kot iz testosterona. Estron sulfat je torej pomemben prekurzor aktivnega estrogena v obtoku pri moških in pomenopavznih ženskah. Iz neaktivnega estron-3-sulfata nastane estron, ki se z izoencimi (predvsem tipa 3 in 4) 17β -hidroksisteroid oksidoreduktaze pretvori v biološko učinkovit 17β -estradiol (15).

1.3 OSTEOPOROZA

Osteoporoza je sistemska bolezen kosti, za katero je značilno zmanjšanje kostne mase in spremenjena mikro arhitektura kosti, kar vodi v zmanjšano trdnost kosti in s tem povezano povečano tveganje za zlom (Slika 4). Gre za večfaktorsko bolezen, v kateri imajo pomemben vpliv genetski dejavniki. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) definira osteoporozo kot stanje, ko je kostna masa zmanjšana za več kot 2,5 standardne deviacije (SD) glede na zdrave odrasle ženske pred menopavzo (T-vrednost). Značilni znak osteoporoze je zlom kosti ob minimalni obremenitvi le-te (1, 2).



Slika 4: Gobasto kostno tkivo pri zdravi in osteoporozni kosti (16)

1.3.1 ETIOPATOGENEZA OSTEOPOROZE

Kostna masa se pri človeku v dobi odraščanja povečuje, saj je gradnja kosti večja kot razgradnja. Pri tem doseže svojo največjo vrednost v gobastem kostnem tkivu (trabekularne kosti) pri 25-ih letih, v kompaktnem kostnem tkivu (kortikalne kosti) pa nekje pri 35. letu starosti. Naslednjih nekaj let je proces gradnje in razgradnje kosti približno enak, nato pa začne razgradnja kosti prevladovati nad izgradnjo in kostna masa se zmanjšuje (2). To je normalen proces staranja, ki se začne po 40. letu starosti. Kaže se kot izguba kostne mase od 0,5 do 1% na leto pri obeh spolih (1). Povečana izguba kostne mase se najprej začne na trabekularnih kosteh, po 45. letu starosti pa tudi na kortikalnih kosteh. Pri ženskah je po menopavzi izguba kostne mase, predvsem v trabekularnem delu, mnogo večja (okrog 3 % kostne mase letno) kot pri moških. Vzrok temu je prenehanje delovanja jajčnikov in posledično izrazito zmanjšana količina estrogenov v telesu. Kasneje v starosti se v mehanizme zmanjševanja kostne mase vpletajo še zvišana koncentracija parathormona (PTH), znižana koncentracija vitamina D in zmanjšana absorpcija kalcija iz prebavil. Izguba kostne mase vodi do povečanega tveganja za zlom kosti, predvsem vratu stegenice, zapestja in vretenc. Po 50. letu starosti je tveganje za zlom, ki nastane zaradi osteoporoze, približno 40%. V Evropi približno 11,5 % žensk v starosti 50–54 let in 35 % v starosti 75–79 let utrpi vsaj en zlom vretenca. Pojav zlomov zaradi osteoporoze se povečuje s starostjo. Po 45. letu so najbolj pogosti zlomi zapestja, po 65. letu pa začne močno naraščati pogostost zlomov kolka (17).

1.3.2 DEJAVNIKI TVEGANJA

Nastanek osteoporoze je odvisen od številnih dejavnikov. Dejavniki tveganja, na katere ne moremo vplivati, so genetski dejavniki (bela rasa, ženski spol, družinska anamneza zloma kolka), starost v obdobju klimakterija (zgodnji klimakterij, odstranitev jajčnikov), telesna zgradba (nežna telesna zgradba). Dejavniki tveganja, ki se jim lahko izognemo, so majhna telesna aktivnost (s telesno aktivnostjo povečamo največjo kostno maso), prehrana (premajhen vnos kalcija in fosfatov), telesna teža (prevelika in premajhna telesna teža), predhodni zlomi, alkohol (deluje neposredno na kostne celice – pospeši razvoj osteoporoze), kajenje in zdravila (glukokortikoidi, heparin, antacidi ...) (1).

Genetski dejavniki

Genetski dejavniki igrajo pomembno vlogo v patogenezi osteoporoze. S študijami na dvojčkih in družinah so znanstveniki ugotovili, da je 50–85% variabilnost v največji kostni masi gensko pogojena (odvisno od predela skeleta in starosti posameznika). Genetski dejavniki imajo pomemben vpliv tudi na druge dejavnike za zlom pri osteoporozi, kot so kvantitativne ultrazvočne lastnosti kosti, geometrija kolka, mišična moč, indeks telesne mase (ITM) in kazalci kostne premene. Različne študije so pokazale nasprotujoče si rezultate glede vpliva posameznih genov na starostno pogojeno izgubo kostne mase in zlome kosti. Osteoporoza je poligenska bolezen, kar pomeni, da je za razvoj bolezni odgovornih več različnih genov. Znanstveniki so razvili več pristopov za odkrivanje kandidatnih genov, ki uravnavajo dovzetnost za razvoj osteoporoze (18):

- *asociacijske študije posameznih genov,*
- *GWA študije (ang. Genome Wide Association studies),*
- *študije vezanega dedovanja na ljudeh,*
- *študije vezanega dedovanja na živalih.*

Do sedaj so odkrili številne kandidatne gene, med katerimi so bili bolj proučeni geni za: LRP-5 (ang. Lipoprotein receptor-related protein), TGF- β 1, RANKL, OPG, BMP-je (kostni morfogenetski proteini), sklerostin, Runx2, katepsin K, receptor vitamina D, estrogenski receptor α (18).

1.3.3 RAZDELITEV OSTEOPOROZE

Osteoporozo v osnovi delimo na primarno in sekundarno. Primarna osteoporoza je pogostejša. Sekundarna osteoporoza se razvije kot posledica neke bolezni ali jemanja zdravil.

Primarna osteoporoza

Deli se na osteoporozo tipa I, osteoporozo tipa II, idiopatično in juvenilno osteoporozo. **Osteoporoza tipa I** ali pomenopavzalna osteoporoza se pojavi pri ženskah med 51. in 70. letom starosti in jo spremljajo kompresijski zlomi vretenc, zlom reber, medenice in drugih trabekularnih kosti. Vzrok za nastanek je pomanjkanje estrogenov, zato pride do povečane resorpcije in zmanjšane tvorbe kosti. **Osteoporoza tipa II** ali senilna osteoporoza se pojavi po 70. letu starosti. Značilno je zmanjšanje količine tako trabekularne kot kortikalne kosti.

Poleg kompresijskih zlomov trabekularnih kosti (vretence, ploščate kosti) prihaja tudi do zlomov dolgih kosti, kot je kolk. Senilna osteoporoza se pojavlja tudi pri moških. Vzrok naj bi bila zmanjšana resorpcija kalcija iz črevesja zaradi sprememb na črevesni sluznici in posledično zvišana koncentracija PTH ter zmanjšana tvorba hormona D v ledvicah (2, 19). **Juvenilna osteoporoza** se pojavlja zelo redko. Pojavi se že pred puberteto. Traja 2 do 4 leta, spremljajo jo kompresijski zlomi vretenc in dolgih kosti. Za **idiopatsko osteoporozo** zbolijo predvsem mlajši moški. Značilni so patološki zlomi dolgih kosti in kompresijski zlomi vretenc. Etiologija bolezni ni znana.

Sekundarna osteoporoza

Sekundarna osteoporoza je manj pogosta od primarne in se pojavi kot posledica nekega znanega vzroka, ki deluje zaviralno na kostno premeno. Ti vzroki so lahko: *endokrine bolezni* (hipogonadizem, hipertiroza, hiperparatiroidizem), *bolezni prebavil* (subtotalna gastrektomija, malabsorpcijski sindrom, kronični obstruktivni ikterus), *bolezni kostnega mozga* (multipli mielom, sistemska mastocitoza, diseminirani karcinom) in *drugi vzroki* (imobilizacija, kronična obstruktivna pljučna bolezen, kronični alkoholizem, dolgotrajno zdravljenje z glukokortikoidi, heparinom, antacidi) (2).

1.3.4 DIAGNOSTIKA OSTEOPOROZE

Osteoporoza je na začetku klinično neizrazita in neopazna bolezen, dokler ne pride do prvega zloma kosti. Glavna metoda za diagnozo osteoporoze je merjenje mineralne kostne gostote (MKG) z dvojno energijsko rentgensko absorpcijometrijo. Uporablja pa se tudi rentgensko slikanje kosti, ultrazvočno slikanje, kostna biopsija in histomorfometrija. Za spremljanje uspešnosti zdravljenja osteoporoze določajo biokemijske kazalce kostne premene v serumu in urinu (17, 20).

Dvojno energijska rentgenska absorpcijometrija (DXA)

Je neinvazivna metoda merjenja mineralne kostne gostote. Z DXA se meri MKG v predelu ledvenih vretenc, vratu stegenice in kolka. Uporablja se za diagnozo osteoporoze in za spremljanje poteka zdravljenja osteoporoze. Rezultati se podajajo kot T-vrednosti, ki predstavljajo standardno deviacijo glede največje povprečne MKG zdravih odraslih žensk (Preglednica I) (21).

Preglednica I: T-vrednosti po WHO

Kategorija	T-vrednost
Normalno	Nad -1
Osteopenija	Med -1 in -2,5
Osteoporoza	Manj kot -2,5

Biokemijski kazalci kostne premene

Glavni stopnji kostne premene sta razgradnja in tvorba kosti. Zaradi tega delimo tudi biokemijske kazalce kostne premene na biokemijske kazalce razgradnje in tvorbe kosti (Preglednica II). Uporabljamo jih za vrednotenje učinkov zdravljenja. Biokemijske kazalce razgradnje kosti izločajo osteoklasti oz. nastanejo med razgradnjo kosti (predvsem kolagena). Merimo jih v serumu in urinu. Kazalce kostne tvorbe pa izločajo osteoblasti med procesom tvorbe kosti in jih merimo v serumu ali plazmi (20).

Preglednica II: Biokemijski kazalci kostne premene (20)

Kazalci razgradnje kosti	Kazalci tvorbe kosti
<ul style="list-style-type: none"> • hidroksiprolin • piridinolin • deoksipiridinolin (DPYR) • C – terminalni telopeptid • N – terminalni telopeptid • na tartarat odporna kislina fosfataza (TRAP) • katepsin K 	<ul style="list-style-type: none"> • kostna alkalna fosfataza (BALP) • osteokalcin (OC) • propeptid kolagena I

Osteokalcin (OC) je protein, ki ga izločajo osteoblasti. Pomemben je pri mineralizaciji kosti, saj sodeluje pri vezavi hidroksiapatita v kosti. Kostna alkalna fosfataza (BALP) je ena izmed izoform alkalne fosfataze. BALP je membransko vezan encim, ki ga izločajo osteoblasti. Njena natančna funkcija še ni povsem znana, vendar verjetno sodeluje pri tvorbi in mineralizaciji osteoida. Deoksipiridinolin (DPYR) prečno povezuje peptide kolagena in mehanično stabilizira molekulo kolagena. Nastane med zunajceličnim

zorenjem fibrilarnih vlaken. Nahaja se v kosteh in zobeh. C-terminalni telopeptid kolagena tipa 1 (CTX) nastane pri razgradnji kolagena tipa 1 (22).

1.3.5 ZDRAVLJENJE OSTEOPOROZE

Bisfosfonati

Bisfosfonati so zdravila prvega izbora pri zdravljenju osteoporoze. Predstavniki so alendronat, risedronat, etidronat, ibandronat. Kostno resorbcijo zavirajo tako, da se vežejo na kristale kalcijevega hidroksiapatita in zmanjšajo raztapljanje le-tega ter zmanjšajo število, aktivnost, adhezijo osteoklastov in inducirajo njihovo apoptozo. Stimulirajo tudi nastanek osteoblastov (7).

Selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM)

SERM preprečujejo pomenopavzno izgubo MKG in zmanjšujejo pojavnost predvsem vretenčnih zlomov. Preprečujejo nastanek raka na dojki in stimulirajo endometrij. Edini predstavnik SERM na trgu je raloksifen, jemati se začne 2 leti po menopavzi oz. ko prenehajo klimakterične težave. Ima estrogenu podobne učinke na kosti. Novejše študije so pokazale, da raloksifen poveča koncentracijo OPG, ki zavira RANK/RANKL sistem in posledično tudi osteoklastogenezo (17).

Hormonsko nadomestno zdravljenje (HNZ)

Gre za nadomeščanje spolnih hormonov (predvsem estrogenov), izločanje katerih se močno zmanjša v menopavzi. HNZ ni zdravilo prvega izbora za zdravljenje osteoporoze. Poveča MKG in zmanjša tveganje za zlom kosti pri ženskah. Zdravljenje traja 5 do 7 let, učinkovitost se kaže še 3 do 5 let po prenehanju jemanja. Uporablja se za preventivo in izjemoma za zdravljenje osteoporoze v perimenopavzi in zgodnji pomenopavzi (23).

Kalcij in vitamin D

Kalcij in vitamin D sta zelo pomembna za ohranjanje zdravih kosti. Zato zadosten vnos obeh predstavlja osnovo vsakega zdravljenja osteoporoze in je obvezen dodatek pri zdravljenju osteoporoze z antiresorpcijskimi zdravili (23).

Kalcitonin

Je šibek zaviralec kostne razgradnje. Vpliva le na zmanjšanje zlomov vretenc. Kemijsko je peptidni hormon, ki se izloča iz C-celic ščitnice. Zavira kostno resorpcijo tako, da se veže na specifičen receptor na osteoklastih. Zmanjša reabsorpcijo kalcija in fosfatov v proksimalnih tubulih v ledvicah. Predpisuje se le redko (9, 17).

Stroncijev ranelat

Gre za novo zdravilo za zdravljenje osteoporoze. Deluje tako, da stimulira tvorbo kosti, zavira razgradnjo kosti, povečuje pomnoževanje in dozorevanje osteoblastov in osteocitov podobnih celic. Zmanjša zlome tako vretenčnih kot nevretenčnih kosti in nima neželenih učinkov na prebavila kot bisfosfonati. Aplicira se v obliki peroralne raztopine (17).

Teriparatid

Teriparatid je humani rekombinantni parathormon. Deluje tako, da poveča nastajanje in aktivnost osteoblastov. Aplicira se v obliki podkožnih injekcij.

Denosumab

Gre za humano monoklonsko protitelo. Blokira osteoklastogenezo tako, da zavira receptorski aktivator RANKL. Tako oponaša fiziološko delovanje osteoprotegerina (OPG) (17).

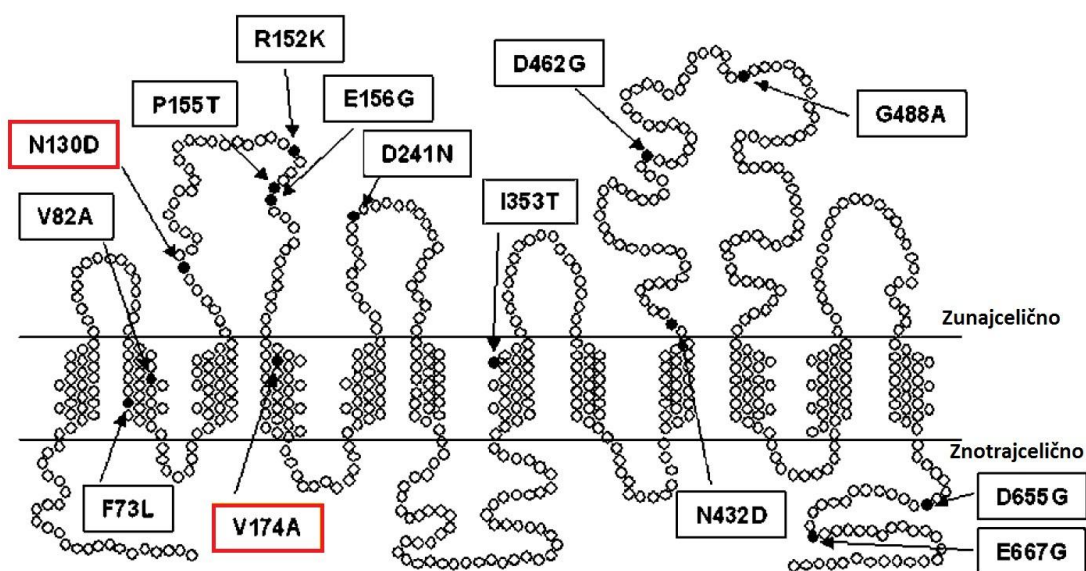
1.4 ORGANSKI ANIONI Prenašalni protein 1B1 (OATP1B1)

OATP1B1 je od natrija neodvisen transportni protein, ki spada v naddružino SLCO (ang. solute carrier organic anion transporters). V različnih literaturah najdemo številna imena za OATP1B1, kot so: LST-1, OATP2, OATP-C, SLC21A6, MCG133282. Je eden glavnih organskih anionskih prenašalcev v jetrih. Nahaja se na bazolateralni membrani hepatocitov in je tako kot ostali predstavniki OATP/SLCO družine, sestavljen iz 12 transmembranskih domen. OATP1B1 je glikoprotein sestavljen iz 691 aminokislin z molekularno maso 84 kDa. Njegova funkcija je transport endogenih in eksogenih amfipatičnih molekul iz krvi v hepatocite. Med endogenimi molekulami so tauroholat, estron-3-sulfat, 17 β -estradiol-D-glukuronid, levkotrien C₄, prostaglandin E₂, ščitnični hormoni, bilirubin in bilirubin glukuronid. Med eksogenimi molekulami so številne zdravilne učinkovine in ksenobiotiki, kot so organski anion bromosulfoftalein, glikozid oubain, peptidomimetik BQ-123, statini, aktivni metabolit irinotekana (SN-38), metotreksat, rifampicin, nekateri ACE inhibitorji in antagonisti angiotenzina II. Transport snovi je neodvisen od gradienta natrija, klorida in kalija, membranskega potenciala in ATP-ja. Natančen transportni mehanizem pri OATP-jih še ni poznan. Nekateri znanstveniki so mnenja, da naj bi transport snovi potekal z elektro nevtralno izmenjavo, kjer bi se za vsak prenos organske molekule iz krvi v hepatocit izločil nevtralizirajoči anion (bikarbonat, glutation ali glutation-S-konjugat) iz hepatocita nazaj v kri (24-26). Meier - Abt in sodelavci so predlagali skupni transportni mehanizem, pri katerem pride do premestitve substrata skozi centralno, pozitivno nabito poro po t.i. rocker-switch tipu mehanizma. Mahagita in sodelavci predpostavljajo, da transport snovi pri OATP1B1 poteka s pomočjo dvosmerne olajšane difuzije in ne preko izmenjave ali kotransporta (27).

1.4.1 GEN ZA OATP1B1

OATP1B1 kodira gen *SLCO1B1*, ki leži na kromosomu 12p12.2-p12.1 in je velik 109 kb. Gen vsebuje 15 eksonov, skupaj z enim nekodirajočim. V *SLCO1B1* genu so odkrili številne polimorfizme v kodirajočih regijah, ki povzročijo spremembo aminokislina v samem proteinu (Slika 5). To lahko vpliva na lokalizacijo ali transportno funkcijo le-tega.

V različnih študijah so ugotovili, da se vrsta in pogostnost pojavljanja polimorfizmov razlikujeta med različnimi etničnimi skupinami. Posameznik ima lahko hkrati prisotnih več polimorfizmov, ki imajo v kombinaciji drugačne učinke kot posamično. Kombinacijo alelov, ki se nahajajo na istem kromosomu zelo blizu skupaj in se zaradi tega dedujejo skupaj, imenujemo haplotip. Pri OATP1B1 so odkrili 17 haplotipov (24, 25, 28).



Slika 5: Polimorfizmi v OATP1B1 (26). Z rdečo sta označena polimorfizma, ki smo ju genotipizirali v naši raziskavi.

1.4.2 POLIMORFIZMA A388G (N130D) IN T521C (V174A)

Polimorfizem na mestu 388 v 4. eksonu gena za OATP1B1 se kaže kot zamenjava adenozina z gvaninom, kar povzroči spremembo aminokislina v proteinu na mestu 130 iz asparagina v aspartat (druga zunajcelična zanka). Pri polimorfizmu na mestu 521 v eksonu 5 istega gena pa pride do zamenjave timina s citozinom. V proteinu se to pokaže kot zamenjava aminokislina valin z alaninom na mestu 174, ki se nahaja v četrti transmembranski domeni. Za kombinacijo obeh polimorfizmov so postavili več haplotipov, ki so podani v spodnji preglednici.

Preglednica III: Haplotipi za polimorfizma A388G in T521C. Zgornja vrstica prikazuje mesto na genu *SLCO1B1*, kjer pride do zamenjave, in s katerim nukleotidom je zamenjan. Spodnja vrstica prikazuje imena posameznega haplotipa (24).

Polimorfizmi	Brez sprememb	388G	521C	521C in 388G
Haplotipi	OATP1B1*1a	OATP1B1*1b	OATP1B1*5	OATP1B1*15

T521C (V174A) polimorfizem je eden najbolj proučevanih polimorfizmov. V študijah so dokazali, da prisotnost tega polimorfizma ter haplotipov *5 in *15 zmanjša transportno funkcijo za substrate OATP1B1 (estron sulfat, 17 β -estradiol glukuronid, nekateri statini ...), zato je serumska koncentracija le-teh povečana (pri estron sulfatu za 40 %). Možna razlaga za zmanjšano transportno funkcijo bi lahko bilo dejstvo, da se OATP1B1 z alaninom na mestu 174 ne izraža le na hepatocelularni membrani, ampak tudi v znotrajceličnem prostoru hepatocitov in je zato število OATP1B1 na membrani zmanjšano (29, 30).

Polimorfizem A388G (N130D) je prevalentni pri večini etničnih skupin. Kot že omenjeno pride do zamenjave aminokislina asparagin z aspartatom na drugi zunajcelični zanki OATP1B1. To povzroči povečanje celokupnega negativnega naboja proteina, kar bi lahko imelo vpliv na vezavo substratov na protein (31). Polimorfizem N130D tako poveča transport bromosulfoftaleina, zmanjša transport tauroholata ter ne vpliva na transport estron sulfata in 17 β -estradiol glukuronida, kar so ugotovili z *in vitro* poskusi na HeLa celicah (28). Michalski in sodelavci so po drugi strani v *in vitro* poskusih na MDCKII celicah ugotovili, da prisotnost polimorfizma A388G povzroči nekoliko zmanjšano izražanje OATP1B1 na bazolateralni membrani hepatocita (32). V kombinaciji s polimorfizmom T521C, torej kot haplotip OATP1B1*15, pa naj bi vplival tudi na transport estron sulfata in 17 β -estradiol glukuronida (29). Pogostost pojavljanja SNP-jev je odvisna od rasne skupine. Tako ima polimorfizem T521C frekvenco mutiranega alela 10–15 % pri Azijcih, 10–20 % pri Kavkazijcih in 1–2 % pri Afričanih. Polimorfizem A388G pa izkazuje frekvenco mutiranega alela 60–90 % pri Azijcih, 30–45 % pri Kavkazijcih in 70–80 % pri Afričanih (24).

2 NAMEN DELA

Osteoporoza je bolezen kosti, za katero je značilno zmanjšanje MKG in spremenjena mikro arhitektura kosti, posledica tega pa je povečano tveganje za zlom kosti. Pomemben dejavnik, ki vpliva na MKG, je količina estrogenov v telesu. Tako začne ženskam po menopavzi, ko jajčniki ne proizvajajo več estrogenov in se nivo le-teh v telesu zniža, MKG hitreje upadati v primerjavi z moškimi enake starosti.

OATP1B1 je eden glavnih prenašalcev organskih anionov iz krvi v jetra. Med substrati za prenašalec sta med drugimi tudi estron sulfat in 17β -estradiol glukuronid. Estron sulfat je fiziološko neaktiven in predstavlja skladišče estrogenov. Preko estrogen sulfataze in 17β -hidroksisteroid oksidoreduktaze nastane iz estron sulfata 17β -estradiol, ki je biološko aktivna oblika estrogena. Tako naj bi bil estron sulfat glavni vir nastanka estrogena lokalno v kosteh. Gen za OATP1B1 izkazuje številne funkcionalne polimorfizme, ki vplivajo na transportno funkcijo kodirajočega proteina.

Namen diplomske naloge bo ugotoviti, ali imata polimorfizma N130D in V174A v genu za OATP1B1 ter njuni haplotipi vpliv na MKG ter biokemijske kazalce kostne premene in posledično na pojavnost osteoporoze pri moških in ženskah. Poskušali bomo torej dokazati hipotezo, da prisotnost teh polimorfizmov povzroči večjo serumsko koncentracijo estron sulfata, kar bi imelo za posledico večjo MKG in s tem manjše tveganje za pojav osteoporoze. Do sedaj še ni bila narejena nobena študija, ki bi proučevala povezavo med MKG in polimorfizmi v genu za OATP1B1.

Zato bomo izmerili MKG in odvzeli krvne vzorce preiskovancem ter iz njih izolirali DNA. Iz le-te bomo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času s KASP[®] genotipizacijskim sistemom določili prisotnost polimorfizmov N130D in V174A. S programom PHASE bomo določili haplotipe za ta dva polimorfizma. Na koncu bomo s statistično analizo ugotovili, ali obstaja povezava med polimorfizmi N130D in V174A v OATP1B1 in MKG ter biokemijskimi kazalci kostne premene.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS PREISKOVANCEV

V našo genotipizacijsko raziskavo smo vključili 791 preiskovancev iz UKC Ljubljana – Klinika za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, UKC Maribor – Oddelek za endokrinologijo in diabetologijo in SB Celje – Travmatološki oddelek. Preiskovance smo razdelili glede na spol, prisotnost menopavze, obolelost z osteoporozo, zdravljenje osteoporoze in zlom kolka na naslednje skupine:

- pomenopavzne preiskovanke, ki smo jih še dodatno razdelili na
 - zdrave pomenopavzne preiskovanke,
 - osteoporozne preiskovanke;
- osteoporozne preiskovanke, zdravljene z alendronatom;
- premenopavzne preiskovanke;
- moški;
- osteoporozni preiskovanci z zlomom kolka;
- preiskovanci z osteoartrozo.

Preiskovancem so bili odvzeti krvni vzorci, iz katerih so kasneje izolirali genomsko DNA in določili koncentracije biokemičnih kazalcev kostne premene. To so bili ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANKL), osteoprotegerin (OPG), osteokalcin (OC), C-terminalni telopeptid kolagena tip I (CTX), kostna alkalna fosfataza (BALP) in katepsin K. Vrednosti RANKL, OPG, CTX in katepsina K v serumu so določili z encimskoimunskim testom (Serum CrossLaps ELISA, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark; sRANKL ELISA, Osteoprotegerin ELISA, Cathepsin K ELISA, Biomedica, Vienna, Austria). Koncentracijo OC so izmerili v plazmi z dodatkom heparina s kemiluminiscenčnim encimskoimunskim testom (Immulite Osteocalcin, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). Serumsko koncentracijo BALP so določili z radioimunskim testom (Tandem-R Ostase, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Meritve MKG so bile opravljene na UKC Ljubljana, UKC Maribor in SB Celje s pomočjo DXA metode. Izmerili so MKG ledvenih vretenc (MKGI), MKG vratu stegenice (MKGfn) in MKG celotnega kolka (MKGtot). 52 pomenopavnih preiskovank so po začetnem merjenju MKG zdravili z alendronatom (10 mg/dan). Zraven so jemale tudi kalcij

in vitamin D. Po enem letu so tem preiskovankam ponovno izmerili MKG in vrednosti biokemijskih kazalcev kostne premene.

3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN DNA VZORCEV

Krvnim vzorcem preiskovancev so iz levkocitov z metodo izsoljevanja po Millerju izolirali genomsko DNA (33). Te raztopine so predstavljale osnovne raztopine DNA, ki smo jih desetkrat redčili z ultra čisto vodo in nato s pomočjo spektrofotometra NanoDrop® ND-1000 izmerili njihove koncentracije. Tako pripravljene delovne raztopine vzorcev smo odpipetirali na mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami. V A1 vdolbinico vsake ploščice smo odpipetirali ultra čisto vodo, ki je služila kot negativna kontrola. V vse ostale vdolbinice pa smo razredčili vzorce delovnih raztopin DNA na koncentracijo 3 ng/μL.

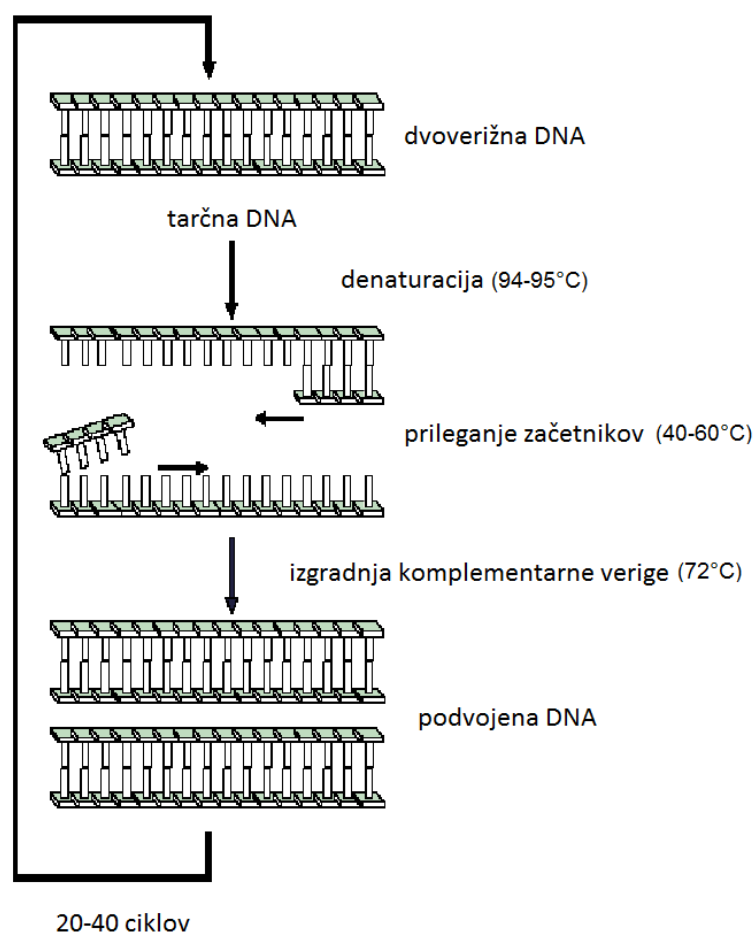
3.2.1 MATERIALI IN OPREMA

Za pripravo raztopin vzorcev DNA smo uporabljali naslednjo opremo in materiale:

- brezprašne rokavice Safeskin PFE, velikost M, L (Kimberly Clark),
- avtoklavirane 0,5 in 1,5 ml epice (Sarstedt, Nemčija),
- avtoklavirane nastavke za pipete (Sarstedt, Nemčija),
- polavtomatske pipete z volumni 0,1–2,5 μl; 2–20 μl in 20–200 μl (Eppendorf, Nemčija),
- ultra čisto vodo za redčenje (PURELAB classic UF, ELGA),
- mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami,
- mešalnik Vortex-2 Genie (Scientific Industries),
- centrifuge,
- avtoklav.

3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

PCR je metoda *in vitro* sinteze nukleinskih kislin, s katero lahko pomnožimo tarčni odsek DNA. Reakcija poteka ciklično in sicer v 20–40 ciklih. V osnovi je cikel sestavljen iz treh stopenj (Slika 6). **Denaturacija** poteče pri 94–95 °C, pri čemer se dvoverižna DNA razklene. Sledi **prileganje začetnikov** pri temperaturi 40–60 °C. Za tem začne DNA polimeraza pri temperaturi 72 °C **izgrajevati komplementarno verigo**. To poteka tako, da se veže na oligonukleotidni začetnik in začne v smeri 5′→3′ graditi komplementarno verigo.



Slika 6: Shematski prikaz cikla verižne reakcije s polimerazo (prirejeno po (34))

Reakcijsko zmes sestavljajo: vzorec DNA, Mg^{2+} ioni, deoksinukleozid-trifosfati, ki predstavljajo gradnike nove verige DNA, reakcijski pufer, dva začetna oligonukleotida in termostabilna DNA polimeraza (35, 36). Danes obstajajo že številne izpeljanke PCR, ki v osnovi vse delujejo po zgoraj opisanem principu.

PCR v realnem času je ena izmed največkrat uporabljenih izpeljank PCR. Njena bistvena prednost je, da omogoča kvantitativno merjenje nukleinskih kislin v vsakem ciklu PCR-ja. Je hitra, visoko občutljiva, ponovljiva metoda, ki za razliko od konvencionalnega PCR poteka v zaprtem sistemu in ne zahteva dodatnih post PCR stopenj. S PCR v realnem času lahko ugotavljamo spremembe v izražanju genov, v številu kopij posameznih genov, kromosomske inverzije ali translokacije, točkaste mutacije in detektiramo ter kvantificiramo različne patogene (36). Detekcija in pomnoževanje potekata sočasno in temeljita na merjenju fluorescence. Merjenje fluorescence poteka v eksponentni fazi reakcije. Načini detekcije PCR produktov so lahko nespecifični ali specifični. Nespecifičen način detekcije predstavljata fluorescentni barvili SYBRGreen I[®] ali EvaGreenTM. Delujeta tako, da se nespecifično vežeta v nastajajočo dvoverižno DNA in s tem povzročita porast fluorescence. Intenziteta fluorescence je sorazmerna s količino produkta. Med specifične načine detekcije uvrščamo oligonukleotide, označene s fluorofori (sonde). Specifični so zato, ker se vežejo na točno določeno mesto znotraj tarčnega zaporedja in tako preprečijo detekcijo morebitnih nespecifičnih produktov. Sonde delujejo po principu FRET-tehnologije (FRET – ang. Förster Resonance Energy Transfer). FRET je od razdalje odvisna interakcija elektronsko vzbujenega stanja dveh molekul barvila, pri čemer pride do prenosa ekscitacije iz donorskega (reporter) na akceptorsko (dušilec) molekulo brez emisije fotona. Donor in akceptor sta blizu skupaj. Absorpcijski spekter akceptorske molekule se mora prekrivati s fluorescenčnim emisijskim spektrom donorske molekule. Ko se donor in akceptor dovolj oddaljita, pride do porasta fluorescence donorja. Ta porast fluorescence merimo v vsakem ciklu. Ločimo različne tipe sond: hidrolizirajoče sonde, hibridizacijske sonde in molekularna svetila (35, 36).

3.3.1 KASP genotipizacija

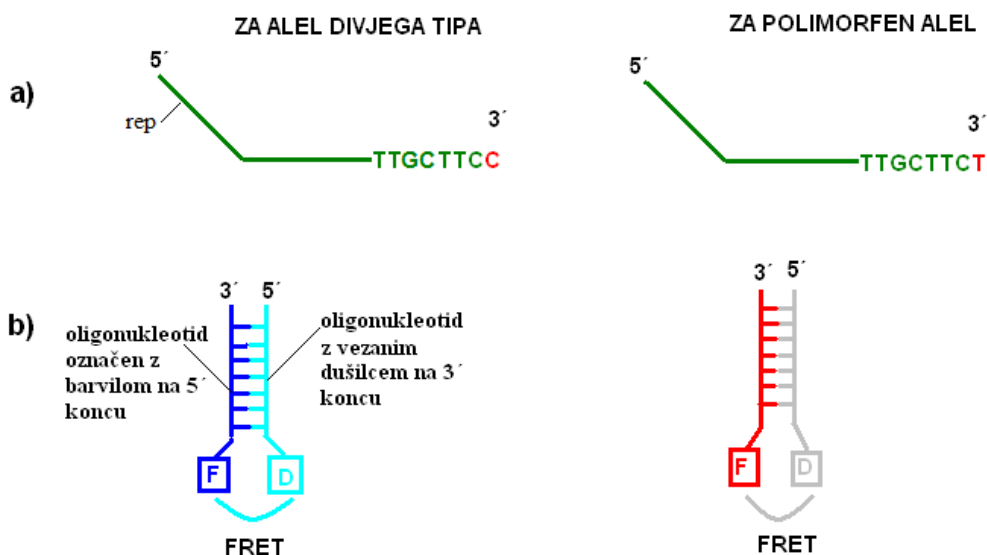
Za izvedbo genotipizacije smo uporabili KASP genotipizacijski sistem. KASP (angl. Kbioscience Competitive Allele-Specific PCR) je homogena genotipizacijska tehnologija v končni točki, ki deluje na podlagi FRET-tehnologije. V nalogi smo jo prilagodili tako, da smo signal detektirali tudi v realnem času. S KASP tehnologijo lahko določamo polimorfizme posameznih nukleotidov (SNP) in vstavljanje oz. delecijo nukleotidov. KASP genotipizacijski sistem sestavljata dve komponenti in sicer SNP specifična analiza (assay), ki vsebuje tri neoznačene oligonukleotidne začetnike, in reakcijska zmes (Reaction

Mix), ki vsebuje univerzalen fluorescenten sistem poročanja, posebej razvito Taq polimerazo in ostale potrebne komponente (37).

Princip delovanja

Za lažje razumevanje principa delovanja reakcije so najprej predstavljeni oligonukleotidni začetniki:

- **Dva alelna specifična začetnika.** Vsak začetnik je specifičen za posamezen SNP. Zgrajena sta tako, da se s 3' koncem vežeta na polimorfno mesto na DNA, na 5' koncu pa imata zaporedje, ki se ne veže na DNA verigo (t.i. rep). Ta dva začetnika nista označena z barvili (Slika 7a).
- **En skupen obratnosmerni začetnik,** ki gradi komplementarno verigo.
- **Dva oligonukleotida, označena na 5' koncu.** Eden je označen z barvilom FAM, drugi pa z barvilom VIC. Ta dva oligonukleotida se vežeta na repno sekvenco na 5' koncih alelna specifičnih začetnikov. Na začetku reakcije sta povezana z oligonukleotidoma z vezanima dušilcema (Slika 7b). Tekom reakcije se sprostita in pride do porasta fluorescence.
- **Dva oligonukleotida z vezanima dušilcema na 3' koncih.** Sta komplementarna oligonukleotidoma, ki sta označena z barvili in preko FRET-tehnologije prestrezata fluorescenco barvil, dokler je to potrebno.



Slika 7: Oligonukleotidni začetniki:

a) alelna specifična začetnika s polimorfnim mestom na 3' koncu,

b) oligonukleotid, označen z barvilom, in njemu komplementaren oligonukleotid z vezanim dušilcem (levo za alel divjega tipa; desno za alel s polimorfizmom; F pomeni fluorescenčno barvilo; D pomeni dušilec).

Na začetku reakcije sta oligonukleotida povezana – prihaja do FRET. Tekom reakcije se ločita, oligonukleotid z barvilom se veže na rep na 5' koncu alelna specifičnega začetnika (F in D se oddaljita), ni več FRET, zaradi tega pride do porasta fluorescence

V začetnih ciklih PCR-reakcije se, v fazi prileganja začetnikov, na tarčni odsek verige DNA veže ustrezen neoznačen alelni specifičen oligonukleotidni začetnik. Prileže se tako, da je s 3' koncem vezan na polimorfno mesto. Na komplementarno verigo DNA se veže skupen obratnosmerni začetnik in Taq DNA-polimeraza začne z izgradnjo komplementarnih verig DNA. Takrat sta z barvili označena oligonukleotida vezana z oligonukleotidi z vezanim dušilcem, zato ni povišanja fluorescence. V nadaljevanju PCR-reakcije se na odseke verig DNA na repke vežejo ustrezni komplementarni nukleotidi z vezanim barvilom, ki se predhodno odcepijo od oligonukleotidov z vezanim dušilcem. Zaradi tega se zazna porast fluorescence. Glede na to, katero barvo zaznamo, določimo, kateri genotip je prisoten. Pri KASP-genotipizacijskem sistemu se uporabljata barvili VIC in FAM, ki emitirata svetlobo pri različnih valovnih dolžinah. Vrednosti ekscitacije in emisije za obe barvili so podane v preglednici IV (37).

Preglednica IV: Valovne dolžine ekscitacije in emisije v nm za VIC in FAM (37)

Barvilo	Ekscitacija (nm)	Emisija (nm)
FAM	485	520
VIC	534	556

3.3.2 PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI IN IZVEDBA PCR-REAKCIJE

Reakcija PCR je zelo občutljiva na kontaminacijo s tujo DNA. Če pride do kontaminacije reakcijske zmesi, lahko nastanejo nespecifični produkti in dobimo lažne rezultate. Zato smo morali reakcijsko zmes pripraviti v ustrezno čistem okolju. Oblečene smo imeli halje, ki smo jih uporabljali samo v tistem laboratoriju. Preden smo začeli s pripravo reakcijske zmesi, smo najprej očistili delovno komoro in ves potreben pribor s 3% hipokloritom in jih pustili pod UV-lučko 30 minut. Medtem smo odtalili reagente, ki so bili zamrznjeni, nastavili program na aparatu za izvajanje kasnejše PCR-reakcije in preračunali ustrezne volumne reagentov. Reakcijo smo izvajali s 96 vzorci, zato smo morali posamezne volumne reagentov za en vzorec pomnožiti s številom vzorcev, ki smo jih genotipizirali. Zaradi izgub pri pipetiranju, smo vzeli 10% pribitek reagentov. Volumni reagentov za en vzorec in za skupno število vzorcev s pribitkom so prikazani v preglednici V.

Preglednica V: Volumni reagentov za en vzorec in skupno število vzorcev

Reagenti	za 1 vzorec	za 106 vzorcev
2 x Reaction Mix	4 μ l	424 μ l
Assay mix (c=2,2 mM)	0,11 μ l	11,66 μ l
MgCl ₂ (c=50 mM)	0,064 μ l	6,784 μ l
Vzorec DNA (c=3 ng/ μ l)	4 μ l	-
Skupen volumen	8,17 μl	4,17 μl x 106

Ko smo UV-lučko ugasnili, smo reagente prenesli v komoro, jih dobro premešali in centrifugirali. Nato smo s polavtomatskimi pipetami prenesli ustrezne volumne posameznih reagentov v epico, jo premešali in centrifugirali. Vzeli smo mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami in v posamezno vdolbinico z reverznim pipetiranjem odpipetirali po 4,17 μ l pripravljene zmesi reagentov. Potem smo še z 12-kanalno polavtomatsko pipeto prenesli po 4 μ l DNA raztopin vzorcev, ki smo jih predhodno centrifugirali 2 minuti pri 2100 obratih na minuto. Ploščo smo prekrili s samolepilno folijo in jo centrifugirali 2 minuti pri 1900 obratih na minuto. Med delom smo vedno uporabljali rokavice brez smukca.

Mikrotitrsko ploščo, zaprto s samolepilno folijo, smo nato vstavili v ciklični pomnoževalnik ABI PRISM[®] 7000 SDS, ki smo ga prižgali 15 minut preden smo začeli z genotipizacijo, in zagnali predhodno nastavljen program. Za genotipizacijo smo uporabljali Hot Start PCR-tehniko z namenom preprečitve pomnoževanja nespecifičnih PCR-produktov, ki lahko nastanejo med samo pripravo reakcijske zmesi (nespecifična vezava začetnikov na DNA-verigo). Hot Start se izvaja tako, da imamo pred začetkom PCR-reakcije nekajminutno fazo denaturacije, znotraj katere se aktivira tudi Taq DNA-polimeraza (38). Temperaturni in časovni program PCR-reakcije (protokol), ki smo ga uporabili za genotipizacijo, je podan v preglednici VI.

Preglednica VI: Pogoji za izvedbo PCR-reakcije – temperatura in čas trajanja posamezne faze

začetna denaturacija	24 ciklov	18 ciklov	alelna diskriminacija
94°C 15 min	94°C 10 s	94°C 10 s	25°C 1 min
	57°C 20 s	57°C 20 s	
	72°C 40 s	25°C 30 s	

Po končani PCR-reakciji smo izvedli še alelno diskriminacijo, s katero smo določili genotipe posameznim vzorcem.

3.3.3 MATERIALI IN OPREMA

Reagenti, ki smo jih uporabili za pripravo reakcijske zmesi:

- 2 x KASP Reaction Mix (KBioscience) – vseboval je univerzalen fluorescentni reporterski sistem, dNTP, encim Taq DNA-polimerazo in pasivno referenčno barvilo (ROX);
- Assay mix (KBioscience) – vseboval je tri neoznačene začetnike s koncentracijami 100 μ M, in sicer dva alelno specifična začetnika in skupen obratnosmerni začetnik (za vsak polimorfizem svoj Assay mix);
- MgCl₂ (50 mM);
- vzorci DNA (konc. \sim 3 ng/ μ L).

Pribor in aparature:

- avtoklavirani nastavki za pipete 10 μ L in 200 μ L (Sarstedt, Nemčija),
- škatlice za avtoklavirane nastavke (Sarstedt, Nemčija),
- polavtomatske pipete 0,1–10 μ L; 2–20 μ L; 20–200 μ L (Eppendorf, Nemčija),
- 12-kanalna polavtomatska pipeta 0,1–100 μ L (Eppendorf, Nemčija),
- avtoklavirane epice 1,5 mL (Sarstedt, Nemčija),
- delovna komora (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner (UVC/T-M-AR, Latvija)),
- mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami in samolepilna folija (Roche Applied Science),
- ciklični pomnoževalnik ABI PRISM[®] 7000 SDS (Applied Biosystems),
- mešalnik Vortex-2 Genie (Scientific Industries),
- mikrocentrifuge,
- avtoklav.

3.4 STATISTIČNE METODE

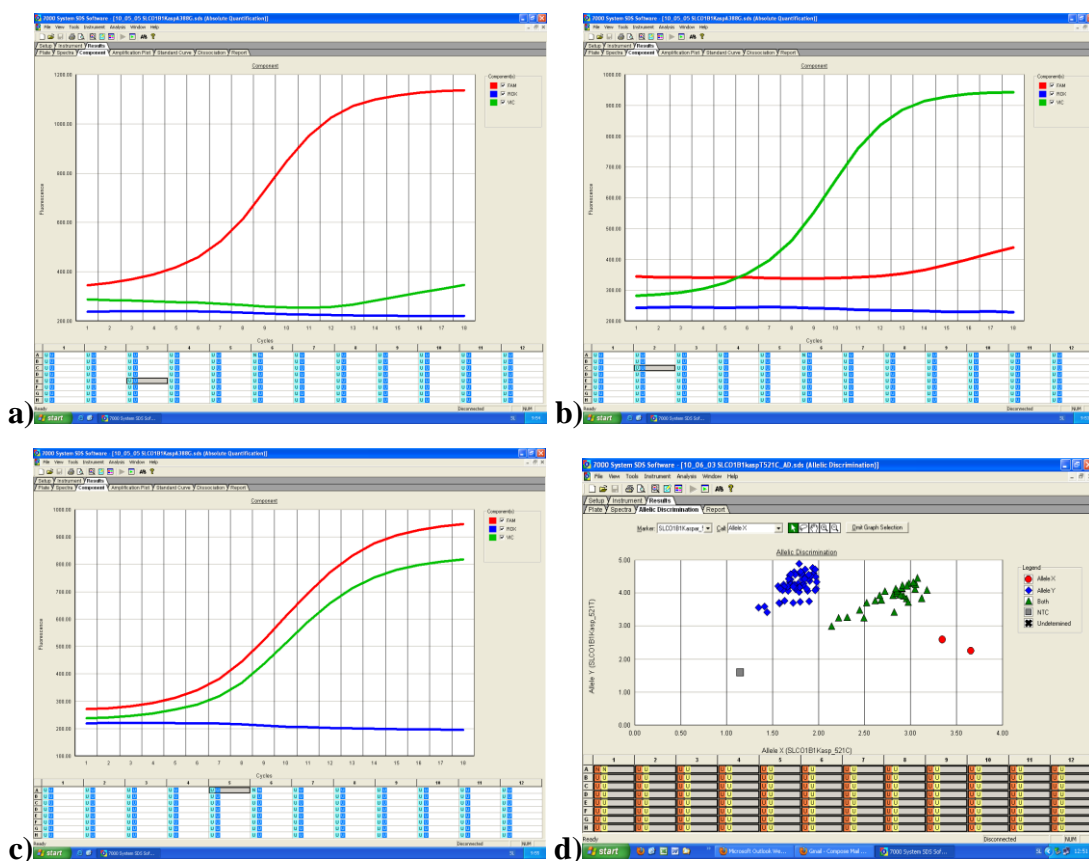
Rezultate genotipizacije smo statistično obdelali s statističnim programom *SPSS for Windows* verzija 17.0. Posameznim skupinam preiskovancev smo za vsak polimorfizem določili frekvence genotipov in s pomočjo χ^2 -testa preverili, če so v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. S programom PHASE smo določili haplotipe. S programom EMLD smo izračunali, če so aleli obeh polimorfizmov v vezavnem neravnovesju. S Kolmogorov-Smirnovim testom smo preverili normalnost porazdelitve spremenljivk. Nato smo na podlagi normalnosti porazdelitve ugotavljali statistično pomembne razlike med srednjimi vrednostimi MKG in kostnih kazalcev pri posameznimi genotipih oz. haplotipih. Izvajali smo naslednje teste:

- Analiza variance (ANOVA) – za tri ali več normalno porazdeljenih spremenljivk. Če so bile razlike srednjih vrednosti MKG ali kostnih kazalcev statistično značilne, smo še s Post hoc testi ugotovili, med katerimi genotipi oz. haplotipi je bila razlika.
- T-test – za dve normalno porazdeljeni spremenljivki.
- Kruskal-Wallis test – za tri ali več nenormalno porazdeljenih spremenljivk.
- Mann-Whitney test – za dve nenormalno porazdeljeni spremenljivki.
- Analiza kovariance (ANCOVA) – za tri ali več normalno porazdeljenih spremenljivk, če smo z ANOVO ugotovili vpliv posameznega genotipa na kovariato (telesna višina, starost, masa, ITM, mena, leta mene).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 MODIFIKACIJA METODE IN REZULTATI GENOTIPIZACIJE

Po končani reakciji PCR smo vsem vzorcem določili genotipe za vsak polimorfizem glede na to, fluorescenca katerega barvila je tekom PCR-reakcije porasla. Porast barvila FAM je pomenilo genotip AA pri A388G oz. TT pri T521C polimorfizmu, porast barvila VIC je pomenilo genotip GG pri A388G oz. CC pri T521C polimorfizmu. Če je prišlo do porasta fluorescenc obeh barvil, je to pomenilo prisotnost genotipa AG pri polimorfizmu A388G oz. TC pri polimorfizmu T521C (slika 8).



Slika 8: Primer prikaza rezultatov genotipizacije: **a)** na sliki se vidi porast barvila FAM, **b)** na sliki se vidi porast barvila VIC, **c)** prikazan je porast obeh barvil (heterozigot), **d)** slika s prikazom rezultatov po alelni diskriminaciji (modri kvadrati – homozigoti za en alel; rdeči krogi – homozigot za drug alel; zeleni trikotniki – heterozigoti; siv kvadrat – slep vzorec).

KASP-genotipizacija je v osnovi metoda v končni točki, mi pa smo jo uporabljali kot PCR v realnem času (Slika 8 a–c). S tem smo lahko bolj natančno opazovali potek reakcije (v katerem ciklu začne fluorescenca naraščati; ali sta pri heterozigotih krivulji vzporedni ...)

in lažje opazili morebitne negativne rezultate. Po končani reakciji smo izvedli alelno diskriminacijo, ki nam je še podala rezultate v končni točki za celotno ploščico vzorcev (Slika 8 d). Protokol reakcije, ki ga je predlagal proizvajalec, je zajemal 15-minutno začetno denaturacijo pri 94 °C in nato 35-krat ponovitev cikla: 10 sekund pri 94°C, 20 sekund pri 57°C in 40 sekund pri 72°C. Ker smo za genotipizacijo uporabljali PCR v realnem času, smo protokol modificirali tako, da smo od proizvajalca predlaganih 35 ponovitev cikla skrajšali na 24 ponovitev in dodali še 18 ponovitev cikla: 10 sekund pri 94°C, 20 sekund pri 57°C in 30 sekund pri 25°C. To smo naredili zato, ker je mogoče porast fluorescence reporterskega barvila detektirati le pri 25°C. Celoten modificirani protokol reakcije je podan v poglavju 3.3.2 v preglednici VI.

4.2 POGOSTOST POJAVLJANJA POLIMORFIZMOV N130D (A388G) IN V174A (T521C) PRI OATP1B1

Rezultatom, ki smo jih dobili pri genotipizaciji polimorfizmov A388G in T521C v genu za OATP1B1, smo določili frekvence genotipov v posameznih skupinah preiskovancev. Frekvence genotipov za posamezne polimorfizme so predstavljene v preglednicah VII in VIII.

Preglednica VII: Frekvence genotipov za polimorfizem A388G v posameznih skupinah

SKUPINA	AA n (%)	AG n (%)	GG n (%)
pomenopavzne preiskovanke	148 (32,2)	226 (49,1)	86 (18,7)
zdrave pomenopavzne preiskovanke	72 (32,0)	111 (49,3)	42 (18,7)
osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	76 (32,3)	115 (48,9)	44 (18,7)
osteoporozne preiskovanke, zdravljene z alendronatom	15 (30,0)	24 (48,0)	11 (22,0)
premenopavzne preiskovanke	15 (27,8)	29 (53,7)	10 (18,5)
moški	28 (25,2)	59 (53,2)	24 (21,6)
osteoporozni preiskovanci z nizko energijskim zlomom kolka	23 (30,7)	37 (49,3)	15 (20,0)
preiskovanci z osteoartrozo	19 (36,5)	23 (44,2)	10 (19,2)

Preglednica VIII: Frekvence genotipov za polimorfizem T521C v posameznih skupinah

SKUPINA	TT n (%)	TC n (%)	CC n (%)
pomenopavzne preiskovanke	308 (67,1)	139 (30,3)	12 (2,6)
zdrave pomenopavzne preiskovanke	153 (68,6)	65 (29,1)	5 (2,2)
osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	155 (65,7)	74 (31,4)	7 (3,0)
osteoporozne preiskovanke, zdravljene z alendronatom	32 (64,0)	17 (34,0)	1 (2,0)
premenopavzne preiskovanke	35 (64,8)	17 (31,5)	2 (3,7)
moški	59 (53,2)	43 (38,7)	9 (8,1)
osteoporozni preiskovanci z nizko energijskim zlomom kolka	44 (58,7)	28 (37,3)	3 (4,0)
preiskovanci z osteoartrozo	30 (57,7)	19 (36,5)	3 (5,8)

Iz preglednice VIII je razvidno, da je pogostost pojavljanja genotipa CC pri polimorfizmu T521C razmeroma nizka pri vseh skupinah preiskovancev in se giblje med 2 in 8 odstotki. Prevladuje genotip TT. Pri polimorfizmu A388G (preglednica VII) je pa pogostost pojavljanja genotipa GG dosti večja, in sicer med 18,5 in 22 odstotki. Največjo pojavnost pri vseh skupinah preiskovancev ima genotip AG. Frekvenca mutiranega alela je pri naših preiskovancih za polimorfizem A388G znašala 44,3 %, za polimorfizem T521C pa 20,3 %. To je podobno, kot so v različnih študijah določili za Kavkazijce nasploh (30–51 % za A388G in 14–22 % za T521C) (25).

S testom χ^2 smo preverili, če so frekvence genotipov po skupinah za vsak polimorfizem v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Hardy-Weinbergovo načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja. Načelo velja za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer se osebkni naključno razmnožujejo, ni selekcije vzorcev, dodatnih mutacij in migracij. χ^2 -test je pokazal, da ni statistično značilne razlike med opazovano genotipsko frekvenco, ki smo jo dobili pri eksperimentalnem delu, in pričakovano genotipsko frekvenco, ki smo jo izračunali po Hardy-Weinbergovem načelu. To pomeni, da so frekvence genotipov za polimorfizma A388G in T521C v genu za OATP1B1 pri genotipiziranih preiskovancih v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

4.3 DOLOČANJE HAPLOTIPOV

Haplotipe smo določili s pomočjo računalniškega programa PHASE, v katerega smo vnesli genotipe vseh vzorcev za oba polimorfizma, vendar samo tiste, za katere smo imeli podatke za oba polimorfizma (n=750). Izključili smo torej tiste vzorce, ki so imeli podatek

samo za en polimorfizem, in tiste, ki niso imeli podatka za noben polimorfizem. Možni haplotipi, ki nastanejo s kombinacijo genotipov obeh polimorfizmov, in njihove frekvence za naše preiskovance so podani v preglednici IX.

Preglednica IX: Haplotipi polimorfizmov A388G in T521C in njihove frekvence n (%) (V stolpcu Oznaka v so podane oznake, ki smo jih uporabljali pri analizi, v oklepajih pa so splošno uporabljane oznake za haplotipe)

Oznaka	Haplotip	Frekvenca
*1a (OATP1B1*1a)	TA	807 (53,8 %)
*1b (OATP1B1*1b)	TG	389 (25,9 %)
*5 (OATP1B1*5)	CA	34 (2,3 %)
*15 (OATP1B1*15)	CG	270 (18,0 %)

V nadaljevanju smo z ustreznimi statističnimi testi za posamezen haplotip preverili, če vpliva na MKG in biokemijske kazalce kostne premene. V analizo smo vključili haplotipe *1a, *1b in *15, medtem ko haplotipa *5 zaradi nizke frekvence nismo analizirali. Analizo haplotipov smo izvedli tako, da smo vsakemu vzorcu določili število kopij za posamezen haplotip (0, 1 ali 2) in nato ugotavljali povezanost števila kopij s prej omenjenimi fenotipi. S programom EMLD smo izračunali, če so aleli obeh polimorfizmov v vezavnem neravnovesju. Vezavno neravnovesje je možnost, da se določeni aleli na sosednjih tesno povezanih lokusih dedujejo skupaj, kar lahko vodi do povezanosti med aleli znotraj populacije. V program smo, tako kot pri določanju parov haplotipov, vnesli le vzorce, ki so imeli podatke o genotipih za oba polimorfizma, in dobili smo parametre D, D' in r^2 (preglednica X). D podaja neravnovesje (ang. disequilibrium) kot razliko med opazovano frekvenco haplotipov na obeh lokusih in pričakovano frekvenco, ki prikazuje, ali bi se alela pri naključnem podvojevanju ločila. Če je D različen od nič, pomeni, da sta alela v vezavnem neravnovesju. Parameter D' je D, deljen z največjo možno vrednostjo alelne frekvence na dveh lokusih. Bolj kot je D' blizu 1, bolj sta lokusa povezana med seboj in se tako z večjo verjetnostjo dedujeta skupaj. r^2 je korelacijski koeficient, ki nam pove, koliko so pari haplotipov med seboj povezani. (39)

Preglednica X: Parametri vezavnega neravnovesja.

D	D'	r^2
0.0836	0.7398	0.1751

Iz preglednice X je razvidno, da je parameter D različen od 0, torej sta alela v vezavnem ravnovesju. Parameter D' je manjši od 1, kar pomeni, da je verjetnost, da sta lokusa med seboj povezana in se dedujeta skupaj, nekoliko manjša. $r^2 = 0,175$, kar nam pove, da so pari haplotipov med seboj povezani v 17.5 %.

4.4 UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI POLIMORFIZMOV A388G IN T521C TER NJUNIH HAPLOTIPOV V GENU ZA OATP1B1 Z MKG IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali imata polimorfizma A388G in T521C v genu za OATP1B1 vpliv na MKG in biokemijske kazalce kostne premene. Polimorfizem T521C pri OATP1B1 ter haplotipa OATP1B1*5 in OATP1B1*15 povzročijo zmanjšan prenos snovi iz krvi v jetra, med katerimi sta tudi estron sulfat in estradiol glukuronid. Serumaska koncentracija teh snovi je zato povišana (29). Estron sulfat je pomemben prekurzor estrogenov v kosteh (15). Estrogeni imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju MKG s tem, da zavirajo razgradnjo kosti. Le-ta se močno poveča po menopavzi, ko se nivo estrogenov v telesu zniža. MKG so kot fenotip uporabili že v številnih študijah, v katerih so iskali gene, ki vplivajo na pojav osteoporoze in tveganje za zlom kosti, ker je MKG dedna in je pomemben ter merljiv klinični napovedovalec tveganja za zlom (40). Biokemijski kazalci tvorbe in razgradnje kosti pa so pomemben pokazatelj dogajanja v kosteh. Preiskovanke ženskega spola smo izbrali zato, ker je pri njih, predvsem po menopavzi, povišana izguba kostne mase zaradi pomanjkanja estrogenov in s tem povečana pojavnost osteoporoze. Ženske preiskovanke smo tako razdelili na premenopavzne in pomenopavzne preiskovanke, da bi ugotovili, kakšna je razlika v vplivih polimorfizmov A388G in T521C ter njunih haplotipov na vrednosti MKG in biokemijske kazalce kostne premene pri posamezni skupini. Pomenopavzne preiskovanke smo razdelili še na zdrave in osteoporozne. S tem smo želeli ugotoviti, če prisotnost teh polimorfizmov bolj ugodno vpliva na MKG in biokemijske kazalce kostne premene pri zdravih kot pri osteoporoznih

pomenopavznih preiskovankah. Skupino osteoporoznih preiskovank, eno leto zdravljenih z alendronatom, smo izbrali zato, da bi ugotovili morebiten vpliv polimorfizmov v OATP1B1 na potek zdravljenja z alendronatom. Vpliv na učinkovitost zdravljenja z alendronatom so v različnih študijah dokazali za genotipe v BsmI vitamin D receptorju (41) ter za polimorfizme v genu za osteoprotegerin (42). Skupini preiskovancev z nizko energijskim zlomom kolka in osteoatrozo smo izbrali zato, da bi ugotovili morebitne razlike v frekvencah polimorfizmov A388G in T521C ter njunih haplotipov med njima in v primerjavi z ostalimi skupinami preiskovancev. Izbrali smo tudi skupino moških preiskovancev, saj se tudi pri njih vedno pogosteje pojavlja obolenost z osteoporozo. Preiskovancem so zraven MKG in biokemičnih kazalcev kostne gostote izmerili še druge parametre (preglednica XI).

Preglednica XI: Srednje vrednosti in standardne deviacije izmerjenih parametrov (ITM – indeks telesne mase)

skupina	pomenopavzne preiskovanke	zdrave pomenopavzne preiskovanke	osteoporozne pomenopavzne preiskovanke	premenopavzne preiskovanke	moški
število	480	235	245	57	117
višina (cm)	159,9±6,2	161,2±5,8	158,7±6,2	163,8±6,2	171,1±5,9
starost (leta)	63±8,4	61,5±8,3	64,4±8,2	45,4±4,6	67,6±6,1
masa (kg)	69,7±12,2	73,6±13	66±10	65,4±11,8	81,7±12,8
ITM	27,3±4,6	28,3±5,1	26,2±3,8	24,3±4,1	27,9±3,8
pričetek menopavze (leto starosti)	49,5±4,2	49,8±4,1	48,8±4,5	/	/
trajanje menopavze (leta)	12,2±9,2	10,4±8,7	15,3±9,4	/	/

Nadaljevanje preglednice XI

skupina	preiskovanke, zdravljene z alendronatom	osteoporozni preiskovanci z zlomom kolka	preiskovanci z osteoatrozo
število	52	83	54
višina (cm)	157,3±4,9	161,6±9,3	164,9±7,2
starost (leta)	65,4±6,3	77,4±8,1	63,7±11,6
masa (kg)	65,8±9,7	68,7±12	76,1±14,1
ITM	26,6±3,7	26,2±3,7	27,9±4,6

Z analizo variance (ANOVO) smo najprej preverili, ali je razlika v katerem izmed parametrov v zgornjih tabelah med posameznimi genotipskimi skupinami. Če se je pri katerem izmed parametrov izkazalo, da obstajajo razlike, smo le-tega uporabili kot kovariato pri proučevanju vpliva genotipa na MKG z ANCOVO.

Genotipom in haplotipom v posameznih skupinah smo izračunali srednje vrednosti MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene ter preverili ali obstajajo statistično značilne razlike med njimi.

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati statističnih analiz za posamezne podskupine preiskovancev.

4.4.1 POMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V raziskavo smo vključili 480 pomenopavznih preiskovank. Z DXA so jim izmerili MKG kolka, vratu stegenice in ledvenih vretenc. V preglednicah XXVII do XXXVI so predstavljene srednje vrednosti oz. mediane in rezultati statistične analize vpliva polimorfizmov A388G in T521C ter njihovih haplotipov na MKG in biokemijske kazalce kostne premene.

Preglednica XII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem **A388G**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Genotip	AA	AG	GG	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,68 (0,61; 0,77) N=148	0,68 (0,61; 0,75) N=226	0,67 (0,63; 0,76) N=86	0,847
MKGtot [kg/m ²]	0,81 (0,73; 0,91) N=148	0,83 (0,75; 0,91) N=225	0,81 (0,74; 0,92) N=85	0,584
MKGls [kg/m ²]	0,81 (0,74; 1,07) N=148	0,83 (0,74; 1,06) N=224	0,84 (0,74; 1,12) N=86	0,741
RANKL [pmol/l]	0,20 (0,08; 1,15) N=55	0,30 (0,08; 0,88) N=77	0,30 (0,19; 0,83) N=30	0,986
OC [μg/l]	16,80 (10,3; 45,0) N=43	20,30 (14,0; 42,8) N=71	18,35 (14,0; 33,3) N=34	0,319
CTX [pmol/l]	3668,5 (2808,3; 6405,0) N=48	3690,0 (1924,0; 6687,0) N=79	4552,5 (2918,3; 6592,4) N=32	0,171
BALP [μg/l]	10,36 (7,97; 16,8) N=44	11,79 (9,50; 21,6) N=76	12,20 (8,96; 18,3) N=34	0,101
OPG* [pmol/l]	5,574 \pm 1,819 N=66	5,744 \pm 1,780 N=99	5,513 \pm 1,790 N=40	0,734

Brez zvezdice – Kruskal-Wallis test; * – ANOVA

S statistično analizo nismo ugotovili vpliva polimorfizma A388G na MKG-je in koncentracije biokemijskih kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah, kar je razvidno iz rezultatov v zgornji tabeli (vse p-vrednosti so večje od 0,05). Razlike v medianah med genotipskimi skupinami so vidne pri koncentracijah CTX in BALP, vendar sta p-vrednosti kljub temu 0,171 pri CTX in 0,101 pri BALP.

Preglednica XIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem **T521C**. (MKG_{fn} – MKG vratu stegenice; MKG_{tot} – MKG kolka; MKG_{ls} – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Genotip	TT	TC	CC	p-vrednost
MKG _{fn} * [kg/m ²]	0,68 (0,61; 0,76) N=308	0,67 (0,62; 0,75) N=139	0,73 (0,45; 0,78) N=12	0,329
MKG _{tot} * [kg/m ²]	0,82 (0,74; 0,91) N=308	0,81 (0,74; 0,90) N=137	0,91 (0,81; 0,94) N=12	0,234
MKG _{ls} * [kg/m ²]	0,83 (0,74; 0,98) N=306	0,81 (0,74; 0,90) N=139	0,83 (0,73; 1,0) N=12	0,672
RANKL* [pmol/l]	0,20 (0,08; 0,40) N=105	0,30 (0,10; 1,40) N=51	0,30 (0,29; 0,35) N=5	0,599
OC* [μg/l]	18,9 (13,1; 29,2) N=98	19,6 (14,1; 30,0) N=45	12,3 (8,68; 19,4) N=4	0,219
CTX [pmol/l]	4078,2 \pm 2053,7 N=99	3935,3 \pm 1940,4 N=53	3734,3 \pm 1703,2 N=6	0,861
BALP* [μg/l]	11,8 (9,1; 15,2) N=98	11,3 (8,5; 14,8) N=50	14,0 (9,5; 15,3) N=5	0,746
OPG [pmol/l]	5,787 \pm 1,772 N=135	5,320 \pm 1,782 N=64	6,214 \pm 2,152 N=5	0,177

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test

S statistično analizo smo ugotovili, da polimorfizem T521C pri skupini pomenopavznih preiskovank ne vpliva na MKG-je in biokemijske kazalce kostne premene.

Preglednica XIV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *1a**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Haplotip *1a	0 kopij	1 kopija	2 kopiji	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,67 (0,63; 0,78) N=90	0,68 (0,61; 0,75) N=232	0,68 (0,61; 0,77) N=136	0,682
MKGtot [kg/m ²]	0,81 (0,74; 0,93) N=89	0,83 (0,74; 0,91) N=231	0,81 (0,73; 0,91) N=136	0,683
MKGls [kg/m ²]	0,82 (0,74; 0,98) N=90	0,83 (0,74; 0,95) N=230	0,81 (0,74; 0,99) N=136	0,887
RANKL [pmol/l]	0,30 (0,20; 0,30) N=32	0,30 (0,06; 0,40) N=77	0,22 (0,09; 0,58) N=52	0,850
OC [μg/l]	18,20 (13,5; 24,9) N=35	20,50 (14,5; 32,1) N=72	15,95 (10,3; 27,5) N=40	0,138
CTX [pmol/l]	4252,0 (2861,0; 5942,0) N=35	3698,5 (1912,0; 5246,3) N=78	3697,0 (2959,5; 5477,0) N=45	0,263
BALP [μg/l]	11,79 (9,0; 15,57) N=35	11,79 (9,36; 15,02) N=78	10,48 (8,22; 13,15) N=40	0,243
OPG* [pmol/l]	5,643 \pm 1,868 N=42	5,654 \pm 1,754 N=100	5,652 \pm 1,823 N=62	0,999

Brez zvezdice – Kruskal-Wallis test; * – ANOVA

Preglednica XV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *1b**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovancev)

Haplotip *1b	0 kopij	1 kopija	2 kopiji	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,68 (0,62; 0,76) N=238	0,67 (0,61; 0,75) N=191	0,67 (0,63; 0,77) N=29	0,690
MKGtot [kg/m ²]	0,82 (0,74; 0,91) N=237	0,83 (0,74; 0,91) N=190	0,83 (0,73; 0,92) N=29	0,956
MKGls [kg/m ²]	0,81 (0,74; 0,96) N=238	0,83 (0,74; 0,96) N=189	0,84 (0,76; 1,01) N=29	0,461
RANKL [pmol/l]	0,30 (0,10; 0,44) N=91	0,30 (0,06; 0,30) N=60	0,20 (0,07; 0,23) N=10	0,424
OC [μg/l]	18,40 (11,0; 29,0) N=69	20,30 (15,1; 28,9) N=67	18,50 (14,8; 31,0) N=11	0,508
CTX* [pmol/l]	3907,4 \pm 1927,2 N=85	4179,2 \pm 2130,6 N=63	3930,6 \pm 1784,4 N=10	0,710
BALP [μg/l]	10,75 (8,61; 13,58) N=74	12,77 (9,89; 16,23) N=70	12,30 (7,45; 17,00) N=9	0,037
OPG* [pmol/l]	5,569 \pm 1,797 N=109	5,684 \pm 1,808 N=80	6,071 \pm 1,689 N=15	0,585

Brez zvezdice – Kruskal-Wallis test; * – ANOVA

Preglednica XVI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *15**. (MKG_{fn} – MKG vratu stegenice; MKG_{tot} – MKG kolka; MKG_{ls} – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Haplotip *15	0 kopij	1 kopija	2 kopiji	p-vrednost
MKG _{fn} * [kg/m ²]	0,68 (0,61; 0,76) N=319	0,67 (0,62; 0,75) N=133	0,73 (0,68; 0,78) N=6	0,430
MKG _{tot} * [kg/m ²]	0,82 (0,73; 0,91) N=319	0,81 (0,75; 0,91) N=131	0,89 (0,81; 0,93) N=6	0,408
MKG _{ls} * [kg/m ²]	0,83 (0,74; 0,97) N=317	0,81 (0,74; 0,93) N=133	0,94 (0,71; 1,08) N=6	0,424
RANKL [pmol/l]	0,20 (0,08; 0,40) N=108	0,30 (0,14; 0,40) N=53	/	0,307
OC [μg/l]	18,9 (13,05;30,1) N=101	18,8 (13,7; 28,2) N=46	/	0,804
CTX** [pmol/l]	4035,6 \pm 2047,8 N=102	3983,8 \pm 1912,6 N=56	/	0,876
BALP [μg/l]	11,73 (9,07;14,92) N=102	11,30 (9,00; 14,7) N=51	/	0,751
OPG** [pmol/l]	5,746 \pm 1,775 N=139	5,447 \pm 1,819 N=65	/	0,267

Brez zvezdice – Mann-Whitney test; * – Kruskal-Wallis test; ** – t-test

Pri pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili statistično značilnih razlik med MKG-ji in biokemijskimi kazalci kostne premene pri posameznih podskupinah haplotipa *1a.

S statistično analizo nismo dokazali vpliva haplotipa *1b na MKG-je pri pomenopavznih preiskovankah. Haplotip *1b pri pomenopavznih preiskovankah statistično značilno vpliva na koncentracijo BALP (p=0,037). Preiskovanke z eno ali dvema kopijama haplotipa *1b imajo višje serumske koncentracije BALP kot preiskovanke brez kopije. Iz tega bi lahko sklepali, da prisotnost haplotipa *1b poveča proces izgradnje kosti, saj je BALP biokemijski kazalec kostne tvorbe. Vpliva haplotipa *1b na ostale biokemijske kazalce kostne premene statistično nismo dokazali.

S statistično analizo nismo ugotovili povezave med haplotipom *15 in MKG-ji ter biokemijskimi kazalci kostne premene pri pomenopavznih preiskovankah.

Celotno skupino pomenopavznih preiskovank smo še dodatno razdelili na zdrave pomenopavzne preiskovanke in osteoporozne pomenopavzne preiskovanke. Za vsako skupino smo s statističnimi testi prav tako preverili, če polimorfizma A388G in T521C ter njuni haplotipi vplivajo na MKG in biokemijske kazalce kostne premene.

4.4.1.1 ZDRAVE POMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V preiskavo smo vključili 235 pomenopavznih preiskovank, ki niso zbolele za osteoporozo. Srednje vrednosti oz. mediane MKG-jev in biokemijskih kazalcev kostne premene ter p-vrednosti statistične analize za polimorfizma A388G in T521C ter njune haplotipe so podane v spodnjih tabelah.

Preglednica XVII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem **A388G**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Genotip	AA	AG	GG	p-vrednost
MKGfn* [kg/m ²]	0,75 (0,69; 0,81) N=72	0,74 (0,68; 0,83) N=111	0,76 (0,67; 0,83) N=42	0,942
MKGtot* [kg/m ²]	0,89 (0,83; 0,98) N=72	0,89 (0,83; 0,99) N=110	0,90 (0,81; 1,00) N=42	0,940
MKGls [kg/m ²]	0,996 \pm 0,118 N=72	0,971 \pm 0,136 N=110	0,998 \pm 0,176 N=42	0,461
RANKL* [pmol/l]	0,30 (0,14; 0,49) N=36	0,30 (0,12; 0,40) N=44	0,30 (0,20; 0,78) N=21	0,963
OC [μ g/l]	13,223 \pm 5,620 N=22	15,776 \pm 5,455 N=29	16,140 \pm 4,607 N=20	0,142
CTX* [pmol/l]	4017,2 \pm 1660,9 N=33	3482,3 \pm 1914,1 N=43	4414,2 \pm 1867,2 N=21	0,139
BALP [μ g/l]	9,389 \pm 2,275 N=15	13,551 \pm 4,874 N=15	12,930 \pm 2,867 N=11	0,007
OPG [pmol/l]	4,913 \pm 1,515 N=36	5,507 \pm 1,614 N=44	4,858 \pm 1,602 N=21	0,156

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test

Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili statistično značilnih razlik v genotipskih podskupinah polimorfizma A388G pri MKG-jih. Pri BALP smo z ANOVO ugotovili statistično značilne razlike v genotipskih podskupinah polimorfizma A388G pri zdravih pomenopavznih preiskovankah. Z post-hoc testom (Games-Howell) smo potrdili razlike med genotipskima podskupinama AA in AG ($p=0,019$) in med podskupinama AA in GG ($p=0,008$). Preiskovanke, ki vsebujejo en ali dva alela G, imajo torej višje koncentracije BALP kot tiste, ki vsebujejo dva alela A in s tem povečano tvorbo kosti.

Preglednica XVIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem **T521C**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Genotip	TT	TC	CC	p-vrednost
MKGfn* [kg/m ²]	0,75 (0,68; 0,83) N=153	0,75 (0,69; 0,83) N=65	0,78 (0,70; 0,87) N=5	0,877
MKGtot* [kg/m ²]	0,89 (0,83; 0,99) N=153	0,90 (0,81; 1,00) N=64	0,91 (0,85; 1,04) N=5	0,935
MKGls* [kg/m ²]	0,97 (0,87; 1,06) N=152	0,93 (0,83; 1,04) N=65	1,05 (0,94; 1,25) N=5	0,052
RANKL [pmol/l]	0,30 (0,10; 0,40) N=66	0,30 (0,20; 0,40) N=34	/	0,180
OC** [μg/l]	14,730 \pm 5,236 N=47	15,961 \pm 5,707 N=23	/	0,373
CTX** [pmol/l]	3871,0 \pm 1860,2 N=63	3879,2 \pm 1855,5 N=33	/	0,984
BALP [μg/l]	9,70 (8,22; 14,43) N=24	11,35 (10,1; 14,45) N=16	/	0,649
OPG** [pmol/l]	5,312 \pm 1,606 N=66	4,894 \pm 1,562 N=34	/	0,216

Brez zvezdice – Mann-Whitney test; * – Kruskal-Wallis test; ** – t-test

Polimorfizem T521C v genu za OATP1B1 pri zdravih pomenopavznih preiskovankah ne vpliva na MKG-je. Pri MKG ledvenih vretenc so sicer vidne razlike med podskupinami genotipov, vendar niso statistično značilne ($p=0,052$). Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili statistično značilnih razlik med genotipskimi podskupinami polimorfizma T521C pri biokemijskih kazalcih kostne premene. Pri le-teh smo združili genotipski podskupini TC in CC, ker je bilo pri slednji premalo število preiskovank za statistično analizo.

Preglednica XIX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *1a**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Haplotip *1a	0 kopij	1 kopija	2 kopiji	p-vrednost
MKGfn* [kg/m ²]	0,78 (0,68; 0,84) N=41	0,74 (0,68; 0,83) N=115	0,76 (0,69; 0,81) N=67	0,723
MKGtot* [kg/m ²]	0,92 (0,83; 1,01) N=41	0,89 (0,83; 0,99) N=114	0,89 (0,83; 0,97) N=67	0,690
MKGls [kg/m ²]	1,010 \pm 0,184 N=41	0,965 \pm 0,131 N=114	0,965 \pm 0,119 N=67	0,203
RANKL* [pmol/l]	0,30 (0,20; 0,30) N=21	0,30 (0,10; 0,40) N=46	0,30 (0,18; 0,55) N=33	0,716
OC [μ g/l]	15,955 \pm 4,858 N=20	15,683 \pm 5,611 N=29	13,595 \pm 5,464 N=21	0,293
CTX [pmol/l]	4407,7 \pm 1872,3 N=21	3048,0 \pm 1905,8 N=45	4155,9 \pm 1638,2 N=30	0,082
BALP [μ g/l]	12,557 \pm 2,978 N=11	13,309 \pm 5,150 N=15	9,611 \pm 2,184 N=14	0,031
OPG [pmol/l]	4,849 \pm 1,607 N=21	5,489 \pm 1,606 N=46	4,930 \pm 1,538 N=33	0,180

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test

Preglednica XX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *1b**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Haplotip *1b	0 kopij	1 kopija	2 kopiji	p-vrednost
MKGfn* [kg/m ²]	0,75 (0,69; 0,81) N=115	0,75 (0,67; 0,84) N=94	0,76 (0,67; 0,84) N=14	0,973
MKGtot* [kg/m ²]	0,89 (0,83; 0,97) N=114	0,89 (0,83; 1,00) N=94	0,90 (0,83; 1,00) N=14	0,905
MKGls [kg/m ²]	0,969 \pm 0,138 N=115	0,966 \pm 0,119 N=93	1,086 \pm 0,223 N=14	0,008
RANKL* [pmol/l]	0,30 (0,18; 0,50) N=55	0,30 (0,10; 0,30) N=39	0,20 (0,15; 0,23) N=6	0,166
OC [μ g/l]	14,158 \pm 5,594 N=33	16,190 \pm 5,493 N=31	15,050 \pm 2,338 N=6	0,325
CTX [pmol/l]	3879,4 \pm 1691,0 N=51	3855,3 \pm 2059,7 N=39	3946,8 \pm 2023,8 N=6	0,993
OPG [pmol/l]	4,974 \pm 1,513 N=55	5,422 \pm 1,674 N=39	5,327 \pm 1,854 N=6	0,399
BALP** [μ g/l]	10,017 \pm 2,365 N=23	14,231 \pm 4,562 N=17	/	0,002

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test; ** – t-test

Preglednica XXI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *15**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Haplotip *15	0 kopij	1 in 2 kopiji	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,749 (0,68; 0,83) N=158	0,747 (0,69; 0,84) N=65	0,817
MKGtot [kg/m ²]	0,89 (0,83; 0,99) N=158	0,90 (0,81; 1,00) N=64	0,891
MKGls* [kg/m ²]	0,980 \pm 0,132 N=157	0,963 \pm 0,157 N=65	0,421
RANKL [pmol/l]	0,30 (0,08; 0,40) N=69	0,30 (0,14; 0,40) N=31	0,315
OC* [μ g/l]	14,535 \pm 5,352 N=48	16,441 \pm 5,345 N=22	0,171
CTX* [pmol/l]	3814,6 \pm 1852,4 N=66	4004,2 \pm 1865,5 N=30	0,644
BALP [μ g/l]	9,54 (8,00; 14,15) N=25	11,50 (10,70; 14,50) N=15	0,315
OPG* [pmol/l]	5,287 \pm 1,596 N=69	4,910 \pm 1,590 N=31	0,278

Brez zvezdice – Mann-Whitney test; * – t-test

Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah s statistično analizo nismo potrdili vpliva haplotipa *1a na mineralne kostne gostote. Z ANOVO smo ugotovili statistično značilne razlike med podskupinami haplotipa *1a pri BALP ($p=0,031$). Zdrave pomenopavzne preiskovanke z nobeno ali eno kopijo haplotipa *1a imajo višje koncentracije BALP v serumu kot preiskovanke z dvema kopijama istega haplotipa. Te razlike smo pokazali tudi s Games-Howell post hoc testom ($p=0,049$ – med podskupinama 1 in 2; $p=0,034$ – med podskupinama 0 in 2).

Pri haplotipu *1b smo z ANOVO ugotovili statistično značilne razlike ($p=0,008$) v haplotipskih podskupinah pri srednjih vrednostih MKG ledvenih vretenc zdravih pomenopavznih preiskovank. S Scheffe post-hoc testom smo potrdili razlike med podskupino 2 in podskupinama 0 in 1 ($p_{0-2}=0,011$; $p_{1-2}=0,01$). Preiskovanke, ki imajo dve kopiji haplotipa *1b, imajo višje vrednosti MKG ledvenih vretenc kot preiskovanke z eno ali nobeno kopijo haplotipa *1b in s tem verjetno manjšo verjetnost za nastanek osteoporoze. Pri BALP smo ugotovili statistično značilne razlike v podskupinah haplotipa *1b ($p=0,002$) zdravih pomenopavznih preiskovank. Podskupina z nobeno kopijo haplotipa *1b ima značilno nižje serumske koncentracije BALP kot podskupina z eno oz. dvema

kopijama haplotipa *1b. Pri BALP smo združili haplotipski podskupini 1 in 2, zaradi majhnega števila slednjih.

Pri haplotipu *15 smo združili podskupini 1 in 2, saj je bilo v podskupini z dvema kopijama haplotipa *15 premalo preiskovank za statistično obdelavo. Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili vpliva haplotipa *15 na MKG-je in biokemijske kazalce kostne premene.

4.4.1.2 OSTEOPOROZNE POMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V raziskavo je bilo vključenih 245 pomenopavznih preiskovank, ki so zbolele za osteoporozo. V spodnjih tabelah so predstavljene srednje vrednosti oz. mediane MKG-jev in biokemijskih kazalcev kostne premene za polimorfizma A388G in T521C ter njune haplotipe.

Preglednica XXII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem **A388G**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Genotip	AA	AG	GG	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,624 \pm 0,080 N=76	0,624 \pm 0,085 N=115	0,631 \pm 0,074 N=44	0,732
MKGtot [kg/m ²]	0,742 \pm 0,086 N=76	0,763 \pm 0,104 N=115	0,756 \pm 0,095 N=43	0,357
MKGls* [kg/m ²]	0,743 (0,70; 0,84) N=76	0,747 (0,69; 0,84) N=114	0,754 (0,71; 0,85) N=14	0,487
RANKL* [pmol/l]	0,12 (0,0; 0,80) N=19	0,28 (0,03; 0,40) N=33	0,17 (0,01; 0,30) N=9	0,885
OC [μ g/l]	29,029 \pm 15,181 N=21	28,060 \pm 14,004 N=42	28,071 \pm 11,421 N=14	0,964
CTX* [pmol/l]	4225,0 (2167,0; 5627,0) N=15	4309,0 (2191,0 5644,3) N=36	5783,0 (2460,0; 6206,0) N=11	0,640
BALP* [μ g/l]	11,7 (9,0; 14,5) N=29	11,7 (9,3; 21,6) N=61	11,8 (8,6; 19,1) N=23	0,868
OPG [pmol/l]	6,367 \pm 1,857 N=30	5,933 \pm 1,897 N=55	6,236 \pm 1,742 N=19	0,562

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test

S statistično analizo nismo ugotovili statistično značilnih razlik posameznih genotipov polimorfizma A388G pri MKG-jih in pri biokemijskih kazalcih kostne premene.

Polimorfizem A388G v genu za OATP1B1 pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah torej ne vpliva na merjene parametre.

Preglednica XXIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem T521C. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Genotip	TT	TC	CC	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,623 \pm 0,075 N=155	0,619 \pm 0,083 N=74	0,677 \pm 0,157 N=7	0,274
MKGtot [kg/m ²]	0,751 \pm 0,093 N=155	0,755 \pm 0,095 N=73	0,840 \pm 0,158 N=7	0,216
MKGls*** [kg/m ²]	0,74 (0,70; 0,78) N=154	0,75 (0,69; 0,81) N=74	0,76 (0,67; 0,80) N=7	0,684
RANKL** [pmol/l]	0,30 (0,10; 0,40) N=66	0,30 (0,20; 0,40) N=34	/	0,693
OC* [μ g/l]	14,730 \pm 5,236 N=47	15,960 \pm 5,707 N=23	/	0,756
CTX* [pmol/l]	3871,0 \pm 1860,2 N=63	3879,2 \pm 1855,5 N=33	/	0,400
BALP** [μ g/l]	9,70 (8,22; 14,43) N=24	11,35 (10,1; 14,45) N=16	/	0,268
OPG** [pmol/l]	5,27 (4,13;6,33) N=66	4,83 (4,01;5,53) N=34	/	0,358

Brez zvezdice – ANCOVA; * – t-test; ** – Mann-Whitney test; *** – Kruskal-Wallis test

Pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili statistično značilnih razlik v genotipskih podskupinah polimorfizma T521C niti pri MKG-jih niti pri biokemijskih kazalcih kostne premene. Pri kazalcih kostne premene smo združili podskupini TC in CC, ker je slednja vsebovala premajhno število vzorcev za statistično obdelavo.

Preglednica XXIV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *1a**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Haplotip *1a	0 kopij	1 kopija	2 kopiji	p-vrednost
MKGfn** [kg/m ²]	0,64 (0,59; 0,68) N=49	0,61 (0,57; 0,68) N=117	0,62 (0,57; 0,66) N=69	0,217
MKGtot*** [kg/m ²]	0,763 \pm 0,106 N=48	0,756 \pm 0,100 N=117	0,746 \pm 0,085 N=69	0,644
MKGls** [kg/m ²]	0,76 (0,71; 0,81) N=49	0,75 (0,69; 0,79) N=116	0,74 (0,70; 0,78) N=69	0,325
RANKL** [pmol/l]	0,28 (0,02; 0,30) N=11	0,24 (0,0; 0,40) N=31	0,12 (0,0; 0,80) N=19	0,951
OC [μ g/l]	26,893 \pm 11,914 N=15	29,047 \pm 13,899 N=43	27,390 \pm 27,500 N=19	0,861
CTX [pmol/l]	4199,4 \pm 1979,5 N=14	4179,7 \pm 2102,1 N=33	4407,3 \pm 2701,9 N=15	0,945
BALP** [μ g/l]	11,75 (8,61; 16,3) N=24	11,74 (9,38; 15,0) N=63	11,71 (9,08; 14,6) N=26	0,936
OPG [pmol/l]	6,438 \pm 1,802 N=21	5,795 \pm 1,875 N=54	6,473 \pm 1,795 N=29	0,189

Brez zvezdice – ANOVA; * – t-test; ** – Kruskal-Wallis test; *** – ANCOVA

Preglednica XXV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *1b**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Haplotip *1b	0 kopij	1 kopija	2 kopiji	p-vrednost
MKGfn*** [kg/m ²]	0,625 \pm 0,087 N=123	0,618 \pm 0,075 N=97	0,646 \pm 0,067 N=15	0,746
MKGtot*** [kg/m ²]	0,757 \pm 0,096 N=123	0,752 \pm 0,100 N=96	0,754 \pm 0,090 N=15	0,561
MKGls** [kg/m ²]	0,74(0,69; 0,79) N=123	0,75 (0,70; 0,79) N=96	0,76 (0,71; 0,79) N=15	0,567
RANKL** [pmol/l]	0,14 (0,0; 0,40) N=36	0,30 (0,04; 0,35) N=21	0,13 (0,02; 0,99) N=3	0,800
OC [μ g/l]	28,586 \pm 15,302 N=36	28,139 \pm 13,086 N=36	27,80 \pm 6,431 N=5	0,987
CTX [pmol/l]	3949,3 \pm 2262,4 N=34	4705,5 \pm 2181,9 N=24	3906,2 \pm 1650,6 N=4	0,421
BALP** [μ g/l]	11,53 (9,0; 14,9) N=51	12,02 (9,79; 15,1) N=54	12,30 (6,64; 17,1) N=8	0,523
OPG [pmol/l]	6,175 \pm 1,872 N=54	5,932 \pm 1,915 N=41	6,568 \pm 1,465 N=9	0,613

Brez zvezdice – ANOVA; * – Mann-Whitney test; ** – Kruskal-Wallis test; *** – ANCOVA

Preglednica XXVI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah za **haplotip *15**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovank)

Haplotip *15	0 kopij	1 in 2 kopiji	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,621 \pm 0,077 N=161	0,629 \pm 0,091 N=74	0,186
MKGtot [kg/m ²]	0,748 \pm 0,094 N=161	0,768 \pm 0,103 N=73	0,143
MKGls* [kg/m ²]	0,75 (0,70; 0,78) N=160	0,75 (0,69; 0,80) N=74	0,756
RANKL* [pmol/l]	0,20 (0,0; 0,47) N=39	0,21 (0,0; 0,31) N=22	0,693
OC [μ g/l]	28,445 \pm 13,338 N=53	28,063 \pm 14,90 N=24	0,911
CTX [pmol/l]	4440,8 \pm 2338,3 N=36	3960,2 \pm 2002,5 N=26	0,400
BALP* [μ g/l]	11,8 (9,4; 15,4) N=77	11,2 (8,6; 14,9) N=36	0,373
OPG [pmol/l]	6,20 \pm 1,84 N=70	5,937 \pm 1,897 N=34	0,551

Brez zvezdice – t-test; * – Mann-Whitney test

Pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili vpliva haplotipa *1a na MKG-je in biokemijske kazalce kostne premene. Statistična analiza ni pokazala vpliva haplotipa *1b na MKG-je in biokemijske kazalce kostne premene pri osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah. Osteoporoznim pomenopavznim preiskovankam nismo mogli dokazati vpliva haplotipa *15 na MKG-je in biokemijske kazalce kostne premene. Haplotipsko podskupino z dvema kopijama haplotipa *15 smo združili s podskupino z eno kopijo haplotipa *15, ker je bilo v podskupini 2 majhno število vzorcev.

Za osteoporozne pomenopavzne preiskovanke nismo ugotovili vpliva polimorfizmov A388G in T521C na MKG in biokemijske kazalce kostne premene, medtem ko je pri zdravih preiskovankah prišlo do nekaj statistično značilnih rezultatov. Vzrok temu bi lahko bilo dejstvo, da je pri zdravih preiskovankah razpon MKG-jev večji (MKGfn=0,450-1,278 kg/m²; MKGtot=0,585-1,610 kg/m²; MKGls=0,621-1,567 kg/m²) kot pri osteoporoznih preiskovankah (MKGfn=0,366-0,884 kg/m²; MKGtot=0,472-1,043 kg/m²; MKGls=0,457-1,073 kg/m²).

4.4.2 PREISKOVANKE, ZDRAVLJENE Z ALENDRONATOM

V raziskavo smo vključili 52 pomenopavznih preiskovank, ki so bile eno leto zdravljene z alendronatom. Želeli smo ugotoviti, ali polimorfizma A388G in T521C ter njuni haplotipi v genu za OATP1B1 vplivajo na zdravljenje z alendronatom, ki spada v skupino bisfosfonatov. Vrednosti MKG in biokemijskih kazalcev kostne premene so jim izmerili pred in po zdravljenju. Iz teh vrednosti smo izračunali, koliko odstotkov začetne vrednosti so imeli parametri po enem letu zdravljenja.

Srednje vrednosti oz. mediane teh vrednosti in rezultati statistične analize vpliva polimorfizmov A388G in T521C ter njihovih haplotipov na MKG in biokemijske kazalce kostne premene so predstavljeni v preglednicah XXVII–XXXI.

Preglednica XXVII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za polimorfizem **A388G**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; d – odstotek začetne vrednosti parametra; N – število preiskovancev; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; DPYR – deoksipiridinolin)

Genotip	MKGfn [kg/m ²]	MKGtot [kg/m ²]	dMKGls [%]	dMKGtot [%]	dOC [%]	dBALP* [%]	dDPYR* [%]
AA	0,612 \pm 0,078 N=15	0,739 \pm 0,079 N=15	5,498 \pm 5,211 N=14	4,329 \pm 1,748 N=14	61,483 \pm 26,125 N=14	39,4 (31,6;47,6) N=10	97,3 (70,5;114,3) N=13
AG	0,608 \pm 0,100 N=24	0,726 \pm 0,120 N=24	6,694 \pm 3,938 N=19	4,463 \pm 4,402 N=19	54,827 \pm 17,686 N=19	39,9 (24,7;54,0) N=13	59,0 (46,4;77,9) N=22
GG	0,631 \pm 0,091 N=11	0,758 \pm 0,123 N=11	7,708 \pm 4,757 N=11	3,210 \pm 1,591 N=11	54,007 \pm 23,858 N=11	37,2 (27,3;46,0) N=10	48,0 (34,1;63,7) N=11
p	0,785	0,723	0,487	0,558	0,626	0,786	0,013

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test

S statistično analizo smo ugotovili razlike med genotipskimi podskupinami polimorfizma A388G pri dDPYR preiskovank, eno leto zdravljenih z alendronatom ($p=0,013$). Preiskovankam z genotipom AA so se vrednosti DPYR po enem letu manj znižale (za približno 3 % glede na začetno vrednost) kot preiskovankam z genotipom AG (za 41%) in GG (za 52 %). DPYR je kazalec kostne razgradnje, torej imajo preiskovanke z enim ali dvema aleloma G manj povečan proces razgradnje kosti kot preiskovanke z dvema aleloma A.

Preglednica XXVIII Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za polimorfizem **T521C**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; d – odstotek začetne vrednosti parametra; N – število preiskovancev; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; DPYR – deoksimiridinolin)

Genoti p	MKGfn [kg/m ²]	MKGtot [kg/m ²]	dMKGls* [%]	dMKGtot [%]	dOC* [%]	dBALP* [%]	dDPYR* [%]
TT	0,617 \pm 0,081 N=32	0,732 \pm 0,102 N=32	5,83 (4,05; 8,57) N=32	4,454 \pm 2,975 N=28	50,7 (47,2;64,2) N=28	38,7 (28,7;45,6) N=22	70,5 (48,1;104,8) N=30
TC + CC	0,611 \pm 0,108 N=18	0,746 \pm 0,122 N=18	5,42 (3,45; 9,52) N=18	3,501 \pm 3,441 N=16	53,6 (41,6;65,0) N=16	41,9 (23,0;51,2) N=11	48,5 (44,7; 77,8) N=16
p	0,830	0,662	0,526	0,340	0,770	0,789	0,166

Brez zvezdice – t-test; * – Mann-Whitney test

Za polimorfizem T521C nismo ugotovili statistično značilnih razlik v genotipskih podskupinah pri MKG-jih in biokemijskih kazalcih kostne premene preiskovank, zdravljenih z alendronatom. To pomeni, da polimorfizem T521C v genu za OATP1B1 ne vpliva na potek zdravljenja z alendronatom. Genotipski podskupini TC in CC smo združili zaradi majhnega števila vzorcev slednjih.

Preglednica XXIX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za **haplotip *1a**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; d – odstotek začetne vrednosti parametra; N – število preiskovancev; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; DPYR – deoksimiridinolin)

Haplotip *1a	MKGfn* [kg/m ²]	MKGtot* [kg/m ²]	dMKGls* [%]	dMKGtot [%]	dOC** [%]	dBALP** [%]	dDPYR** [%]
0 kopij	0,631 \pm 0,091 N=11	0,758 \pm 0,123 N=11	7,708 \pm 4,757 N=11	3,210 \pm 1,591 N=11	48,6 (40,9;60,4) N=11	37,2 (27,3;46,0) N=10	48,0 (34,1;63,7) N=11
1 kopija	0,609 \pm 0,100 N=26	0,729 \pm 0,117 N=26	6,143 \pm 4,342 N=21	4,553 \pm 4,189 N=21	54,0 (45,7;65,0) N=21	39,6 (24,7;61,4) N=15	60,6 (47,6;87,3) N=24
2 kopiji	0,611 \pm 0,074 N=13	0,734 \pm 0,081 N=13	6,263 \pm 4,922 N=12	4,149 \pm 1,822 N=12	50,7 (47,2;69,0) N=12	36,8 (29,6;43,0) N=8	97,3 (69,1;113,9) N=11
p	0,677	0,729	0,703	0,528	0,677	0,643	0,038

Brez zvezdice – ANOVA; * – ANCOVA; ** – Kruskal-Wallis test

Preglednica XXX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za **haplotip *1b**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; d – odstotek začetne vrednosti parametra; N – število preiskovancev; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; DPYR – deoksipiridinolin)

Haplotip *1b	MKGfn [kg/m ²]	MKGtot [kg/m ²]	dMKGls* [%]	dMKGtot [%]	dOC [%]	dBALP* [%]	dDPYR [%]
0 kopij	0,609 \pm 0,092 N=24	0,740 \pm 0,101 N=24	5,24 (3,11;8,66) N=21	3,981 \pm 3,081 N=21	59,21 \pm 22,44 N=21	38,9 (29,7;45,3) N=13	78,84 \pm 32,80 N=20
1 + 2 kopiji	0,620 \pm 0,091 N=26	0,734 \pm 0,117 N=26	6,34 (4,12;10,37) N=23	4,223 \pm 3,270 N=23	54,49 \pm 21,69 N=23	38,8 (25,7; 50,0) N=20	64,6 \pm 29,03 N=26
p	0,670	0,847	0,177	0,803	0,482	0,971	0,125

Brez zvezdice – t-test; * – Mann-Whitney test

Preglednica XXXI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kostnih kazalcev pri preiskovankah zdravljenih z alendronatom za **haplotip *15**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; d – odstotek začetne vrednosti parametra; N – število preiskovancev; OC – osteokalcin; BALP – kostna alkalna fosfataza; DPYR – deoksipiridinolin)

Haplotip *15	MKGfn [kg/m ²]	MKGtot [kg/m ²]	dMKGls [%]	dMKGtot [%]	dOC* [%]	dBALP* [%]	dDPYR* [%]
0 kopij	0,617 \pm 0,082 N=34	0,734 \pm 0,101 N=34	6,492 \pm 4,628 N=30	4,518 \pm 2,884 N=30	57,8 (47,4;66,0) N=30	38,9 (29,1;46,6) N=24	72,7 (51,3;106,5) N=32
1 + 2 kopiji	0,610 \pm 0,109 N=16	0,743 \pm 0,128 N=16	6,728 \pm 4,536 N=14	3,228 \pm 3,603 N=14	51,7 (39,4;65,0) N=14	35,9 (22,9;47,7) N=9	48,0 (44,0;61,9) N=14
p	0,798	0,798	0,875	0,209	0,724	0,442	0,028

Brez zvezdice – t-test; * – Mann-Whitney test

Pri pomenopavznih preiskovankah, zdravljenih z alendronatom smo potrdili vpliv haplotipa *1a na DPYR ($p=0,038$). Prisotnost haplotipa *1a povzroči manjše znižanje vrednosti DPYR po enem letu, kar pomeni večjo razgradnjo kosti. Pri tem imajo preiskovanke z dvema kopijama haplotipa *1a višje vrednosti kot tiste z eno kopijo.

Haplotip *1b pri preiskovankah, zdravljenih z alendronatom nima vpliva na MKG-je in biokemijske kazalce kostne premene. To smo potrdili s statistično analizo.

Z Mann-Whitney testom smo ugotovili statistično značilne razlike v podskupinah haplotipa *15 pri dDPYR ($p=0,028$). Preiskovankam brez kopije haplotipa *15 so se vrednosti DPYR manj znižale kot pri preiskovankah z eno ali dvema kopijama haplotipa *15. To verjetno pomeni, da prisotnost haplotipa *15 izboljša učinkovitost zdravljenja z alendronatom. Pri haplotipu *1b in *15 smo združili haplotipski podskupini z eno in

dvema kopijama, ker je bilo število preiskovank z dvema kopijama haplotipa *1b in *15 premalo za izvedbo statistične analize.

4.4.3 PREMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V raziskavo smo vključili 57 preiskovank, ki še niso prišle v menopavzo. Z DXA so jim izmerili MKG vratu stegenice (MKGfn), kolka (MKGtot) in ledvenih vretenc (MKGLs). V spodnjih tabelah so predstavljene srednje vrednosti oz. mediane MKG-jev in biokemijskih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične analize (p-vrednosti) vpliva polimorfizmov A388G in T521C ter njihovih haplotipov na MKG in kazalce kostne premene.

Preglednica XXXII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem **A388G**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGLs – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovancev)

Genotip	AA	AG	GG	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,790 \pm 0,063 N=15	0,770 \pm 0,081 N=29	0,787 \pm 0,090 N=10	0,687
MKGtot [kg/m ²]	0,915 \pm 0,071 N=15	0,915 \pm 0,088 N=28	0,915 \pm 0,115 N=10	1,000
MKGLs [kg/m ²]	0,993 \pm 0,112 N=15	1,010 \pm 0,104 N=29	0,968 \pm 0,126 N=10	0,569
RANKL* [pmol/l]	0,30 (0,20; 0,50) N=15	0,40 (0,30; 0,65) N=29	0,30 (0,20; 0,68) N=10	0,204
OC [μ g/l]	11,413 \pm 6,229 N=15	10,521 \pm 4,151 N=29	9,820 \pm 3,736 N=10	0,702
CTX [pmol/l]	3257,0 (2500,0; 3752,0) N=15	2225,0 (1398,5; 3704,0) N=29	2178,0 (1185,5 2864,0) N=9	0,065
BALP [μ g/l]	8,913 \pm 3,272 N=15	7,880 \pm 3,050 N=29	8,306 \pm 3,173 N=10	0,587
OPG [pmol/l]	312,6 \pm 73,28 N=15	314,3 \pm 43,89 N=29	318,9 \pm 66,78 N=10	0,964

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test

Za polimorfizem A388G v genu za OATP1B1 nismo ugotovili statistično značilnih razlik med genotipskimi podskupinami in MKG-ji ter biokemijskimi kazalci kostne premene. Pri CTX so opazne razlike v medianah med genotipsko podskupino AA in genotipskima podskupinama AG ter GG, vendar je bila izračunana p-vrednost nekoliko nad 0,05 in sicer

0,065. Pri skupini premenopavznih preiskovank torej ni vpliva polimorfizma A388G na MKG in biokemijske kazalce kostne premene.

Preglednica XXXIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in biokemijskih kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem **T521C**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovancev)

Genotip	TT	TC + CC	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,770 \pm 0,076 N=35	0,795 \pm 0,078 N=19	0,255
MKGtot [kg/m ²]	0,904 \pm 0,083 N=34	0,935 \pm 0,094 N=19	0,213
MKGls [kg/m ²]	0,998 \pm 0,113 N=35	0,997 \pm 0,105 N=19	0,969
RANKL* [pmol/l]	0,30 (0,30; 0,50) N=35	0,30 (0,20; 0,60) N=19	0,816
OC [μ g/l]	10,60 \pm 4,94 N=35	10,711 \pm 4,330 N=19	0,935
CTX [pmol/l]	2941,6 \pm 1516,8 N=35	2223,2 \pm 1005,3 N=18	0,076
BALP [μ g/l]	8,919 \pm 3,097 N=35	7,006 \pm 2,793 N=19	0,029
OPG [pmol/l]	321,0 \pm 60,81 N=35	303,1 \pm 47,03 N=19	0,270

Brez zvezdice – t-test; * – Mann-Whitney test

Srednje vrednosti oz. mediane mineralnih kostnih gostot niso statistično značilno različne med posameznimi genotipskimi podskupinami polimorfizma T521C.

S statistično analizo smo pri polimorfizmu T521C ugotovili statistično značilne razlike v srednjih vrednostih BALP med genotipskima podskupinama ($p=0,029$). Srednja vrednost BALP je nižja pri preiskovankah z genotipi TC in CC kot pri tistih z genotipom TT. Iz tega bi lahko zaključili, da prisotnost polimorfizma T521C vpliva na znižanje vrednosti BALP pri premenopavznih preiskovankah. Razlike v srednjih vrednostih so tudi pri CTX, vendar niso statistično značilne. Ker sta bili le dve preiskovanki v genotipski podskupini CC, smo jo združili z genotipsko podskupino TC.

Preglednica XXXIV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za **haplotip *1a**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovancev)

Haplotip *1a	0 kopij	1 kopija	2 kopiji	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,787 \pm 0,090 N=10	0,770 \pm 0,081 N=29	0,790 \pm 0,064 N=15	0,687
MKGtot [kg/m ²]	0,915 \pm 0,013 N=10	0,915 \pm 0,088 N=20	0,915 \pm 0,071 N=15	1,000
MKGls [kg/m ²]	0,968 \pm 0,126 N=10	1,010 \pm 0,104 N=29	0,993 \pm 0,112 N=15	0,569
RANKL* [pmol/l]	0,30 (0,20; 0,68) N=10	0,40 (0,30; 0,65) N=29	0,30 (0,20; 0,5) N=15	0,204
OC [μ g/l]	9,820 \pm 3,736 N=10	10,521 \pm 4,151 N=29	11,413 \pm 6,228 N=15	0,702
CTX [pmol/l]	2178,0 (1185,5; 2864,0) N=9	2225,0 (1398,5; 3704,0) N=29	3257,2 (2500,0; 3752,0) N=15	0,065
BALP [μ g/l]	8,306 \pm 3,173 N=10	7,880 \pm 3,050 N=29	8,912 \pm 3,272 N=15	0,587
OPG [pmol/l]	318,90 \pm 66,78 N=10	314,33 \pm 43,89 N=29	312,60 \pm 73,28 N=15	0,964

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test

Preglednica XXXV: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za **haplotip *1b**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovancev)

Haplotip *1b	0 kopij	1 + 2 kopiji	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,798 \pm 0,067 N=30	0,755 \pm 0,085 N=24	0,043
MKGtot [kg/m ²]	0,930 \pm 0,071 N=30	0,896 \pm 0,104 N=23	0,163
MKGls [kg/m ²]	0,994 \pm 0,107 N=30	1,002 \pm 0,115 N=24	0,785
RANKL* [pmol/l]	0,30 (0,28; 0,50) N=30	0,35 (0,30; 0,68) N=24	0,312
OC [μ g/l]	10,783 \pm 4,395 N=30	10,458 \pm 3,741 N=24	0,803
CTX [pmol/l]	2849,8 \pm 1424,7 N=29	2512,8 \pm 1370,9 N=24	0,389
BALP [μ g/l]	7,974 \pm 3,237 N=30	8,586 \pm 2,967 N=24	0,477
OPG [pmol/l]	311,25 \pm 61,50 N=30	319,0 \pm 50,65 N=24	0,621

Brez zvezdice – t-test; * – Mann-Whitney test

Preglednica XXXVI: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne premene pri premenopavznih preiskovankah za **haplotip *15**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B; OC – osteokalcin; CTX – C-terminalni telopeptid; BALP – kostna alkalna fosfataza; OPG – osteoprotegerin; N – število preiskovancev)

Haplotip *15	0 kopij	1 + 2 kopiji	p-vrednost
MKGfn [kg/m ²]	0,770 \pm 0,076 N=35	0,795 \pm 0,078 N=19	0,255
MKGtot [kg/m ²]	0,904 \pm 0,083 N=34	0,935 \pm 0,094 N=19	0,213
MKGls [kg/m ²]	0,998 \pm 0,113 N=35	0,997 \pm 0,105 N=19	0,969
RANKL* [pmol/l]	0,30 (0,30;0,50) N=35	0,30 (0,20; 0,60) N=19	0,816
OC [μ g/l]	10,60 \pm 4,940 N=35	10,71 \pm 4,330 N=19	0,935
CTX [pmol/l]	2941,6 \pm 1516,8 N=35	2223,2 \pm 1005,3 N=18	0,076
BALP [μ g/l]	8,919 \pm 3,097 N=35	7,006 \pm 2,793 N=19	0,029
OPG [pmol/l]	321,0 \pm 60,8 N=35	303,1 \pm 47,0 N=19	0,270

Brez zvezdice – t-test; * – Mann-Whitney test

Za haplotip *1a pri premenopavznih preiskovankah nismo ugotovili vpliva na MKG-je in biokemijske kazalce kostne premene. Pri CTX se srednje vrednosti razlikujejo med podskupinami z 2 kopijama haplotipa *1a ter z 0 in 1 kopijo haplotipa *1a, vendar ne statistično značilno ($p=0,065$).

Pri haplotipu *1b smo združili podskupini z eno in dvema kopijama haplotipa *1b, ker je bilo število preiskovank z dvema kopijama premajhno za statistično analizo. S pomočjo t-testa za dva neodvisna vzorca smo dokazali statistično značilne razlike v srednjih vrednosti MKG vratu stegenice med podskupino brez kopije haplotipa *1b in združeno podskupino z eno ali dvema kopijama haplotipa *1b ($p=0,043$). V slednji je srednja vrednost nekoliko nižja. To nam pove, da imajo premenopavzne preiskovanke z eno ali dvema kopijama haplotipa *1b nekoliko nižje vrednosti MKG vratu stegenice, kar bi lahko mogoče predstavljalo večje tveganje za pojav osteoporozе v starosti. Pri ostalih MKG-jih nismo ugotovili značilnih razlik med podskupinami haplotipa *1b. Vpliv haplotipa *1b na biokemijske kazalce kostne premene s statističnimi testi nismo mogli potrditi.

Iz preglednice XXXVI je razvidno, da haplotip *15 pri premenopavznih preiskovankah ne vpliva na MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc. Srednje vrednosti BALP se statistično značilno razlikujejo ($p=0,029$) v podskupinah brez kopije haplotipa *15 (8,919

$\mu\text{g/l}$) in združeno haplotipsko podskupino z eno in dvema kopijama haplotipa *15 (7,006 $\mu\text{g/l}$). Preiskovanke brez kopije haplotipa *15 imajo višje koncentracije BALP v serumu kot preiskovanke z eno ali dvema kopijama haplotipa *15.

4.4.4 MOŠKI PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 117 moških preiskovancev. Z DXA so jim bile izmerjene mineralna kostna gostota vratu stegenice (MKG_{fn}), kolka (MKG_{tot}), ledvenih vretenc (MKG_{ls}). Srednje vrednosti teh parametrov in rezultati statistične analize za polimorfizma A388G in T521C ter njune haplotipe so predstavljeni v preglednicah XXXVII – XL. Pri normalno porazdeljenih spremenljivkah smo v tabelah podali srednje vrednosti in standardne deviacije, pri nenormalno porazdeljenih spremenljivkah smo pa v tabelah podali mediane ter 25. in 75. percentil.

Preglednica XXXVII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških za polimorfizma A388G in T521C. (MKG_{fn} – MKG vratu stegenice; MKG_{tot} – MKG kolka; MKG_{ls} – MKG ledvene vretence; N – število preiskovancev)

	A388G				T521C			
	AA	AG	GG	p	TT	TC	CC	p
MKG _{fn} [kg/m ²]	0,834 \pm 0,189 N=24	0,811 \pm 0,157 N=37	0,789 \pm 0,114 N=23	0,621	0,822 \pm 0,169 N=47	0,785 \pm 0,149 N=30	0,854 \pm 0,054 N=7	0,444
MKG _{tot} [kg/m ²]	1,045 \pm 0,194 N=24	1,003 \pm 0,137 N=37	1,04 \pm 0,166 N=23	0,547	1,017 \pm 0,169 N=47	1,035 \pm 0,169 N=30	1,033 \pm 0,073 N=7	0,881
MKG _{ls} [kg/m ²]	1,048 \pm 0,168 N=28	1,075 \pm 0,192 N=58	1,039 \pm 0,150 N=24	0,653	1,058 \pm 0,168 N=59	1,045 \pm 0,195 N=43	1,166 \pm 0,107 N=8	0,204

Statistična analiza ni pokazala značilnih razlik v srednjih vrednostih oz. medianah MKG niti pri polimorfizmu A388G niti pri polimorfizmu T521C, saj so bile p-vrednosti pri vseh parametrih večje od 0,05. Polimorfizma A388G in T521C v genu za OATP1B1 ne vplivata na MKG pri moških preiskovancih.

Preglednica XXXVIII: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških za **haplotip *1a**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; N – število preiskovancev)

Haplotip *1a	MKGfn [kg/m ²]	MKGtot [kg/m ²]	MKGls [kg/m ²]
0	0,798 \pm 0,114 N=25	1,042 \pm 0,160 N=25	1,057 \pm 0,157 N=27
1	0,807 \pm 0,157 N=37	1,00 \pm 0,138 N=37	1,071 \pm 0,191 N=58
2	0,835 \pm 0,195 N=22	1,046 \pm 0,201 N=22	1,041 \pm 0,167 N=25
p	0,696	0,476	0,779

Preglednica XXXIX: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških za **haplotip *1b**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; N – število preiskovancev)

Haplotip *1b	MKGfn [kg/m ²]	MKGtot [kg/m ²]	MKGls [kg/m ²]
0	0,835 \pm 0,167 N=47	1,041 \pm 0,160 N=47	1,069 \pm 0,180 N=63
1	0,762 \pm 0,135 N=31	0,989 \pm 0,173 N=31	1,050 \pm 0,185 N=41
2	0,886 \pm 0,101 N=6	1,077 \pm 0,094 N=6	1,045 \pm 0,072 N=6
p	0,060	0,270	0,856

Preglednica XL: Srednje vrednosti \pm SD / mediane (25. in 75. percentil) in p vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških za **haplotip *15**. (MKGfn – MKG vratu stegenice; MKGtot – MKG kolka; MKGls – MKG ledvene vretence; N – število preiskovancev)

Haplotip *15	MKGfn [kg/m ²]	MKGtot* [kg/m ²]	MKGls [kg/m ²]
0	0,822 \pm 0,166 N=49	1,04 (0,70; 0,92) N=49	1,060 \pm 0,168 N=62
1	0,790 \pm 0,150 N=30	1,01 (0,69; 0,87) N=30	1,051 \pm 0,197 N=43
2	0,835 \pm 0,053 N=5	1,00 (0,78; 0,88) N=5	1,145 \pm 0,072 N=5
p	0,645	0,977	0,535

Brez zvezdice – ANOVA; * – Kruskal-Wallis test

Pri moških preiskovancih nismo za noben haplotip ugotovili statistično značilnih razlik med srednjimi vrednostmi oz. medianami mineralnih kostnih gostot v posameznih haplotipskih skupinah. Največje razlike v srednjih vrednostih MKG vratu stegenice so imeli preiskovanci pri haplotipu *1b (p=0,06), in sicer med podskupinama z eno ali dvema kopijama tega haplotipa.

4.4.5 PREISKOVANKE Z ZLOMOM KOSTI

Skupino z zlomi smo razdelili na preiskovanke z osteoartrozo (N=54) in preiskovanke z osteoporozo, ki so doživele nizko energijski zlom kolka (N=83). S pomočjo Pearsonovega χ^2 -testa smo ugotavljali razliko v frekvenci genotipov med osteoporoznimi preiskovankami z zlomom kolka in ostalimi skupinami preiskovancev (preglednica XLI). Zaradi boljše preglednosti smo posamezne skupine preiskovancev označili s številkami, in sicer:

- Skupina 1 – preiskovanke z osteoartrozo
- Skupina 2 – moški preiskovanci
- Skupina 3 – pomenopavzne preiskovanke
- Skupina 4 – zdrave pomenopavzne preiskovanke
- Skupina 5 – osteoporozne pomenopavzne preiskovanke

Preglednica XLI: Rezultati χ^2 -testa (p-vrednosti) med osteoporoznimi preiskovankami z zlomom kolka in s posamezno skupino preiskovank za polimorfizma A388G in T521C ter njune haplotipe.

χ^2 -test	Skupina osteoporoznih preiskovank z zlomom kolka primerjana s				
	Skupino 1	Skupino 2	Skupino 3	Skupino 4	Skupino 5
A388G	0,346	0,414	0,829	0,852	0,841
T521C	0,396	0,272	0,386	0,324	0,548
Hapl. *1a	0,929	0,691	0,828	0,718	0,939
Hapl. *1b	0,397	0,936	0,645	0,641	0,716
Hapl.*15	0,926	0,430	0,347	0,261	0,505

S statistično analizo smo ugotovili, da ni statistično značilnih razlik v frekvencah genotipov polimorfizmov A388G in T521C ter njihovih haplotipov med osteoporoznimi preiskovankami z nizko energijskim zlomom kolka in ostalimi skupinami preiskovancev.

Do sedaj je bilo narejenih že več študij, v katerih so v nasprotju z našo analizo ugotovili vpliv polimorfizmov v različnih genih na tveganje za osteoporozni zlom. Tako so na primer znanstveniki dokazali, da polimorfizem v genu za kolagen tipa 1 α 1 poveča tveganje za osteoporozni zlom (43). Tudi za polimorfizem C677T v genu za metilen tetrahidrofolat reduktazo so ugotovili vpliv na povečanje tveganja za osteoporozni zlom (44).

4.4.6 POVZETEK STATISTIČNO ZNAČILNIH REZULTATOV

Preglednica XLII: Združeni signifikantni rezultati. (↑ – prisotnost polimorfizma/haplotipa povzroči povišanje vrednosti parametra; ↓ – prisotnost polimorfizma/haplotipa povzroči znižanje vrednosti parametra; manj ↓ – prisotnost polimorfizma/haplotipa povzroči manjše znižanje vrednosti parametra; bolj ↓ – prisotnost polimorfizma/haplotipa povzroči večje znižanje vrednosti parametra)

	Pomenopavzne preiskovanke	Zdrave pomenopavzne preiskovanke		Premenopavzne preiskovanke		Preiskovanke, zdravljene z alendronatom
		MKGls [kg/m ²]	BALP [μg/l]	MKGfn [kg/m ²]	BALP [μg/l]	
A388G	-	-	↑	-	-	bolj ↓
T521C	-	-	-	-	↓	-
Hapl *1a	-	-	↓	-	-	manj ↓
Hapl *1b	↑	↑	↑	↓	-	-
Hapl *15	-	-	-	-	↓	bolj ↓

5 SKLEP

V diplomskem delu smo ugotavljali vpliv polimorfizmov A388G (N130D) in T521C (V174A) v genu za OATP1B1 na MKG in biokemijske kazalce kostne premene. Naša hipoteza je bila, da prisotnost teh polimorfizmov oz. njunih haplotipov povzroči večjo serumsko koncentracijo estron sulfata in estradiol glukuronida, kar bi imelo za posledico večjo MKG in s tem manjše tveganje za pojav osteoporoze. Do sedaj še ni bila narejena nobena študija, ki bi proučevala vpliv teh polimorfizmov v genu za OATP1B1 na pojavnost osteoporoze.

- Frekvenca mutiranega alela polimorfizma A388G pri Slovencih je bila 44,3%, polimorfizma T521C pa 20,3%, kar je znotraj intervala, ki so ga določili za Kavkazijce nasploh (30–51 % za polimorfizem A388G in 14–22 % za polimorfizem T521).
- Pri pomenopavznih preiskovankah smo s statistično analizo ugotovili vpliv haplotipa *1b na koncentracijo BALP ($p=0,037$). Preiskovanke z eno ali dvema kopijama haplotipa *1b imajo značilno višje vrednosti BALP kot tiste brez prisotnosti haplotipa*1b. To kaže na povečano izgradnjo kosti, saj je BALP kazalec kostne tvorbe.
- Zdrave pomenopavzne preiskovanke s polimorfizmom A388G in haplotipom *1b so imele višje koncentracije BALP v serumu ($p_{A388G}=0,007$ in $p_{hapl*1b}=0,002$). Prisotnost haplotipa *1a ima za posledico nižje serumske koncentracije BALP ($p=0,031$). Preiskovanke s haplotipom *1b so imele statistično značilno višje vrednosti MKG ledvenih vretenc ($p=0,008$). Pri zdravih pomenopavznih preiskovankah s polimorfizmom A388G ter haplotipom *1b je bilo torej opaziti večjo tvorbo kostnega tkiva, pri tistih s haplotipom *1a pa je bila le-ta nekoliko nižja.
- Pri preiskovankah, zdravljenih z alendronatom smo potrdili vpliv polimorfizma A388G ter haplotipov *1a in *15 na DPYR. Preiskovankam s polimorfizmom A388G in haplotipom *15 so se vrednosti DPYR po enem letu bolj znižale, kar pomeni, da je bila razgradnja kosti nekoliko manjša. Preiskovankam s haplotipom *1a pa zvišale. To nakazuje na povečano razgradnjo kosti.

- Pri moških in osteoporoznih pomenopavznih preiskovankah nismo ugotovili vpliva polimorfizmov A388G in T521C ter njunih haplotipov na MKG in biokemijske kazalce kostne premene.
- Pri premenopavznih preiskovankah smo ugotovili vpliv polimorfizma T521C in haplotipa *15 na znižanje koncentracije BALP ($p_{T521C}=0,029$, $p_{hapl*15}=0,029$) ter vpliv haplotipa *1b na MKG vratu stegenice (preiskovanke z eno ali dvema kopijama haplotipa *1b imajo nižjo MKG ($p=0,043$)). BALP je kazalec kostne tvorbe, kar pomeni, da je pri premenopavznih preiskovankah s polimorfizmom T521C ali haplotipom *15 proces izgradnje kosti nekoliko nižji.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da polimorfizma T521C in A388G ter njuni haplotipi deloma vplivajo na MKG in biokemijske kazalce kostne premene (predvsem BALP). To drži predvsem za zdrave pomenopavzne in deloma za premenopavzne preiskovanke. Ne moremo pa zaključiti, da bi to imelo bistven vpliv na obolelost z osteoporozo.

Znano je, da je osteoporozna večfaktorska in poligenska bolezen, k pojavnosti katere mogoče delno prispevata tudi polimorfizma T521C in A388G v genu za OATP1B1. Za bolj izčrpne rezultate bi bilo potrebno raziskavo izvesti še na večjem številu preiskovancev.

6 LITERATURA

1. Elisabeth Dienstl, W.M.: Osteoporoza: izginjevanje kostne mase: pravilna preventiva, načrtno zdravljenje, Mavrica, Celje, 1999.
2. Andreja Kocijančič, F.M.: Interna medicina, EWO, d.o.o., Ljubljana, 1998: 723-729.
3. *The Internet ENCYCLOPEDIA OF SCIENCE: Bone*. Dostopno na: www.daviddarling.info/encyclopedia/B/bone.html
4. Raisz, L.G.: Physiology and Pathophysiology of bone remodeling. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(8): 1353-1358.
5. H. Kalervo Väänänen*, H.Z., Mika Mulari and Jussi M. Halleen: The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*, 2000, 113: 377-381.
6. *Bone Remodeling Cycle*. Dostopno na: www.umich.edu/Release/2005/Feb05/bone.html.
7. Reiner Bartl, B.F., Emmo von Tresckow, Christoph Bartl: Bisphosphonates in Medical Practice, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2007.
8. Nakamura, T., et al.: Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 2007, 130(5): 811-23.
9. H.P. Rang, M.M.D., J.M. Ritter, R.J. Flower: Rang and Dale's Pharmacology, Churchill, Livingstone, vol. 6, Edinburgh, 2007.
10. Zhu, B.T. and A.H. Conney: Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, 1998, 19(1): 1-27.
11. Raftogianis, R., et al.: Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2000(27): 113-24.
12. Novack, D.V.: Estrogen and bone: osteoclasts take center stage. *Cell Metab*, 2007, 6(4): 254-6.
13. Slemenda Charles , L.C., Peacock Munro, Hui Siu, Johnston C. Conrad: Sex Steroids, Bone Mass, and Bone Loss. A Prospective Study of Pre-, Peri-, and Postmenopausal Women. *J. Clin. Invest*, 1995, 97(1): 14-21.

14. Susan A. Krum, G.A.M.-C., Peter V. Hauschka, Jason S Carroll, Timothy F. Lane: Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoklast survival. *The EMBO Journal*, 2008(27): 535-545.
15. Mischa Muir, G.R., Lutz Wolf, Walter Elger, Hans-Udo Schweikert: Estrone Sulfate Is a Major Source of Local Estrogen Formation in Human Bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004, 89(9): 4685-4692.
16. *Osteoporozna kost*. Dostopno na: <http://www.k-centar.hr/osteoporoza.php>.
17. Franić, D.: Novi vidiki diagnostike in zdravljenja osteoporoze. *Zdravstveni vestnik*, 2009, 78: 143-150.
18. Stuart H. Ralston, B.d.C.: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes & Development*, 2006, 60: 2492-2506.
19. Francis, R.M.: *Osteoporosis, pathogenesis and management*, Kluwer academia publishers, Lancaster, 1990.
20. Carl A. Burtis, E.R.A.: *Tietz fundamentals of clinical chemistry*, 5th, W.B. SAUNDERS COMPANY, Philadelphia, 2001: 795-821.
21. Prenzel J, K.A.: Ultrazvočna opredelitev osteoporoze. *Zrav Vestn*, 1999: 285-352.
22. Seibel, M.J.: Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clinical Biochemistry Review*, 2005, 26: 97-122.
23. Kocijančič, A.: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. *Zdravstveni vestnik*, 2002, 71: 571-573.
24. Pasanen, M.: *Pharmacogenetics of SLCO1B1: population genetics and effect on Statins*. Academic dissertation, 2008.
25. Kim, S.R., et al.: Genetic variations and frequencies of major haplotypes in SLCO1B1 encoding the transporter OATP1B1 in Japanese subjects: SLCO1B1*17 is more prevalent than *15. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2007, 22(6): 456-61.
26. Rommel G. Tirona, B.F.L., Gracia Merino, Richard B Kim: Polymorphisms in OATP-C. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(38): 35669-35675.
27. Mahagita, C., et al.: Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(1): G271-8.

28. Ostanek, B.: Genetika in farmakogenetika Gilbertovega sindroma. Farmacevtski vestnik, 2009, 60(1): 3-7.
29. Kameyama, Y., et al.: Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1*5, SLCO1B1*15 and SLCO1B1*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. Pharmacogenet Genomics, 2005, 15(7): 513-22.
30. van der Deure, W.M., et al.: Organic anion transporter 1B1: An important factor in hepatic thyroid hormone and estrogen transport and metabolism. Endocrinology, 2008, 149(9): 4695-701.
31. Jindal, C., et al.: Organic anion transporter protein (OATP1B1) encoded by SLCO1B1 gene polymorphism (388A>G) & susceptibility in gallstone disease. Indian J Med Res, 2009, 129(2): 170-5.
32. Michalski, C., et al.: A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. J Biol Chem, 2002, 277(45): 43058-63.
33. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res, 1988, 16(3): 1215.
34. Konietzny Ursula, R.G.: The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. Brazilian Journal of Microbiology, 2003, 34(4): 283-300.
35. Borut Štrukelj, J.K., *BIOLOŠKA ZDRAVILA: OD GENA DO UČINKOVINE*. 2007, Slovensko farmacevtsko društvo: Ljubljana. p. 55-58.
36. Arko, B.: Tehnologija PCR v reanem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farmacevtski vestnik, 2004, 55: 215-220.
37. *The KASP SNP Genotyping Manual v 3.0*. Dostopno na: http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP_manual.pdf.
38. Peter Scheinert, B.B., Dietmar Kahle: Optimierungstrategien bei der DNA-Amplifikation. LaborPraxis, 1995: 50-52.
39. Kristin G. Ardlie, L.K., Mark Seielstad: Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. NATURE REVIEWS GENETICS, 2002, 3: 299-309.
40. Hirschhorn, J.N. and L. Gennari: Bona fide genetic associations with bone mineral density. N Engl J Med, 2008, 358(22): 2403-5.

41. Palomba Stefano, O.F.J.T.R., Angela Falbo, Achille Tolino, Francesco Manguso, Vincenzo Nunziata: Bsm1 vitamin D receptor genotypes influence the efficacy of antiresorptive treatments in postmenopausal osteoporotic women. A 1-year multicenter, randomized and controlled trial. *Osteoporos Int*, 2004, 16(8): 943-952.
42. Wang C, H.J., Qin YJ, Zhang H, Hu WW, Liu YJ, Zhang ZL: Osteoprotegerin gene polymorphism and therapeutic response to alendronate in postmenopausal women with osteoporosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009, 89(42): 2958-62.
43. Uitterlinden G. Andre, D.P., et al.: Relation of alleles of the collagen type *Ia1* gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine*, 1998, 338(15): 1016-21.
44. Bathum Lise, v.B.H.J., Christiansen Lene, Skov Madsen Jonna, Skytthe Axel, Christensen Kaare: Evidence for an association of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and an increased risk of fractures: results from a population-based Danish twin study. *Osteoporos Int*, 2003, 15: 659-664.