

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**METKA KOŠIR**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**PRIMERJAVA IZRAŽANJA GENOV LIPE, LPL, FASN V KOSTNEM TKIVU  
BOLNIKOV Z OSTEOPOROZO IN OSTEOARTRITISOM**

**COMPARISON OF LIPE, LPL, FASN GENES EXPRESSION IN BONE TISSUE  
OF PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS AND OSTEOARTROSIS**

**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Ljubljana, 2012**

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom doc. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. Meritve mineralne kostne gostote so opravili v Splošni bolnišnici Celje.

#### ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Matjažu Jerasu in delovni mentorici asist. Jani Dragojevič za strokovno vodenje skozi delo v laboratoriju, pomoč pri nastalih težavah, potrpežljivost in vse nasvete, ki so mi bili v pomoč pri diplomskem delu. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo za vso prijaznost in pomoč.

Zahvaljujem se tudi svojemu prijatelju Milanu ter vsem bližnjim, ki so me podpirali in mi stali ob strani med nastajanjem diplomske naloge.

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

Ljubljana, marec 2012

Metka Košir

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član komisije: doc. dr. Mitja Kos

# VSEBINA

VSEBINA.....	I
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
POVZETEK.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX
1. UVOD.....	1
1.1. Funkcija kosti.....	1
1.1.1. Zgradba kosti.....	1
1.1.2. Kostna remodelacija.....	3
1.2. Osteoporoza.....	5
1.2.1. Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze.....	6
1.2.2. Oblike osteoporoze.....	6
1.2.3. Diagnoza.....	7
1.2.4. Preprečevanje.....	8
1.2.5. Zdravljenje.....	8
1.3. Osteoartroza.....	8
1.3.1. Dejavniki, ki vplivajo na nastanek osteoartroze.....	9
1.3.2. Znaki osteoartroze.....	10
1.3.3. Diagnoza bolezni.....	10
1.3.4. Zdravljenje.....	10
1.4. Adipociti.....	11
1.4.1. Proces lipogeneze.....	14

1.4.1.1.	Sintaza maščobnih kislin .....	15
1.4.2.	Proces lipolize .....	15
1.4.2.1.	Hormonsko senzitivna lipaza (HSL) .....	16
1.4.2.2.	Lipoproteinska lipaza (LPL).....	17
2.	NAMEN DELA .....	18
3.	METODE IN MATERIALI .....	19
3.1.	Splošna opozorila .....	19
3.2.	Preiskovanci .....	19
3.3.	Merjenje mineralne kostne gostote.....	19
3.4.	Vzorci .....	19
3.5.	Določanje izražanja genov.....	20
3.5.1.	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času .....	20
3.5.1.1.	Načini detekcije:.....	22
3.5.2.	Priprava zmesi za PCR in reakcijski pogoji .....	24
3.5.3.	Materiali in oprema .....	26
3.5.3.1.	Reagenti:.....	26
3.5.3.2.	Aparature in pribor: .....	27
3.6.	Statistične metode.....	27
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	29
4.1.	Opis skupin preiskovancev .....	29
4.2.	Primerjava parametrov $\mu$ CT z meritvami MKG.....	30
4.3.	Analiza izražanja preiskovanih genov .....	33
4.4.	Izražanje genov FASN, LIPE in LPL v kostnem tkivu bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo ter preiskovancem v kontrolni skupini .....	35
4.5.	Korelacijska analiza izražanja genov in parametrov $\mu$ CT ter vrednosti MKG .....	36
5.	SKLEP.....	39

LITERATURA.....	41
PRILOGA.....	45

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz procesa remodelacije kosti.....	4
Slika 2: Shematski prikaz poteka reakcije PCR .....	22
Slika 3: Detekcija z barvilom SYBR® Green .....	23
Slika 4: Shematski prikaz detekcije specifično pomnoženih produktov s sondo TaqMan® .....	23
Slika 5: Primerjava parametrov $\mu$ CT izmerjenih v vsaki od treh skupin preiskovancev ....	31
Slika 6: Talilna krivulja pomnoženega produkta za gen FASN.....	33
Slika 7: Rezultat reakcije PCR v realnem času za gen FASN, izmerjen z aparatom Light Cycler 480. ....	34
Slika 8: Rezultat reakcije PCR v realnem času za gen LPL , izmerjen z aparatom Light Cycler 480. ....	34
Slika 9: Primerjava obsegov izražanja genov za LIPE, LPL in FASN, v vseh treh preiskovalnih skupinah.....	36

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Primerjava kortikalnega in trabekularnega kostnega tkiva .....	1
Preglednica II: Sistemski dejavniki oziroma hormoni, ki so vpleteni v kostno remodelacijo .....	4
Preglednica III: Lokalni dejavniki, ki vplivajo na kostne celice .....	5
Preglednica IV: Vzroki za nastanek sekundarne osteoporoze.....	7
Preglednica V: Sestavine reakcijske zmesi s sondami in njihove količine, potrebne za eno reakcijo qPCR za gena GAPDH in LPL.....	24
Preglednica VI: Sestavine reakcijske zmesi z oligonukleotidnimi začetniki in njihove količine, potrebne za eno reakcijo za gene FASN, RPLP0 (100nM) in LIPE (300nM). ....	24
Preglednica VII: Reakcijski pogoji za delo s sondami TaqMan. ....	25
Preglednica VIII: Reakcijski pogoji za delo z oligonukleotidnimi začetniki.....	25
Preglednica IX: Zaporedja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. ....	26
Preglednica X: Porazdelitev preiskovancev v skupine, glede na spol.....	29
Preglednica XI: Klinični podatki preiskovancev v posameznih skupinah. ....	29
Preglednica XII: Korelacija med $\mu$ CT in MKG kolka v celotni skupini preiskovancev z osteoporozo in osteoartrozo.....	32
Preglednica XIII: Prikaz korelacije med vrednostmi parametrov $\mu$ CT in izraženostjo preiskovanih genov pri kontrolni skupini.....	37
Preglednica XIV: Prikaz korelacije med vrednostmi parametrov $\mu$ CT in izraženostjo preiskovanih genov pri preiskovancih z osteoporozo. ....	37
Preglednica XV: Prikaz korelacije med vrednostmi MKG in izraženostjo preiskovanih genov pri preiskovancih z osteoporozo. ....	38
Preglednica XVI: Prikaz korelacije med vrednostmi parametrov $\mu$ CT in izraženostjo preiskovanih genov pri preiskovancih z osteoartrozo .....	38
Preglednica XVII: Prikaz korelacije med vrednostmi MKG in izraženostjo preiskovanih genov pri preiskovancih z osteoartrozo .....	38

## POVZETEK

Kostnina ima eno ključnih vlog v človeškem telesu, saj mu daje oporo, skupaj z mišicami pa omogoča gibanje. Poleg tega ima tudi pomembno metabolno funkcijo. Za njeno ohranitev se ves čas vrši proces kostne remodelacije, v katerem osteoklasti kostnino razgrajujejo, osteoblasti pa jo tvorijo. S staranjem ali zaradi drugih dejavnikov se poruši ravnovesje med tema procesoma, kar vodi do različnih bolezni. Najpogostejša je osteoporoza, za katero sta značilni zmanjšana mineralna kostna gostota in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva. Pomembna je tudi osteoartroza, pri kateri pa je mineralna kostna gostota povišana.

V dosedanjih študijah so predpostavili, da lahko adipociti v kostnem mozgu z izločanjem maščobnih kislin vplivajo na remodelacijo kosti preko zaviranja proliferacije in zmanjševanja preživetja osteoblastov ter s povečevanjem aktivnosti osteoklastov. V diplomski nalogi smo preučevali izražanje genov FASN, LPL in LIPE, ki kodirajo encime, udeležene v sintezi in razgradnji maščobnih kislin. Lipoproteinska lipaza (LPL) sodeluje v privzemu prostih maščobnih kislin, hormon senzitivna lipaza (LIPE) pri sproščanju le teh iz adipocitov, sintaza maščobnih kislin (FASN) pa katalizira tvorbo višjih maščobnih kislin.

V raziskavo smo vključili 112 preiskovancev, ki smo jim izmerili mineralno kostno gostoto (MKG) in parametre mikroročunalniške tomografije ( $\mu$ CT). Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času pa smo izmerili izražanje genov LPL, LIPE in FASN v kostnem tkivu bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo ter v kontrolni skupini zdravih preiskovancev.

Za osteoartrozo je značilen višji delež kostnine, večja površinska gostota kosti in večje število trabekul, glede na preiskovance z osteoporozo. Ugotovili smo, da je bilo izražanje LPL manjše pri preiskovancih z osteoporozo, v primerjavi s tistimi z osteoartrozo ( $p=0,041$ ) oziroma s kontrolno skupino ( $p=0,036$ ). Pri genu LIPE so se razlike pokazale le pri preiskovancih z osteoporozo in osteoartrozo ( $p=0,005$ ), pri čemer je bilo izražanje gena manjše pri prvih. V izražanju gena FASN pa med primerjanimi skupinami nismo ugotovili statistično značilnih razlik ( $p=0,363$ ). Korelacijska analiza je pokazala, da noben od treh genov ni povezan s parametri  $\mu$ CT in z MKG.



Z našo raziskavo smo dokazali razlike v izražanju genov LPL in LIPE le pri preiskovancih z osteoporozo, pri čemer pa nismo dokazali njihove povezave s parametri  $\mu$ CT in MKG. Študijo bi bilo potrebno izvesti na večjem številu preiskovancev ter preveriti tudi vplive hormonskih nivojev na omenjene encime.

## ABSTRACT

Bones play one of the most important roles in human body. They provide support and enable movement in conjunction with muscles. Bones also have an important metabolic functions. To maintain its function, the bone tissue is in a constant process of remodeling. Specialised cells, osteoclasts are resorbing the tissue while osteoblasts are forming new bone. With aging and other factors the balance between this two processes becomes disrupted which leads to different diseases. The most common is osteoporosis, characterised by lower bone mineral density and changes in the bone tissue microarchitecture. Osteoarthritis is also an important disease which on the contrary is characterised by higher bone mineral density.

Previous studies suggested that adipocytes in bone marrow could influence bone tissue remodeling by secreting fatty acids that are able to inhibit proliferation and survival of osteoblasts and to increase osteoclast activity. In our work we have studied the expression of FASN, LIPE and LPL genes which encode enzymes involved in synthesis and degradation of fatty acids. Lipoprotein lipase (LPL) participates in the uptake of fatty acids, hormone sensitive lipase (LIPE) participates in their release from adipocytes and fatty acid synthase catalyzes synthesis of higher fatty acid.

112 subjects were included in our study and their bone mineral density (BMD), as well as  $\mu$ CT parameters were measured. The expression of LIPE, LPL and FASN in bone tissue of patients with osteoporosis and osteoarthritis, as well as in a healthy control group was measured, using real time polymerase chain reaction (PCR).

In osteoarthritis higher bone volume density, bone surface density and trabecular number were found, compared to osteoporosis. The LPL gene expression was lower in subjects with osteoporosis, as compared to those with osteoarthritis ( $p=0,041$ ) and the control group ( $p=0,036$ ). Regarding the expression of LIPE differences were only observed in subjects with osteoporosis and osteoarthritis ( $p=0,005$ ), where its expression was lower in

osteoporotic patients. The two groups did not differ in the FASN gene expression ( $p=0,363$ ). Correlation analysis showed that the expression of genes does not correlate with the  $\mu$ CT and BMD parameters.

In our work we found differences in LPL and LIPE expression in subjects with osteoporosis. However, there is no relationship between gene expression and parameters of the  $\mu$ CT and BMD could be found. It would be necessary to perform a larger study with a higher number of subjects and to concomitantly verify the influence of hormones on the enzymes studied.

## SEZNAM OKRAJŠAV

- ACC - acetil-CoA karboksilaze
- ACP - prenašalec acilne skupine
- cGMP - ciklični gvanozinmonofosfat
- CoA – koencim A
- AMP – adenzin monofosfat
- ATGL - adipocitna trigliceridna lipaza
- ATP – adenzin trifosfat
- cAMP – ciklični adenzin monofosfat
- BMD – mineralna kostna gostota (ang. Bone Mineral Density)
- BS/BV - specifična površina kosti
- BS/TV - površinska gostota kosti
- BV/TV - delež kostnine
- CoA-SH – koencim A
- DEXA – dvoenergijska rentgenska absorpciometrija
- DG - digliceridi
- ER – endoplazemski retikulum
- FASN – sintaza maščobnih kislin
- FASN – gen za sintazo maščobnih kislin
- HSL - hormonsko senzitivna lipaza
- IGF - inzulinu podobni rastni dejavnik
- ITM – indeks telesne mase
- LPL – lipoproteinska lipaza
- $\mu$ CT - mikroročunalniška tomografija
- MG - monogliceridi
- MGL - monoacilglicerolna lipaza
- MK – maščobne kisline
- MKG – mineralna kostna gostota
- mRNA - informacijska ribonukleinska kislina
- MSC – mezenhimske matične celice
- NADP – nikotin adenin dinukleotid fosfat

- NADPH - reducirana oblika nikotin adenin dinukleotid fosfata
- NF- $\kappa$ B – transkripcijski jedrni dejavnik kapa-B
- OPG – osteoprotegerin
- PCR – verižna reakcija s polimerazo
- PDGF – trombocitni rastni dejavnik
- PPAR – receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov
- PPAR- $\gamma$  - receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov  $\gamma$
- PPAR $\gamma$  – gen, ki kodira za protein PPAR- $\gamma$
- RANK – receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B
- RANKL – ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B
- SD – standardna deviacija
- Tb.N - število trabekul
- Tb.Sp - razmaknjenost trabekul
- Tb.Th - debelina trabekul
- TG - trigliceridi
- TGF- $\beta$  - transformirajoči rastni dejavnik  $\beta$
- VLDL – lipoproteini z zelo majhno gostoto

# 1. UVOD

## 1.1. Funkcija kosti

Kosti predstavljajo strukturno oporo za telo, ščitijo notranje organe in omogočajo gibanje preko vezi z mišicami. V njih se shranjuje kostni mozeg, udeležene pa so tudi v homeostazi mineralov(1).

### 1.1.1. Zgradba kosti

Poznamo dve vrsti kostnega tkiva, kortikalno (kompaktno) in trabekularno (gobasto). Kortikalno tkivo sestavlja zunanje plasti dolgih kosti, trabekularna najdemo v notranjosti ploščatih kosti, vretenc in epifiz dolgih kosti. Posamezne kosti vsebujejo različne količine kortikalnega in trabekularnega tkiva, kar je odvisno predvsem od njihove lokacije, to pa odraža strukturne in funkcionalne razlike med njimi. Kortikalno tkivo tvori približno 80% kostne mase in je bolj čvrsto od trabekularnega, ki pa ima večjo površino in je metabolno bolj aktivno (Preglednica I) (1, 2).

Preglednica I: Primerjava kortikalnega in trabekularnega kostnega tkiva

	kortikalno kostno tkivo	trabekularno kostno tkivo
masa kosti	70 – 80 %	20 – 30 %
površina	20 %	80 %
se letno obnovi	3 %	25 %
kalcificirano	80 – 90 %	15 – 25 %
primarna funkcija	opora	metabolizem

Kost delimo na organski in anorganski del. Anorganski del, ki zagotavlja kostem trdnost, je zgrajen iz kalcijevega fosfata v obliki kalcijevega hidroksiapatita. Na ta način se v kosteh shranujeta kalcij in fosfor, ob njunem pomanjkanju v telesnih tekočinah pa lahko iz njih kontrolirano prehajata v kri. Organski del daje kostem prožnost, večinoma ga predstavlja kolagen tipa 1, manjši del pa nekolagenski proteini, kot sta osteokalcin in osteonektin. Ostali del tkiva pa so kostne celice (2, 3).

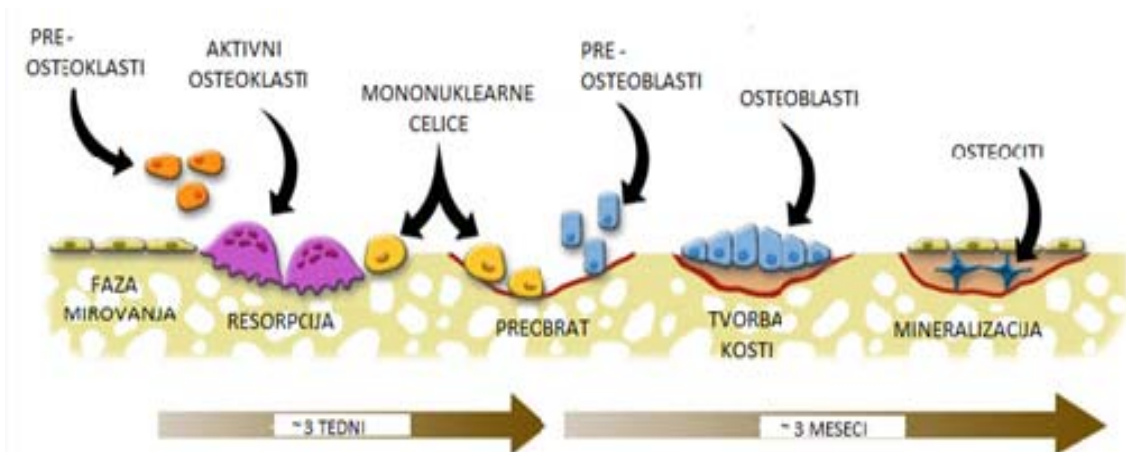
Kostne celice razdelimo na:

- Osteoblaste, kise tvorijo v kostnem mozgu iz mezenhimskih matičnih celic, iz katerih se lahko razvijejo tudi adipociti in fibroblasti. V dozorevanje osteoblastov so vpletene številne endogene snovi, tudi veliko citokinov (interlevkini in granulocitno makrofagne kolonije spodbujajoči dejavnik), hormoni in rastni dejavniki. Soenojedrne celice z dobro razvitim endoplazemskim retikulumom in Golgijevim aparatom. Osteoblasti so odgovorni za sintezo organskega osteoida, nemineralnega dela matriksa in so vpleteni v premikanje ionov med kostjo in kostno tekočino ter v mineralizacijo novo nastalega kostnega matriksa. Proizvajajo proteine kostnega matriksa, predvsem kolagena tipa I in kostnega proteina Gla (osteokalcin). Vsebujejo na membrano vezan eksoencim alkalno fosfatazo, ki se uporablja kot kazalec aktivnosti osteoblastov. Na površini izražajo veliko različnih receptorjev in izločajo nekatere biološko aktivne substance. Ob odkritju transmembranskega proteina, liganda receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B, RANKL, so odkrili, da osteoblasti ne igrajo le vloge pri kostni tvorbi, temveč tudi uravnavajo resorpcijo kosti. Osteoprotegerin (OPG) je prav tako protein, značilen za osteoblaste, ki deluje kot topni receptor za RANKL. S tem ko se veže na RANKL, zavre interakcijo med njim in receptorjem za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa-B (RANK) ter tako prekine končno diferenciacijo osteoklastov. Osteoprotegerin ne deluje na RANKL samo kot njegov topni receptor, temveč tudi zmanjša njegov razpolovni čas (1, 4, 5, 6).
- Osteoklasti, ki so velike večjedrne celice hematopoetskega izvora, odgovorne za kostno resorpcijo. Nekatere snovi, kot so citokini, paratiroidni hormon in aktivna oblika vitamina D, jih aktivirajo (4). Vsebujejo približno deset jeder z Golgijevimi aparati nameščenim okoli vsakega, obilne lizosomske vezikle in mitohondrije (1).
- Osteociti, ki se nahajajo znotraj mineraliziranega kostnega matriksa. Nastanejo iz osteoblastov, ki so uspešno sinitizirali kostni matriks, nato pa ostali ujeti v njem. Odgovorni naj bi bili za celovitost kosti. Osteociti komunicirajo tako med seboj kot tudis celicami na površini kosti (4, 5). Delujejo kot transduktorji, saj zaznavajo in pretvarjajo mehanične signale v električne in biokemične (1).

### 1.1.2. Kostna remodelacija

Proces remodelacije kosti je ključen za ohranjanje strukturne in metabolične funkcije kostnega tkiva. Z njim se popravljajo poškodbe kostnega tkiva, ki se pojavijo zaradi stresnih dejavnikov. Resorptivna faza remodeliranja ohranja nivo kalcija in fosfatov takrat, ko pride do pomanjkanje teh v prehrani(7).Proces traja 3-4 mesece, in sicer v naslednjih fazah: aktivacija, resorpcija, preobrat, formacija in mirovanje (Slika 1).

Začne se z iniciacijo osteoklastov. Osteoblasti izločajo makrofagnekolonije stimulirajoči dejavnik (MCSF), ki se veže na receptor izražen na osteoklastih s čimer vzpodbudi aktivacijo ekstracelularne kinazne signalizacijske poti. Interakcija med RANK in RANKL vodi v fosforilacijo transkripcijskega jedrnega dejavnika kapa-B(NF- $\kappa$ B) in jun N-terminalne kinaze (JNK), to pa v aktivacijo osteoklastov. Osteoblasti izločajo tudi OPG, ki se lahko veže na RANKLin s tem prepreči njegovo vezavo na RANK. V drugi fazi se na površini kosti razkrije linija mirujočih osteoblastov in na to mesto se pritrdijo osteoklasti. Med kostjo in samimi seboj ustvarijo kislo okolje, v katerem poteka izmenjava  $H^+$  in  $Cl^-$  ionov, dokler lokalni pH ne doseže vrednosti 4,5. Osteoklasti izločajo proteolitične encime (karbo anhidrazo, katepsin K), ki omogočajo demineralizacijo in razgradnjo sestavin nemineralnega matriksa. Po dveh do štirih tednih se zaradi resorpcije tkiva tvori 30  $\mu$ m globoka lakuna in osteoklasti se takrat odcepijo. Sledi faza preobrata, kjer se na dno lakune pritrdijo mononuklearne celice insintentizirajo plasti cementne linije na dnu votline. Pri aktivaciji osteoblastov igrajo pomembno vlogo tudi nekateri rastni dejavniki, naprimer IGF, TGF- $\beta$  in PDGF.V naslednji fazi tvorijo osteoblasti plasti osteoida. Ko je ta debel približno 6  $\mu$ m, se prične njegova mineralizacija. Na tem mestu kalcij, fosfat, karbonat in ostale ekstracelularne sestavine agregirajo in tvorijo trdno mineralno strukturo. Temu sledi faza mirovanja. V naslednjih nekaj mesecih se mineralizacija nadaljuje, tako da se struktura stabilizira(1).



Slika 1: Shematski prikaz procesa remodelacije kosti.

Ravnovesje pri remodelaciji kosti je uravnvano preko sistemskih in lokalnih dejavnikov (Preglednica II, III). Sistemski vključujejo tudi hormone, ki so vpleteni v homeostazo kalcija, spolno diferenciacijo in funkcijo ter urnavanje rasti. Lokalni dejavniki vključujejo predvsem rastne dejavnike, citokine, prostaglandine, levkotriene in dušikov oksid(1).

Preglednica II: Sistemski dejavniki oziroma hormoni, ki so vpleteni v kostno remodelacijo(1).

Formacija kosti	Resorpcija kosti
Paratiroidni hormon	Paratiroidni hormon
Kalcitonin	Paratiroidnemu hormonu sorodni peptid
Vitamin D	Glukokortikoidi
Rastni hormon	Tiroksin
Tiroksin	
Glukokortikoidi	
Estrogen	



Preglednica III: Lokalni dejavniki, ki vplivajo na kostne celice(1).

Dejavnik	Učinek
Transformirajoči rastni dejavnik $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Stimulacija proliferacije in sinteze kolagena osteoblastov; indukcija apoptoze osteoklastov
Inzulinu podobni rastna dejavnika I in II	Stimulacija osteoblastov za proliferacijo in sintezo matriksa ter kolagena
Kisli in bazični fibroblastni rastni dejavniki	Stimulacija aktivacije osteoblastov; inhibicija sinteze kolagena
Trombocitni rastni dejavnik	Stimulacija aktivacije osteoblastov
Interlevkin 1	Stimulacija aktivnosti osteoklastov
Interlevkin 4, 13	Inhibicija resorpcije
Interlevkin 6, 11	Vpliv na osteoklaste, njihovo delovanje in razvoj
Interferon $\gamma$	Inhibicija resorpcije
Dušikov oksid	Inhibicija aktivnosti osteoklastov
Levkotrieni	Stimulira aktivnost osteoklastov
Dejavnik tumorske nekroze $\alpha$	Stimulira aktivnost osteoklastov

## 1.2. Osteoporoza

Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, za katero sta značilni zmanjšanje kostne mase in porušenjemikroarhitekture kostnega tkiva, kar ima za posledico povečano lomljivost kosti. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je definirala osteoporozo na osnovi merjenja mineralne gostote kosti (MKG). Po tej definiciji je osteoporoza zmanjšanje MKG za 2,5 ali več standardnih deviacij (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso. Kadar je zmanjšanje kostne gostote med 1 in 2,5 SD pa govorimo o osteopeniji (4, 8).

V dobi odraščanja se več kosti zgradi kot razgradi, zato se količina kostne mase povečuje. Količina kortikalnega dela kosti se veča do približno 30., trabekularne, pa do 25. leta starosti. Tako je do 30. leta starosti dosežena največja kostna masa, ki je v 50 - 80% odvisna od genske zasnove. Številni geni uravnavajo rast skeleta in opredeljuje kostno

maso. Negenetski dejavniki, ki negativno vplivajo na izgradnjo kostne mase v otroštvu in dobi odraščanja, pa so: pomanjkanje kalcija v prehrani, pomanjkanje telesne dejavnosti, zakasnela puberteta, daljša obdobja amenoreje in različne kronične bolezni. Vzrok za zmanjševanje kostne mase po 40. letu je pospešena razgradnja kosti ob nespremenjeni stopnji tvorbe novega tkiva ali pa zmanjšana in upočasnjena gradnja kosti ob nespremenjeni stopnji njihove razgradnje. Ko se začne kostna masa zmanjševati, je ta proces nekaj let enako intenziven pri obeh spolih. Po menopavzi, ko preneha delovanje jajčnikov in se količina estrogenov izrazito zmanjša, pa je izguba kosti, predvsem trabekularnega dela, pri ženskah mnogo večja kot pri moških. Seveda s staranjem propada tudi kortikalni del kosti, vendar počasneje in v kasnejšem življenjskem obdobju. Kasneje v starosti na mehanizme razgradnje kostne mase vplivajo tudi zvišana koncentracija parathormona, znižana koncentracija kalцитriola in zmanjšana absorpcija kalcija iz črevesa (9).

### **1.2.1. Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze**

Tveganje za osteoporozo je v veliki meri odvisno od največje kostne mase, dosežene v mladosti in od hitrosti izgube kosti med staranjem. Predvsem so osteoporozi izpostavljene ženske bele in azijske rase z zgodnjo menopavzo (pred 45. letom starosti), katerih najbližji sorodniki so imeli pogoste zlome že ob manjših poškodbah, ki kadijo in imajo nizko telesno težo. Dodatni dejavniki so kronične bolezni, čezmerno pitje alkohola in jemanje nekaterih zdravilnih učinkovin, kot so glukokortikoidi, tiroidni hormoni, fenitoin, furozemid in druge (4, 9).

Poglavitni dejavniki tveganja za zlom so starost, nizka MKG, nizka telesna teža in predhodni zlomi. Znižanje MKG za samo eno SD pomeni 2-3-krat večje tveganje za zlom. Bolniki z osteoporozo, ki so že utrpeli zlom, pa imajo kar 10-krat večje tveganje za dodatne zlome kosti (9).

### **1.2.2. Oblike osteoporoze**

Ločimo dve skupini osteoporoze, primarno in sekundarno. Primarna nastane po menopavzi oziroma v starosti. Poglavitni vzrok za postmenopavzalno osteoporozo je pomanjkanje estrogenov. Zaradi izpada estrogenov pride do povečane resorpcije in zmanjšanja tvorbe kosti. Senilna osteoporozo se pojavi v visoki starosti, nad 70 let. Zmanjša se količina trabekularne in tudi kortikalne kosti. Ta vrsta osteoporoze zajame v večjem številu tudi

moške. Vzrok zanjo je manjša resorpcija kalcija iz črevesja s posledično zvišano koncentracijo parathormona. Resorpcija kalcija je manjša zaradi sprememb na črevesni sluznici in zmanjšanja tvorbe aktivne oblike kalcitriola v starostno spremenjenih ledvicah. Med primarno osteoporozo štejemo tudi juvenilno, ki se pojavi v dobi odraščanja, traja 2-4 leta, nato pa spontano izgine, ter osteoporozo v nosečnosti kot posledico slabše prilagoditve kalciotropnih hormonov. Sekundarna osteoporozo nastane zaradi jemanja določenih zdravil ali bolezenskih stanj. Povzročijo jona primer lahko dolgotrajno zatiranje osteoblastne funkcije, inhibicija absorpcije kalcija iz gastrointestinalnega trakta ali pa njegove povečane izgube skozi urin, ki so posledica različnih bolezni (Preglednica IV) (4, 9).

Preglednica IV: Vzroki za nastanek sekundarne osteoporoze.

Endokrine bolezni	Bolezni in stanja prebavil	Bolezni kostnega mozga	Drugi vzroki
Hipogonadizem	Subtotalna gastrektomija	Multipli mielom	Imobilizacija
Hipertiroza	Malabsorpcijski sindrom	Sistemska mastocitoza	Revmatoidni artritis
Hiperparatiroidizem	Kronični obstruktivni ikterus	Diseminirani karcinom	Transplantacije notranjih organov
Hiperkorticizem	Huda malnutricija		Kronični alkoholizem
	Primarna biliarna ciroza		Antikonvulzivna zdravila
	Alaktazija		Dolgotrajno zdravljenje z glukokortikoidi

### 1.2.3. Diagnoza

Diagnozo začetne osteoporoze napravimo z merjenjem MKG s pomočjo dvojne rentgenske absorpciometrije (DEXA), lahko pa tudi na osnovi že dokazanih osteoporoznih zlomov. Meritev DEXA je natančna in dobro ponovljiva. Omogoča tudi spremljanje sprememb MKG med zdravljenjem osteoporoze. Ko je kostna masa zmanjšana za več kot 30 % ali ko je že prišlo do zlomov vretenc, lahko za diagnozo uporabimo rentgensko slikanje hrbtenice. Anamneza pri ženskah mora vsebovati podatke o njihovi generativni funkciji, o

porodih, dojenju, menstrualnem ciklu, nastopu menopavze, znamenjih klimakterija. Pridobiti je potrebno tudi podatke o boleznih prebavil, jeter in ledvic, številu zlomov in uživanju zdravil ter načinu življenja (telesna vadba, uživanje alkohola, kajenje). Vsem bolnikom je potrebno določiti serumske koncentracije kalcija, fosfata, alkalne fosfataze, sečnine, kreatinina, aspartatne amino transferaze, alaninske amino transferaze, in jim napraviti proteinogram, hemogram, tirotropina, hitrost sedimentacije, pri moških pa določiti še nivo testosterona (9, 10).

#### **1.2.4. Preprečevanje**

Preprečevanje osteoporoze se začne že v otroštvu in mladosti z zdravim načinom življenja. Pomemben je zadosten vnos kalcija in primerna telesna aktivnost. V obdobju, ko se prične količina kostne mase zmanjševati, pa so prevsem pomembni: redna telesna aktivnost, gibanje na soncu, čim manjši vnos alkohola in čim manj pokajenih cigaret (9).

#### **1.2.5. Zdravljenje**

Osteoporozo zdravimo lahko z zdravili, ki pospešujejo novotvorbo kosti ali zavirajo njeno resorpcijo. Pospeševalci tvorbe kosti lahko povečajo kostno maso za 5-30% letno, zaviralci resorpcije pa preprečujejo nadaljno izgubo kostnega tkiva, pri čemer se kostna gostota lahko zveča od 5-10% letno. Med zaviralce resorpcije sodijo estrogeni, modulatorji estrogenskih receptorjev, tibolon, kalcitonin, bifosfonati, kalcij in vitamin D. Kot pospeševalec tvorbe kosti pa se v nizkih odmerkih uporablja parathormon. Učinkovitost zdravil za zdravljenje osteoporoze ocenjujemo glede na njihovo sposobnost preprečevanja oziroma zmanjšanja števila zlomov (10).

### **1.3. Osteoartroza**

Osteoartroza je raznolika in večvzročna bolezen, ki prizadene enega ali več sklepov okončin, hrbtenico ali oboje. Bolniki imajo signifikantno zvišan kostni metabolizem in remodelacijo, spremeni se ožiljenje, ob tem pa je pogosto zvišana tudi kostna gostota. Osteoartrozo delimo na primarno in sekundarno. Prva je lahko bodisi lokalizirana le na roko (Heberdenovi in Bouchardovi vozlički), stopalo, koleno, kolk, hrbtenico ali druge posamezne sklepe ali pa generalizirana na tri ali več skupin sklepov. Sekundarno osteoartrozo opredelimo glede na:

- fizikalne dejavnike: poškodba sklepa, odstranitev meniskusa ter druge operacije in kronične poškodbe sklepa;

- anatomske spremembe: različno dolge okončine, sindrom pretirano gibljivih sklepov, prirojena displazija kolka, zdrs femoralne epifize;
- presnovne bolezni: Wilsonova bolezen, mukopolisaharidoza, hemokromatoza, protin, psevdoprotin;
- endokrine bolezni: akromegalija, sladkorna bolezen, hipotiroidizem, debelost,
- vnetne bolezni: nekatere revmatične bolezni, septični artritis (9, 11).

Bolezen se kaže s spremembami na hrustancu, subhondralni kosti, sinoviju, ter ligamentarnem in nevromišičnem aparatu (8).

### 1.3.1. Dejavniki, ki vplivajo na nastanek osteoartroze

Dejavniki, ki vplivajo na nastanek primarne oblike bolezni, so staranje, mehanske poškodbe, konstitucionalni, dedni, hormonski in vnetni dejavniki. Vsi povzročajo spremembe in okvare hrustanca. Ta postane s starostjo rumenorjav, moten, ni več gladek, na njegovi površini pa se pojavijo plitve razjede. Zmanjša se celična gostota, manj je tudi kolagenskih vlaken, ki so manj raztegljiva in odporna. S staranjem pride so sprememb v biomehaniki sklepa, slabša se delovanje perifernega živčevja in prekrvavitev. Pri mehaničnih obremenitvah gre največkrat za ponavljajoče se prevelike obremenitve enega ali več sklepov, in sicer zaradi prevelike telesne teže, pretirane telesne dejavnosti ali poškodb. Vpliv dednih dejavnikov je najbolj izražen pri Heberdenovi osteoartrozi, saj je kar desetkrat pogostejša pri ženskah kot pri moških in povezana z avtosomnim genom, ki je pri njih dominanten, pri osebah moškega spola pa recesiven (9, 12).

Hrustanec se torej zaradi različnih vzrokov morfološko, biokemično in presnovno spremeni.

- Morfološke spremembe se začnejo na njegovi površini, ki izgubi enovitost, začne se fragmentirati, nastajajo posamezne razjede, pozneje pa hrustanec lahko celo izgine.
- Biokemične spremembe se odražajo v izrazitem povečanju količine vode, zato hrustanec nabrekne, kolagenska mreža pa oslabi. Povprečna velikost proteoglikanov in kolagena se zmanjša, izgublja se tudi pravilna razporejenost proteoglikanov.
- Presnovne spremembe se kažejo v okvari hondrocitov, čemur sledi povečanje sinteze in sproščanja proteolitičnih lizosomskih in drugih encimov ter posledično

razgradnja preteoglikanov. Poskus obnove hrustanca je tvorba kostnih izrastkov (osteofitov) in hipertrofija subhondralne kosti (sklerozacija). Zaradi razgradnje tkiva se v sinovijsko tekočino sproščajo njegovi delčki, ki dražijo sinovij in izzovejo vnetje. Pri tem nastajajo prostaglandini, interlevkini in razgradni encimi, ki znova okvarjajo sklepni hrustanec (9).

Sekundarna osteoartroza pa nastane zaradi: kopičenja nenormalnih biokemičnih snovi v sklepnem hrustancu (urati in drugi kristali), vnetja (septični artritis), posledic poškodb, predhodnih sklepnih okvar (stari zlomi, prirojen izpah) ter endokrinih boleznii in nevropatičnih motenj(9).

### **1.3.2. Znaki osteoartroze**

Običajno se pri osteoartrozi pojavlja pet najpogostejših znakov, ki pa niso značilni samo za to bolezen: bolečina, okorelost, zadebeljen in/ali razoblikovan sklep, omejena gibljivost in krepitacije. Bolečina se pojavi postopno, je globoka, topa in povzroča neugodje. Na začetku bolezni nastopi po telesni dejavnosti, kasneje pa tudi v mirovanju. Okorelost sklepov je najbolj izražena zjutraj ter ob mirovanju in običajno ne traja več kot pol ure. Zadebelitev nastane zaradi nabrekliga sinovija ali kostnih izrastkov. Ko osteoartroza napreduje, postane sklep slabo gibljiv (9, 12).

### **1.3.3. Diagnoza bolezni**

Diagnoza osteoartroze temelji na anamnezi, kliničnih znakih in rentgenskih preiskavah. Laboratorijski testi so običajno v mejah normale, pri sekundarni obliki pa lahko odstopajo, v kolikor so povezani z osnovno boleznijo. Za ugotavljanje osteoartroze so rentgenske preiskave odločilne. Zaradi primerjave slikamo parne sklepe. Zgodnji rentgensko zaznavni znaki so neenakomerna zoženja sklepne špranje, pozni pa kostni izrastki, subhondralna skleroza in kostne ciste (9).

### **1.3.4. Zdravljenje**

Ker še nimamo ustreznega zdravila, je zdravljenje osteoartroze simptomatsko. Cilj je predvsem lajšanje bolečin, izboljšanje okorelosti in gibljivosti sklepov ter izboljšanje kakovosti življenja in preprečevanje napredovanja bolezni. Zdravljenje poteka stopenjsko in ga delimo na nefarmakološko, farmakološko in operativno oziroma kirurško (9, 12).

Nefarmakološko zdravljenje obsega poučevanje bolnika, družbeno pomoč, zdrav način življenja ter fizikalno in delovno terapijo. Pogosto ga kombiniramo s farmakološkim, ki pa mora biti prilagojeno posameznemu bolniku. Za lajšanje blagih do zmernih bolečin uporabljamo neopioidne analgetike, najpogosteje paracetamol. Pri bolnikih z vnetnimi znaki in kadar je paracetamol neučinkovit, pa uporabimo nesteroidne antirevmatike, pri blagi obliki bolezni lahko tudi antirevmatična mazila. Pri nekaterih bolnikih z osteoartrozo kolena sklep izpraznijo in vanj vbrizgajo glukokortikoid. Med posameznimi injiciranjmi mora preteči najmanj šest tednov, poseg pa lahko izvedejo 3-4-krat letno. Kadar so uporabljeni ukrepi in zdravila neučinkoviti oziroma kontraindicirani, lahko v sklep vbrizgajo hialuronsko kislino. Injicirajo jo enkrat tedensko, in sicer tri do pet tednov zapored. Zavirala naj bi posrednike vnetja (citokine, prostaglandine), stimulirala tvorbo hrustančnega matriksa in preprečevala nadaljno razgradnjo hrustanca, predvsem pa zmanjševala viskoznost sinovijske tekočine. Nekateri bolniki uporabljajo opioidne analgetike, vendar le, če ne smejo jemati nesteroidnih antirevmatikov, imajo oslabelelo delovanje ledvic ali pa so druga protibolečinska sredstva in postopki neučinkoviti. Najpogostejše uporabljeno zdravilo iz te skupine je tramadol. Kadar je osteoartroza že zelo napredovala pa je potrebno kirurško zdravljenje (9).

## 1.4. Adipociti

Maščobno tkivo ni le pasivno skladišče odvečne energije, temveč predstavlja največji endokrini organ v telesu. Celice, ki so specializirane za shranjevanje maščob, so adipociti. Skoraj ves njihov volumen je napolnjen z maščobnimi kapljicami(13), ki so sestavljene iz trigliceridov(TG). Vir TG, ki se odlagajo v adipocitih, so hilomikroni in lipoproteini z zelo majhno gostoto(VLDL)(14). Adipociti izločajo hormone in hormonom podobne snovi. To so adipokini (leptin, adiponektin, dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$ , interlevkin 1 in 6, rezistin), preko katerih se aktivno vključujejo v uravnavanje apetita, porabe energije, občutljivosti tkiv na inzulin, žilne in kostne biologije, imunskega sistema, odziva na stres, spolnega dozorevanja in reprodukcije. Izražajo tudi različne receptorje, s katerimi se vključujejo v različne regulacijske zanke. Mednje sodijo receptorji za inzulin, kateholamine, kortizol, rastni hormon, spolne hormone, angiotenzin ter receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov (PPAR). V adipocitih se tvorijo encimi, ki vplivajo na presnovo lipidov (hormonskosenzitivna lipaza, lipoproteinska lipaza), na renin-angiotenzin aldosteronski

sistem (angiotenzinska konvertaza) in na presnovo glukokortikoidov (11-beta hidroksisteroidna dehidrogenaza tipa 1)(9).

Število adipocitov v kostnem mozgu s starostjo narašča. Pri tistih, starih nad 30 let je večina femoralne votline zasedena z adipoznim tkivom. Z magnetno resonanco so dokazali, da več kot 70% prostora apendikularnega dela okostja odraslih zapolnjuje maščoba. Kostna pretvorba se pojavi na vrhu na novo pridobljene kosti, kar potrjuje hipotezo, da je maščoba potrebna za aktivnost osteoblastov. S staranjem se zmanjšuje tvorba kosti, ki pa se ne odraža le v obliki povečanega števila adipocitov v kostnem mozgu, temveč tudi v spremembi njihove velikosti (15). Maščoba v kostnem mozgu ima negativen učinek na strukturo in metabolizem kosti. To lahko razložimo s prevladujočo indukcijo adipocitne diferenciacije mezenhimskih matičnih celic (MSC) povezano z lipotoksičnostjo (sproščanje maščobnih kislin) in adipotoksičnostjo (sproščanje adipokinov), kar vse vpliva na tvorbo kosti, lahko pa spodbudi tudi njihovo razgradnjo(16). Interakcija med maščobnim in kostnim tkivom se spreminja skladno z aktivacijo oziroma inaktivacijo genov, signalnih molekul in transkripcijskih dejavnikov(17). V primeru, da je v telesu veliko maščobnega tkiva, pridejo do izraza naslednji pojavi:

- Preko simpatičnega živčnega sistema leptin aktivira  $\beta 2$  adrenergične receptorje na osteoblastih, zmanjša njihovo aktivnost in poveča obseg kostne resorpcije. Medtem pa leptin na periferiji poveča rast kortikalne kosti in diferenciacijo MSC bolj v osteoblaste kot pa v adipocite.
- Hiperlipidemija povzroča razgradnjo kosti z osteoklasti.
- Sistemski oksidativni stres, ki je povezan z visceralno debelostjo, poveča razgradnjo kosti, obenem pa zmanjša njeno tvorbo. Lipidni oksidativni produkti lahko preprečijo pretvorbo preosteoblastov v osteoblaste in aktivirajo osteoklaste, tako da povečajo izražanje molekul RANKL. Poleg tega povečajo tudi izražanje PPAR- $\gamma$ , ki pospeši diferenciacijo MSC v adipocite namesto osteoblaste(16).
- Zmanjša se količina adiponektina; ta poveča rast osteoblastov in zavira osteoklastogenezo(18).
- Zveča se tudi možnost kroničnega vnetja, ki vodi v povečano osteoklastno aktivnost(19).



Prevladujoča diferenciacija MSC v adipocite na račun osteoblastov lahko poteka intrinzično ali ekstrinzično. Pri intrinzični poti sta najpomembnejši determinanti telomeraza in lamin A/C. Stabilizacija telomeraze namreč podaljša življenjsko dobo MSC in ohranja njihov potencial za osteogeno diferenciacijo. Izražanje lamina A/C je potrebno za diferenciacijo osteoblastov, njegovo zmanjšano izražanje v starosti pa bi lahko vodilo v prevladujočo adipocitno diferenciacijo MSC(16).

Med ekstrinzične dejavnikesodijo slaba perfuzija kostnega mozga, visok nivo oksidativnega stresa, nizek nivo estrogenov, ki so inhibitorji adipogeneze ter osteogenih dejavnikov. Dokazali so, da imajo osebe z osteoporozo dejansko zmanjšano perfuzijo kostnega mozga v vretencih ter prisotnih več maščobnih celic v kostnem mozgu kot osebe z osteopenijooziroma z normalno kostno gostoto. Študije so pokazale tudi povezavo med hipoksijo in obsežno diferenciacijo v adipocite(16).

S staranjem se status MSC znotraj spremenjenega mikrookolja kostnega mozga spremeni, in sicer zlasti v smislu potenciala njihove intrinzične diferenciacije in proizvodnjisignalizacijskih molekul. Število MSC, namenjenih tvorbi adipocitne vrste narašča, medtem ko število tistih, iz katerih nastanejo osteoblasti pada. To je lahko posledica bodisi povečane aktivnosti PPAR $\gamma$ 2 ali pa zmanjšane ekspresije signalizacijskih poti TGF- $\beta$ /BMP, Wnt/ $\beta$ -katenin in IGF-1(15).

Maščoba v kostnem mozgu sprošča MK, ki lahko vplivajo na funkcijo celic v njihovi bližini(16). Zanje in za njihove metabolite je značilno, da nadzirajo proliferacijo različnih vrst celic, med drugim tudi kostnih (20). Ugotovili so, da so polinenasičene maščobne kisline odgovorne za zaviranje proliferacije osteoblastov(16). Iz nenasičenih MK nastanejo tudi prostaglandini, med katerimi v kosti prevladuje PGE $_2$ . Njegovi zvišani nivoji prav tako vodijo v zmanjšano tvorbo kosti (21). Z nadaljnjim raziskovanjem so tudi dokazali, da adipociti preko inhibicije osteoblastno specifičnega transkripcijskega dejavnika 2 (Runx 2) negativno vplivajo na funkcijo in preživetje (povečanje obsega apoptoze) osteoblastov (22).

Nekatere MK, na primer arahidonska in gama linolenska kislina lahko inducirajo osteoklastogenezo, saj inhibirajo sekrecijo OPG in stimulirajo izločanje RANKL (21). Druge študije so dokazale, da nasičene MK vplivajo na pozno fazo osteoklastogeneze oziroma na samo preživetje osteoklastov. Pri tem je pomemben toll-like receptor 4 (TLR4),

ki skupaj s proteinom MyD88 sodeluje pri aktivaciji NF- $\kappa$ B (23). Opazovali so tudi, kako dolžina MK vpliva na osteoklastogenezo in ugotovili, da je pri njeni inhibiciji najučinkovitejša palmitinska kislina, zgrajena iz 16 ogljikovih atomov (24).

### 1.4.1. Proces lipogeneze

Po obroku, polnem ogljikovih hidratov in z malo maščob, se začnejo odvečni ogljikovi hidrati večinoma pretvarjati v glikogen. Poveča se tudi obseg njihove oksidacije, delno pa nastajajo tudi TG (25). V ta proces je vključena sinteza maščobnih kislin (MK) iz acetil-CoA in njihova esterifikacija v TG. Gre za lipogenezo, ki se odvija predvsem v črevesju, jetrih in adipoznem tkivu (26).

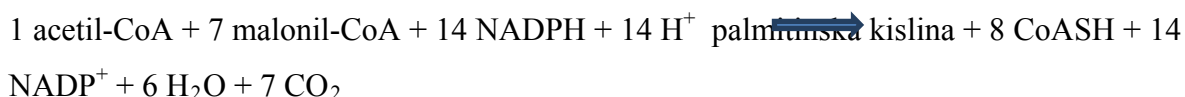
Maščobne kisline se tvorijo iz acetil koencima A (acetil-CoA) v citosolu. Tu se s pomočjo ATP-citratne liaze njihova citratna oblika cepi na acetil-CoA in oksaloacetat. Prvi korak v sintezi MK je tvorba malonil-CoA iz acetil-CoA in bikarbonata, s pomočjo acetil-CoA karboksilaze (ACC) (25). Aktivnost ACC stimulira citrat zavira pa jo dolgoverižni acil-CoA (27). Od nastanka malonil-CoA dalje so vsi intermedijati vezani na proteinski prenašalec acilne skupine (ACP). Acetilna in malonilna skupina se morata pred samo sintezo prenesti na sintazni kompleks (13). Sintaza višjih maščobnih kislin tvori dolgoverižne MK preko kondenzacije acetil-CoA in malonil-CoA z NADPH (28). Po tej vezavi poteče zaporedje štirih kemijskih reakcij, ki so del spirale, ki je obratna  $\beta$ -oksidaciji (13).

Do nastanka nove vezi med ogljikoma pride po:

1. Redukciji ketoskupine.
2. Dehidraciji z nastankom dvojne vezi med ogljikoma.
3. Redukciji dvojne vezi s sintezo nasičene maščobne kisline.

Pri enem obratu spirale nastane butirilna skupina s štirimi ogljikovimi atomi, ki je vezana na ACP. V drugem obratu pa se butirilnemu ostanku dodata še dva ogljikova atoma, pri čemer nastane produkt, ki ponovno vstopi v opisani proces redukcije, dehidracije in ponovne redukcije. Po sedmih ponovitvah zaporedja vseh štirih reakcij nastane palmitoil-ACP. Na tej stopnji se nato palmitat, zgrajen iz 16 ogljikovih atomov odcepi z ACP (13).

Neto reakcija sinteze MK(26):



Maščobne kisline z daljšo verigo kot palmitat se sintetizirajo z elongacijskim encimskim sistemom na endoplazmatskem retikulumu (ER). Reakcije podaljševanja verige so podobne reakcijam, ki potekajo s sintazo maščobnih kislin, novi ogljikovi pa se dodajajo v obliki malonil-CoA. V tem primeru so vsi intermediati aktivirani z vezavo na CoASH(13).

Sinteza TG poteka v endoplazmatskem retikulumu. V jetrih in adipoznem tkivu se MK vgradijo v membrano ER. Nato membransko vezana acetil-CoA sintaza aktivira dve MK, medtem ko jih transferaza esterificira z glicerol 3-fosfatom(26).

#### 1.4.1.1. Sintaza maščobnih kislin

*FASN* je gen, ki kodira FASN, 270-kDa velik dimerni encim, odgovoren za sintezo palmitata. Pri odraslih osebah se izraža v hormonsko občutljivih celicah ter celicah z obsežnim metabolizmom lipidov. Izražanje FASN zvišajo tiroidni hormoni, inzulin, glukokortikoidi in vnos ogljikovih hidratov, medtem ko ga proste MK, ciklični AMP in glukagon znižajo. Ta multifunkcionalni polipeptid vsebuje sedem katalitičnih domen:  $\beta$ -ketoacil sintazo, malonil/acetil transferazo, dehidrogenazo, enoilno reduktazo,  $\beta$ -ketoacil reduktazo, proteinski prenašalec acilne skupine in tioesterazo, ter tvori homodimer v obliki črke X (29).

S FASN katalizirana sinteza MK obsega tri poglobitne korake: iniciacijo, elongacijo in terminacijo. Med prvo pride do kondenzacije malonil-CoA in acetil-CoA s pomočjo malonil/acetil transferaze. Sledi elongacija, s ponavljajočimi se cikli redukcije in dehidracije, pri čemer se v vsakem ciklu veriga podaljša za dva ogljikova atoma. V terminalni fazici se sprosti palmitat z ACP, kar katalizira tioesteraza(29).

#### 1.4.2. Proces lipolize

Lipoliza je kataboličen proces, ki vodi v razpad TG v neesterificirane maščobne kisline in glicerol. Neesterificirane maščobne kisline se lahko ponovno esterificirajo in ostanejo v adipoznem tkivu ali pa preidejo v kri(14). Lipidna razgradnja v telesu poteka s pomočjo

lipaz in fosfolipaz, ki delujejo na TG in fosfolipide(26). Tri lipaze veljajo za poglavitne encime adipocitne lipolize, in sicer adipocitna trigliceridna lipaza (ATGL), hormonskoobčutljiva lipaza (HSL) ter monoacilglicerolna lipaza (MGL). Med njimi velja ATGL za poglavitno lipazo TG, ki hidrolizira TG v digliceride (DG). HSL hidrolizira DG v monogliceride (MG) in MGL, ki hidrolizira monogliceride(30).

Kateholamini in inzulin so najpomembnejši plazemski hormoni, ki regulirajo lipolizo. Zvišane vrednosti inzulina zmanjšajo obseg lipolize, medtem ko kateholamini aktivirajo lipolizno kaskado z vezavo na  $\beta$ -adrenergične receptorje, izražene na plazemski membrani adipocitov, zavirajo pa jo z vezavo na  $\alpha_2$  receptorje(31).

Alternativni poti za povečanje lipolize vodita preko natriuretičnih peptidov in TNF $\alpha$ . Natriuretični peptidi se vežejo na gvanilil ciklazni receptor, preko katerega povečajo obseg nastajanja cGMP, ki aktivira proteinsko kinazo G. Posledica sta fosforilacija in aktivacija HSL, ki pospeši lipolizo. Do povečanja lipolize preko vnetnega citokina TNF $\alpha$  pa pride zaradi inzulinske rezistence v adipocitih(30).

HSL in LPL sta ključna encima, ki omogočata mobilizacijo in shranjevanje TG v adipoznem tkivu(32).

#### **1.4.2.1. Hormonsko senzitivna lipaza (HSL)**

Hormonsko občutljiva lipaza (HSL) je nespecifičen intracelularni encim. Največ HSL so našli v maščobnem tkivu, nizke koncentracije pa si prisotne tudi v spolnih celicah, mišicah, pankreatičnih celicah beta in makrofagih. Hidrolizira TG in holesterolne estre, DG, MG, retinilne, steroidne v vodi topne estre (p-nitrofenilne estre). Razmerje za hidrolizo med TG:DG:MG:holesterolnimi estri:retinilnimi estri je 1:10:1:4:2(33). HSL ima preferenco, ki pa ni absolutna, za reakcije na esterske vezi 1- ali 3- substrata. Aktivnost HSL je pod nadzorom hormonov in živčnega sistema, in sicerz mehanizmom, ki vključuje fosforilacijo preko proteina kinaze A. V odzivu na stimulacijo adipocitov s kateholamini, omenjena kinaza fosforilira HSL na treh serinskihostankih.To povzroči njeno povečano encimsko delovanje in translokacijo iz citosola v lipidne kapljice(32). Zmanjšano adipocitnoaktivnost in ekspresijoHSL so opazili pri ljudeh s povečano telesno težo, in sicer skupaj z zmanjšanim obsegom lipolize, ki jo inducirajo kateholamini(34).Inzulin, najpomembnejši

antilipolitični encim, pa preprečuje fosforilacijo in aktivacijo HSL predvsem preko znižanja cAMP(32).

#### 1.4.2.2. Lipoproteinska lipaza (LPL)

Lipoproteinska lipaza je encim, ki je nekovalentno vezan na endotelijske celice na steni kapilar. Proizvaja se v številnih tkivih, vključno z maščobnim tkivom, srcu, skeletni mišici in makrofagih(35). Njihova aktivna oblika je nekovalenten homodimer. LPL spada v družino serinskih esteraz. Ima pomembno vlogo v metabolizmu in transportu lipidov. S hidrolizo cepi triacilglicerole, ki so del kilomikronov ali VLDL, ob tem pa se sprostijo MK, ki preidejo v celice in se uporabijo v energijskem metabolizmu ali pa za skladiščenje(13). Hidrolizira številne esterske substrate, vendar ne holesterolnih estrov(32). Glavni substrati LPL so TG in MG. V večji meri hidrolizira esterske vezi 1- in 3- v TG in 2-monoacil glicerolu, ki se nato hidrolizira z monogliceridno lipazo v 1-monoglicerid. Interagira lahko tudi z lipoproteini, in sicer tako da jih zasidra v žilno steno in s tem pospeši privzem delcev lipoproteinov. Spodbudi tudi izmenjavo lipidov med lipoproteini. Njeno mRNA so našli v človeškem maščobnem tkivu, poleg tega pa tudi v mišicah, nadledvični žlezi, ledvicah, črevesju in v jetrih novorojenčka.

Inzulin zviša aktivnost LPL, obseg njene sinteze ter nivoje mRNA v adipocitih. Ker ne stimulira transkripcije gena LPL, je povečan nivo mRNA za LPL v ravnovesnem stanju posledica sprememb njene (mRNA) stabilnosti(36).

## 2. NAMEN DELA

Osteoporoza je sistemska bolezen kosti, ki jo spremlja visoko tveganje za zlome. Njen nastanek je povezan tako z genskimi kot tudi dejavniki okolja. Po 40. letu starosti se začne kostna masa zmanjševati zaradi različnih vzrokov. Eden od njih je lahko tudi ta, da se s staranjem poveča število adipocitov v kostnem mozgu, kar ima negativen učinek na strukturo in metabolizem kosti. Adipociti v svojo okolico izločajo snovi, kot so adipokini in maščobne kisline. Nedavne raziskave so pokazale, da lahko polinenasičene MK vplivajo na kosti oziroma na kostne celice. Na osteoblaste delujejo tako, da zavirajo njihovo proliferacijo, sčasoma pa se zaradi tega začne zmanjševati kostna masa, kar privede do krhkejših kosti.

V diplomski nalogi bomo preučevali vplive genov, ki kodirajo za encime, vpletene v nastanek in razgradnjo MK. Izbrali smo encime lipoproteinsko lipazo, ki jo kodira gen LPL, hormonskoobčutljivo lipazo, ki jo kodira gen LIPE, ter sintazo MK, zapis za katero se nahaja v genu FASN.

Iz zgoraj navedenega predvidevamo, da izražanje genov FASN, LIPE in LPL vpliva na MKG in mikroarhitekturo kosti, kar je naša hipoteza.

Lipoproteinska lipaza sodeluje pri privzemu prostih MK, saj hidrolizira triacilglicerole do maščobnih kislin, ki nato preidejo v celice. Hormonsko občutljiva lipaza sodeluje pri sproščanju MK iz adipocitov, sintaza MK pa katalizira nastajanje višjih MK.

Namen našega dela je:

- z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času izmeriti izražanje genov LIPE, LPL in FASN;
- analizirati razlike v izražanju izbranih genov v kostnem tkivu odvzetem bolnikom z osteoporozo in osteoartritisom ter zdravim kontrolnim osebam;
- preveriti ali izražanje genov LPL, LIPE in FASN vpliva na MKG in;
- statistično ovrednotiti podatke in ugotovili ali omenjeni geni vplivajo na mineralno kostno gostoto in parametre  $\mu$ CT preiskovancev in s tem oceniti njihov pomen pri razvoju osteoporoze.

## **3. METODE IN MATERIALI**

### **3.1. Splošna opozorila**

Pri delu moramo paziti, da vzorcev in reagentov ne kontaminiramo, zato uporabljamo izključno sterilen pribor za enkratno uporabo. Pred pričetkom dela smo plastične epruvete in nastavke za pipete avtoklavirali, in sicer 20 minut pri temperaturi 121°C in nadtlaku 1 bar. Prav tako smo avtoklavirali tudi ultračisto vodo. Delovno površino (brezprašna komora) in pribor smo vsakič očistili z 3% natrijevim hipokloritom in 10% etanolom, nato pa vse izpostavili UV svetlobi za 20 minut.

Pri delu smo uporabljali rokavice za enkratno uporabo in svežo haljo.

### **3.2. Preiskovanci**

V našo raziskavo smo vključili 112 preiskovancev, od katerih jih je bilo 98 napotnih na Oddelek za travmatologijo Splošne bolnišnice Celje ali v Ortopedsko bolnišnico Valdoltra na polovično ali popolno zamenjavo kolčnega sklepa zaradi zloma vratu stegenice ali osteoartroze. V raziskavo smo vključili preiskovance brez znanih sistemskih ali drugih presnovnih bolezni, ki vplivajo na kosti ali presnovo mineralov. Štirinajstim preiskovancem, ki so predstavljali kontrolno skupino, je bilo kostno tkivo odvzeto post mortem, ob obdukciji. Izključili smo vse tiste osebe, za katere je bilo iz medicinske dokumentacije oziroma obdukcijskih poročil razvidno, da imajo osteoporozo, osteoartritis ali katero drugo bolezen, ki vpliva na presnovo kosti in mineralov.

### **3.3. Merjenje mineralne kostne gostote**

Diagnozo so vsem preiskovancem postavili na podlagi merjenja MKG z dvoenergijsko rentgensko absorpciometrijo (DEXA) in kliničnim ter radiografskim pregledom kolka v Splošni bolnišnici Celje. Pri tem so izmerili MKG kolka, vratu stegenice in področja ledvene hrbtenice.

### **3.4. Vzorci**

Vzorci kostnega tkiva so bili odvzeti iz intertrohantra proksimalnega dela stegenice, in sicer iz kostnega tkiva, ki se pri rutinski operaciji vstavitve umetnega kolčnega sklepa odstrani in je namenjeno uničenju. Pri kontrolni skupini je bilo kostno tkivo odvzeto na istem mestu. Kostni vzorci so bili takoj po odvzemu zamrznjeni v tekočem dušiku in nato do uporabe shranjeni na -80°C.

Merjenje morfoloških lastnosti trabekularne kosti je bilo opravljeno z mikroročunalniško tomografijo ( $\mu$ CT) visoke ločljivosti. To je nedestruktivna tehnika, pri kateri z uporabo radioaktivnega žarčenja in specializirane programske opreme dobimo 3D sliko željenega organa oziroma tkiva(37). Meritve  $\mu$ CT smo izvedli pri 10  $\mu$ m velikosti voxla (to je volumetrični pixel, ki predstavlja volumski del na tridimenzionalni mreži) in sicer z  $\mu$ CT optičnim čitalcem Skyscan 1172 (Skyscan, Aartselaar, Belgija). Vrednotenje meritev je bilo izvedeno pri 60 kV in 167  $\mu$ A z 0,5 mm aluminijevim filtrom ter rotacijskim korakom 0,60° (do rotacije 180°), obdelavo podatkov pa so izvedli s programom NRecon (različica 1.6.4.1., Skyscan). Preiskovani volumen 500x500x350 voxlov je bil izbran v središču biopta kosti z namenom, da bi izločili možne napake na površini vzorca, ki nastanejo pri odvzemu biopsije. Za izračun 3D strukturnih parametrov smo uporabili računalniški program CT Analyzer software (različica 1.11.8.0, Skyscan).

### **3.5. Določanje izražanja genov**

Osamitev celokupne RNA, njeno vrednotenje in obratno prepisovanje smo izvedli po postopku, ki je opisan v magistrski nalogi Tine Žuran (38).

#### **3.5.1. Verižna reakcija s polimerazo v realnem času**

Metoda verižne reakcije s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR) je postopek pomnoževanja specifičnih odsekov DNK in vitro. Je hitra, natančna in preprosta metoda, ki temelji na prileganju dveh začetnih oligonukleotidov, s katerima omejimo področje DNK, ki ga nato pomnožujemo(39). S PCR v realnem času lahko v vsakem ciklu izmerimo količino specifično pomnoženega produkta (40).

Prednosti PCR v realnem času (40):

- možnost spremljanja in zapisovanja procesa PCR tako kot se odvija v realnem času,
- možnost natančnega merjenja količine pomnoženega produkta v vsakem ciklu,
- povečano dinamično območje detekcije,
- ni potrebna post PCR analiza vzorcev.

Vsak cikel reakcije PCR je sestavljen iz treh korakov (Slika 2):

- o denaturacije: dosežemo jo s segrevanjem na 95°C, pri čemer se razkleneta komplementarni verigi DNA in iz dvoverižne dobimo enoverižno DNA,

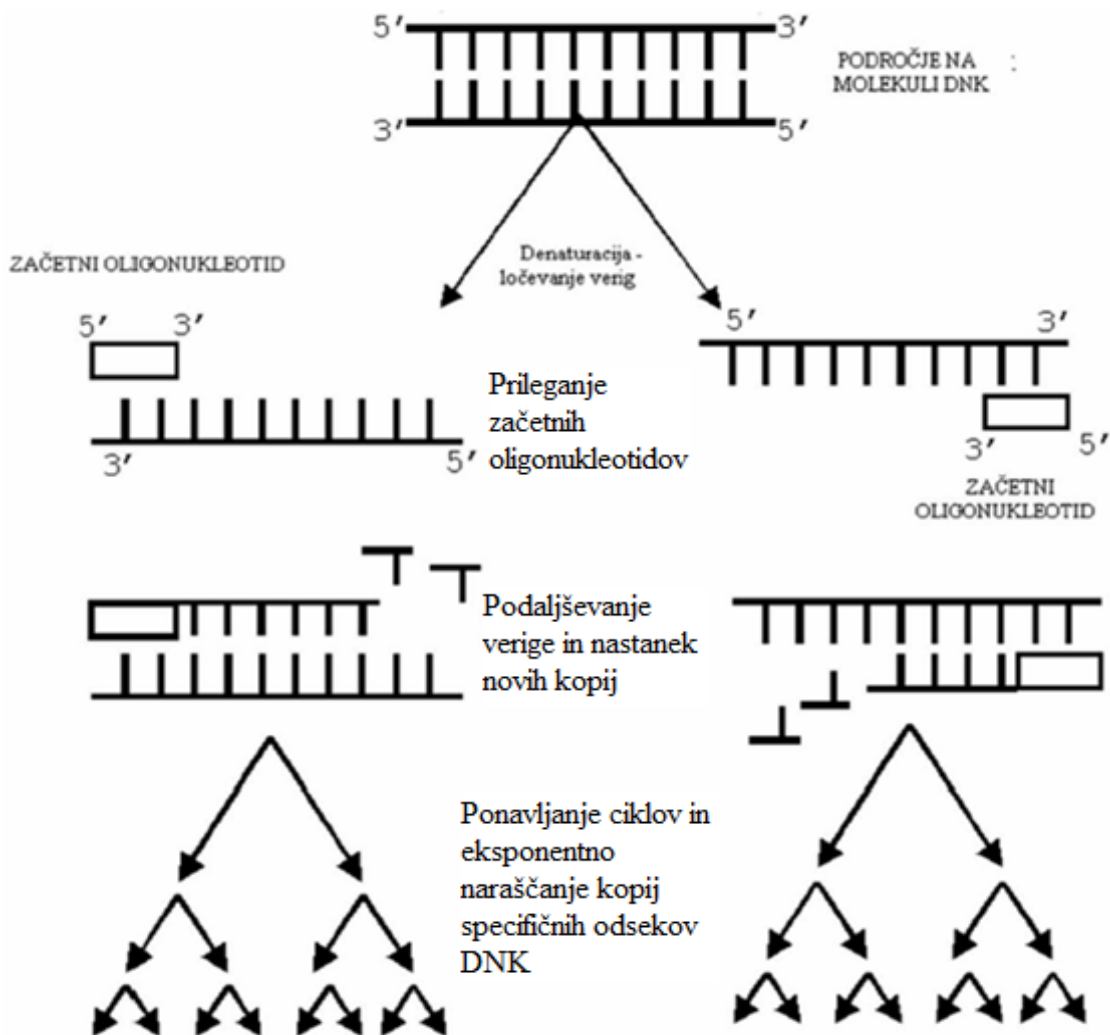


- prileganje: temperaturo znižamo na 40-60°C, s čimer omogočimo specifično prileganje vsakega začetnega oligonukleotida na eno od ločenih verig DNA,
- podaljševanja segmenta verige DNA: temperaturo dvignemo na 72°C, s čimer optimiziramo delovanje termostabilne polimeraze DNA (Taq polimeraza); ta v smeri 5' proti 3' podaljša zamejeni del posamezne verige DNA.

Ponavljjanje vseh treh cikloveksponentno poveča namnožene količine želenega odseka DNA. Ponavadi izvedemo 40 ciklov (39)(40).

Za pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo potrebujemo:

- tarčno DNA (genomska DNA ali komplementarna DNA),
- oligonukleotidne začetnike,
- mešanico vseh štirih deoksiribonucleotidnih trifofatov (dNTP – dATP, dGTP, dCTP in dTTP),
- termostabilno polimerazo DNA v ustrezni reakcijski raztopini,
- ione  $Mg^{2+}$ ,
- pufer za optimalno delovanje encima.



Slika 2: Shematski prikaz poteka reakcije PCR (39).

### 3.5.1.1. Načini detekcije:

Potek PCR v realnem času lahko zaznamo z različnimi tehnologijami fluorescenčne detekcije, kije sorazmerna količini nastalega produkta. Obstajata dve možnosti, in sicer lahko na ta način specifično zaznamo bodisi le zelene ali pa poleg tega tudi nespecifične produkte (40).

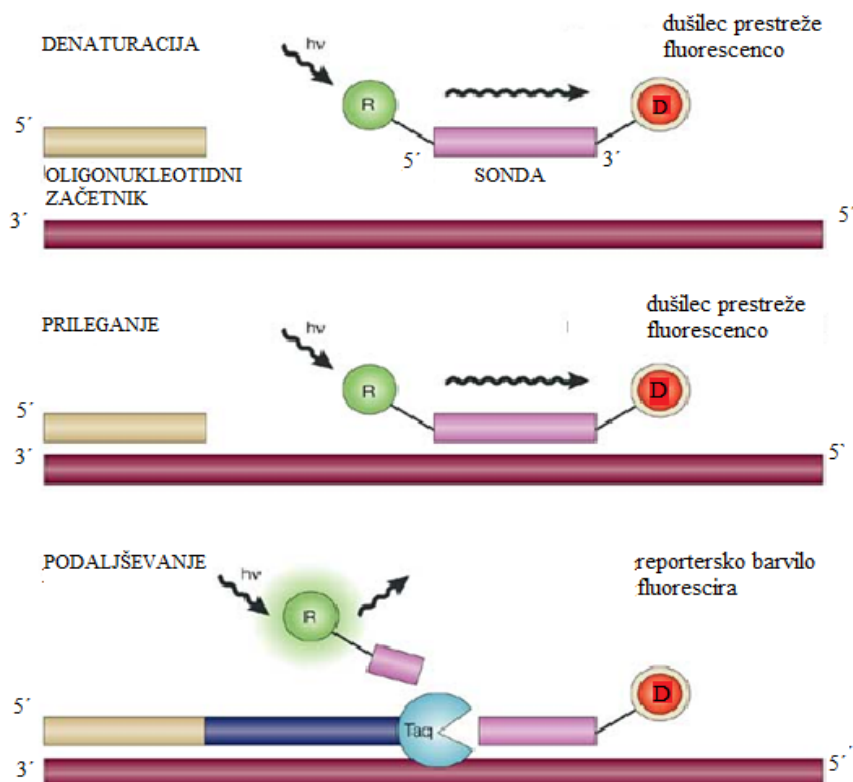
Za nespecifični način detekcije uporabljamo barvilo SYBR<sup>®</sup> Green. Deluje tako, da se vgradi v nastajajočo dvoverižno DNA (slika 3). Intenzivnost fluorescence, ki se pojavi, je proporcionalna količini nastalega produkta. Vendar pa zato, ker se barvilo veže nespecifično v vse dvoverižne verige DNA, lahko poleg specifičnega, ki ga želimo ovrednotiti, zaznamo tudi nespecifične produkte in celo dimere oligonukleotidnih

začetnikov. Zato po zaključku PCR v realnem času v tem primeru analiziramo še krivuljo taljenja, ki pa je specifična le za želeni produkt (41).



Slika 3: Detekcija zbarvilom SYBR® Green(42).

Za specifično detekcijo produktov uporabljamo hidrolizirajoče sonde TaqMan®. Te prepoznajo le pomnožena zaporedja DNA in se nanj vežejo v koraku prileganja. Taka sonda ima na obeh koncih vezana fluorofora. Na 5' koncu ima reportersko barvilo, ki fluorescira, na drugem 3' koncu pa dušilec (quencher), ki fluorescenco preseže (slika 4). Med reakcijo se sonda razcepi zaradi delovanja polimeraze DNA. Dušilec in reportersko barvilo se zato oddaljita drug od drugega, pri čemer reportersko barvilo zagotovi specifičen fluorescenčni signal, ki se z vsakim ciklom proporcionalno povečuje(41).



Slika 4: Shematski prikaz detekcije specifično pomnoženih produktov s sondo TaqMan® (43).

### 3.5.2. Priprava zmesi za PCR in reakcijski pogoji

Za izvedbo reakcije PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala univerzalno mešanico reagentov, oligonukleotidne začetnike ali sonde ter cDNA. Sestavine in njihovi volumski deleži v reakcijski zmesi za delo s sondami, so prikazani v preglednici V, za delo z oligonukleotidnimi začetniki pa v preglednici VI. Pri pripravi reagentov smo količino njihovih sestavin pomnožili glede na to, koliko reakcij smo nameravali izvesti, pri tem pa upoštevali tudi približno 10% prebitok zaradi predvidenih izgub pri pipetiranju.

Preglednica V: Sestavine reakcijske zmesi s sondami in njihove količine, potrebne za eno reakcijo qPCR za gena GAPDH in LPL.

	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Ultra čista voda	5,25
Sonde TaqMan 20x	0,75
5x HOT FIREPol* Probe qPCR Mix Plus (no ROX)	3
cDNA (1,5 ng/ $\mu\text{L}$ )	6

Preglednica VI: Sestavine reakcijske zmesi z oligonukleotidnimi začetniki in njihove količine, potrebne za eno reakcijo za gene FASN, RPLP0 (100nM) in LIPE (300nM).

	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) za 100 nM oligonukleotidnih začetnikov	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) za 300 nM oligonukleotidnih začetnikov
Ultra čista voda	5,85	5,55
Oligonukleotidni začetnik F (20 $\mu\text{M}$ )	0,075	0,225
Oligonukleotidni začetnik R (20 $\mu\text{M}$ )	0,075	0,225
5x HOT FIREPol* EvaGreen* qPCR MixPlus (no ROX)	3	3
cDNA (1,5 ng/ $\mu\text{L}$ )	6	6

Standarde smo pripravili s serijskim redčenjem mešanice cDNA različnih vzorcev, in sicer z začetno koncentracijo 100 ng/ $\mu\text{L}$ , pri čemer je bila vsebnost v najmočnejšem uporabljenem standardu 5ng/ $\mu\text{L}$ , in v najšibkejšem 0,3125ng/ $\mu\text{L}$ .

Nato smo pripravili mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinicami za PCR v realnem času. Pripravljene sestavine reakcijske zmesi smo dobro premešali in jih po 9 $\mu$ L odpipetirali v vsako od vdolbinic ter v vsako dodali še po 6 $\mu$ L cDNA. Pri tem smo standarde raztočili v štiri paralelkah, koncentracijo 0,3125ng/ $\mu$ L v petih paralelkah, negativno kontrolo in preiskovane vzorce pa v treh. Pri tem smo za negativno kontrolo uporabili ultra čisto vodo, s čimer lahko dokažemo, da med delom ni prišlo do kontaminacije z DNA.

Plošče smo nato zatesnili s samolepilno folijo in jih centrifugirali 5 minut pri 2100 obratih/minuto. Potem smo jo vstavili v Light Cycler 480 in nastavili reakcijske pogoje, ki so prikazani v preglednicah VII in VIII.

Temperature prileganja in podaljševanja ter koncentracije oligonukleotidnih začetnikov smo za vsak gen predhodno optimizirali.

Preglednica VII: Reakcijski pogoji za delo s sondami TaqMan.

Korak	Temperatura	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	95°C	15 minut	1
Denaturacija	95°C	30 sekund	45 x
Prileganje in podaljševanje	60°C	60 sekund	KVANTIFIKACIJA

Preglednica VIII: Reakcijski pogoji za delo z oligonukleotidnimi začetniki.

Korak	Temperatura	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	95°C	15 minut	1
Denaturacija	95°C	30 sekund	40 x
Prileganje in podaljševanje	60°C	60 sekund	KVANTIFIKACIJA
Talilna krivulja	65-97°C		

Za gen LIPE smo med postopkom optimizacije ugotovili, da je najustreznejša temperatura za prileganje in podaljševanje 60,6°C, zato smo jo v uporabljenem programu nastavili na 61°C.

### 3.5.3. Materiali in oprema

#### 3.5.3.1. Reagenti:

- 5x HOT FIREPol\* EvaGreen\* qPCR MixPlus (no ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia).
- Oligonukleotidni začetniki 20  $\mu$ M (Sigma Aldrich, Nemčija).

Preglednica IX: Zaporedja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov.

Gen (pristopna številka)	Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov (5'-3')	Velikost produkta PCR (bp)	Temperatura prileganja (°C)	Koncentracija oligonukleo- tidnih začetnikov (nmol/L)
LIPE (NM_005357.2)	F: AAGATGTCGGAGC CCATAGCAGAG R: CAGGGTCAGGTTC TTGAGGGAATC	108	61	300
FASN (NM_004104.4)	F: GGACTACAACCTC TCCCAGGTATG R: TGTGGATGATGCT GATGATGGAC	116	60	100
RPLP0 (NM_001002.3)	F: TCTACAACCCTGA AGTGCTTGAT R: CAATCTGCAGACA GACTACTGG	96	60	100

- cDNA.

- Sonda TaqMan® za gena GAPDH in LPL (Applied Biosystems; Hs99999905\_m1 in Hs00173425\_m1).
- Ultra čista voda (bidestilirana, avtoklavirana).

### 3.5.3.2. Aparature in pribor:

- avtoklav (Kambič laboratorijska oprema),
- avtomatska pipeta Research® pro (2-20 µL) (Eppendorf, Nemčija),
- avtomatska 12 kanalna mikropipeta (0,5-10 µL)(Eppendorf,Nemčija),
- C 1000™ Thermal Cycler (BioRad),
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Slovenija),
- ciklični pomnoževalnik LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Nemčija),
- mikro epruvete(Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija),
- delovna komora z UV svetilko (Biosan DNA/RNA UV-Cleaner),
- mešalnik Vortex genie 2 (Scientific Industries, Inc., USA),
- mikrotitrne plošče s 96 in 384 vdolbinicami za enkratno uporabo,
- samolepilna folija za mikrotitrne plošče,
- nastavki za pipete,
- polavtomatske pipete (2,5 µL; 20 µL; 200 µL; 1000 µL)(Eppendorf, Nemčija),
- zaščitne rokavice za enkratno uporabo.

## 3.6. Statistične metode

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program IBM SPSS Statistics 20.0. Preiskovance smo na podlagi diagnoze razdelili v tri skupine: 1. bolniki z osteoporozo, 2. bolniki z osteoartrozo in 3. kontrolna skupina.

S pomočjo Shapiro – Wilkovega testa smo poskušali ugotoviti, ali se izmerjeni parametri v posamezni skupini porazdeljujejo normalno. Stopnja tveganja, ki smo jo za test izbrali, je 0,05. V kolikor je bilo potrebno, smo spremenljivke logaritemsko transformirali. Za parametre, ki so se porazdeljevali normalno, smo v nadaljni analizi uporabili parametrične (ANOVA, ANCOVA, t-test), v nasprotnem primeru pa neparametrične teste (Mann-Whitneyev test, Kruskal-Wallisov test).

S Fisherjevim testom smo preverjalivplive spola. V ta namen smo uporabili internetni program SISA -Simple Interactive Statistical Analysis(<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fiveby2.htm>). S parametričnimi testi smo preverili tudi, kako se skupine preiskovancev med seboj razlikujejo po starosti, indeksu telesne teže (ANOVA) ter MKGk, MKGfn in MKGls (t-test).

S pomočjo ANCOVE z Bonferronijevim post-hoc testom smo nato statistično ovrednotili izbrane spremenljivke: delež kostnine (BV/TV), specifično površino kosti (BS/BV), površinsko gostoto kosti (BS/TV), debelino trabekul (Tb.Th), njihovo razmaknjenost (Tb.Sp) ter število (Tb.N), in sicer glede na postavljeno diagnozo, spol, starost in indeks telesne teže. Pri tem je izračunana vrednost  $p < 0,05$  pomenila statistično pomembno,  $p > 0,05$  pa statistično nepomembno razliko.

S testom ANCOVA smo preverili povezanost izražanja genov LPL in LIPE z izbranimi spremenljivkami, ki so se porazdeljevale normalno. Tudi v tem primeru je vrednost  $p < 0,05$  pomenila statistično pomembno  $p > 0,05$  pa statistično nepomembno razliko. Ker pri ANCOVA testu za gen FASN variance niso bile homogene, smo namesto tega uporabili test Kruskal-Wallis s katerim smo preverili povezanost njegovega izražanja z diagnozo.



## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Opis skupin preiskovancev

V raziskavo smo vključili 112 preiskovancev, od teh je bilo 35 moških in 77 žensk. Na podlagi kliničnih podatkov smo jih razdelili v tri skupine: na bolnike z osteoporozo, bolnike z osteoartrazo in kontrolno skupino. Skupine smo nato med seboj primerjali glede na spol, starost, indeks telesne mase in MKG, kar prikazujeta preglednici X in XI.

Preglednica X: Porazdelitev preiskovancev v skupine, glede na spol.

	osteoartroza	osteoporozna	kontrolna skupina
število moških	15	9	11
število žensk	33	41	3
skupaj	48	50	14

Rezultat Fisherjevega testa nam je pokazal statistično značilno neskladnost skupin v frekvencah spola ( $p < 0,001$ ). Torej moramo upoštevati, da lahko spol vpliva na možne razlike med skupinami v nadaljni analizi.

Preglednica XI: Klinični podatki preiskovancev v posameznih skupinah.

	<b>OA</b>	<b>OP</b>	<b>KS</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
				<b>(OA-OP)</b>	<b>(OA-KS)</b>	<b>(OP-KS)</b>
<b>Starost (leta)</b>	71,71 ± 2,02	75,42 ± 2,03	70,76 ± 5,66	0,040	0,908	0,101
<b>ITM (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,74 ± 1,22	25,26 ± 0,87	25,28 ± 1,79	< 0,001	0,006	1,000
<b>MKG-k (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0,900 ± 0,046	0,707 ± 0,046	/	< 0,001	/	/
<b>MKG-fn (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0,786 ± 0,045	0,600 ± 0,034	/	< 0,001	/	/
<b>MKG-ls (g/cm<sup>2</sup>)</b>	1,00 ± 0,059	0,201 ± 0,055	/	< 0,001	/	/

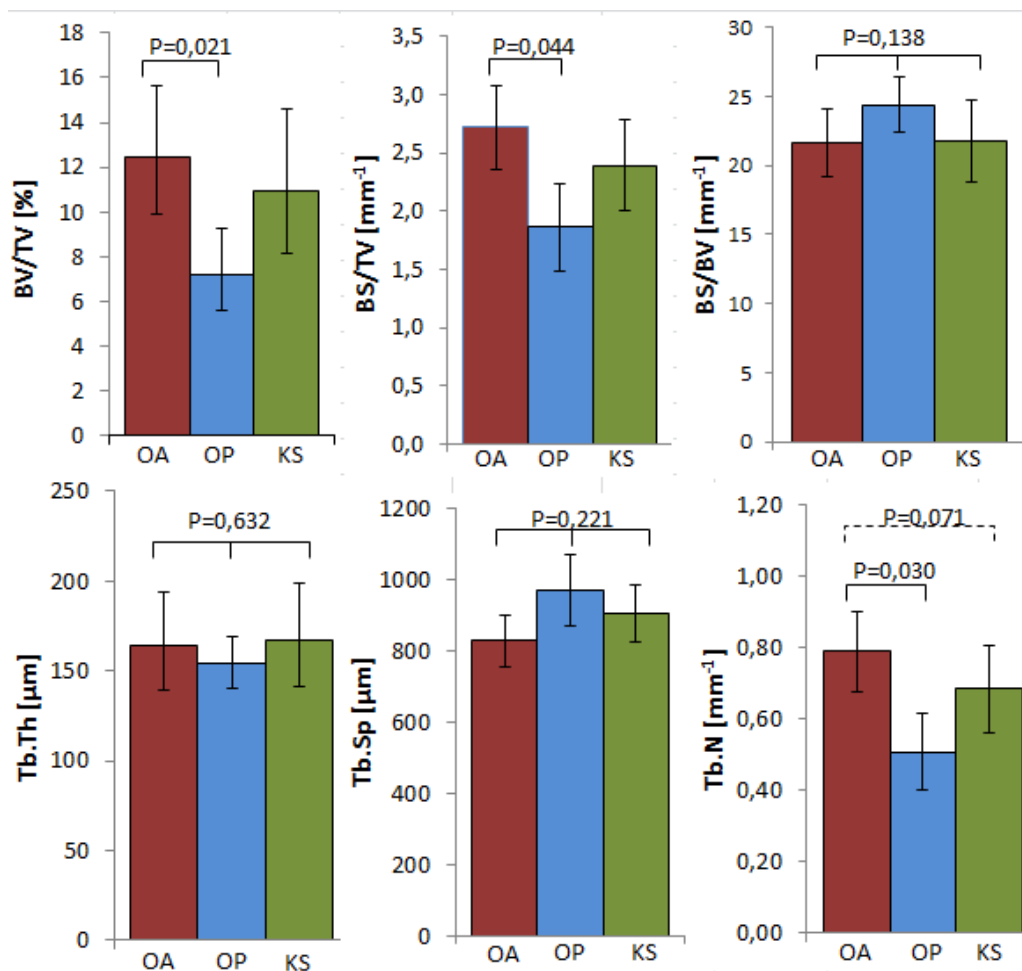
Legenda: OA – osteoartraza, OP – osteoporozna, KS – kontrolna skupina,

ITM – indeks telesne mase, MKG-k – mineralna kostna gostota kolka, MKG-fn – mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG-ls – mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc.

Za primerjavo starosti in ITM med preiskovanimi skupinami smo uporabili test ANOVA. Pri tem smo ugotovili, da se skupini bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo med seboj statistično značilno razlikujeta, in sicer tako glede starosti preiskovancev kot glede ITM. Medtem ko se zlom kolčnega sklepa pri osteoporozni pojavlja večinoma v starejši populaciji, pa je njena zamenjava pri osteoartrizi potrebna že pri mlajših. V ITM sta se prav tako razlikovali kontrolna skupina in skupina preiskovancev z osteoartrizo. Največji indeks telesne teže smo izmerili pri bolnikih z osteoartrizo, pri katerih je to tudi eden od pomembnejših dejavnikov tveganja za nastanek bolezni. Ker so se preiskovane skupine razlikovale v spolu, starosti in ITM, smo te spremenljivke uporabili kot kovariate v nadaljni statistični analizi. S t-testom smo skupini preiskovancev z osteoporozo in osteoartrizo med seboj primerjali glede na vrednosti MKG-k, MKG-fn in MKG-ls. Pri tem smo ugotovili, da imajo preiskovanci z osteoporozo statistično značilno nižje vrednosti MKG na vseh izmerjenih mestih, s tem pa potrdili obstoj nasprotnih fenotipov primerjanih skupinah.

## **4.2. Primerjava parametrov $\mu$ CT z meritvami MKG**

S testom ANCOVA smo preverili, kako se parametri  $\mu$ CT, in sicer delež kostnine (BV/TV), specifična površina kosti (BS/BV), površinska gostota kosti (BS/TV), debelina (Tb.Th), razmaknjenost (Tb.Sp) in število trabekul (Tb.N), razlikujejo glede na postavljeno diagnozo (slika 5).



Slika 5: Primerjava parametrov  $\mu$ CT izmerjenih v vsaki od treh skupin preiskovancev.

Ugotovili smo, da imajo preiskovanci z osteoartrazo značilno višje vrednosti BV/TV, BS/TV in Tb.N v primerjavi s tistimi z osteoporozo, kar potrjuje drugačna fenotipav obeh skupinah. Za delež kostnine je sicer značilno, da med vzpostavljeno osteoporozo in zgodnjo fazo osteoartraze ni opaznih razlik. Te se pojavijo šele pri napredovani osteoartrazi (44). Razlike smo opazili tudi v površinski gostoti kosti, ki je bila pri bolnikih z osteoporozo statistično značilno manjša kot pri tistih z osteoartrazo. Slednji so imeli tudi manjše število trabekul v primerjavi z bolniki z osteoartrazo, podoben trend pa smo opazili tudi med skupino preiskovancev z osteoartrazo in kontrolno skupino. Pri osteoporozo se namreč postopno tanjšajotrabekule, gradbene enote kosti, hkrati pa se zmanjšuje tudi njihovo število. Posledica je zmanjšana gostota kosti in spremenjena mikroarhitektura, kar vodi v krhkost kosti in pogostejše zlome. Pri primerjavi vseh ostalih parametrov med skupinami pa nismo opazili statistično značilnih razlik. Podobne rezultate so dobili tudi Zhang in sod., ki so kostne vzorce analizirali s pomočjo  $\mu$ CT in pokazali, da je bila

vrednost BV/TV višja pri bolnikih z osteoartrozo, pri čemer prav tako nismo opazili razlik v parametru Tb.Sp med preiskovanci z osteoartrozo in osteoporozo. So pa ugotovili statistično signifikantno razliko v parametru Tb.Th, ki je mi nismo zaznali. Dokazali smo razliko v parametru Tb.N med preiskovanci z osteoartrozo in osteoporozo, o čemer pa omenjeni avtorji niso poročali. Število preiskovancev vključenih v raziskavo Zhang in sod. je bilo majhno (OA=8, OP=9), poleg tega pa so vzorce jemali iz vratu stegnenic, medtem ko smo jih mi iz intertrohantra, kar bi lahko bil vzrok za opisane razlike med študijama (44). Prav tako nismo dokazali razlik med skupinama preiskovancev z osteoporozo in osteoartrozo, v njuni primerjavi s kontrolno skupino, pri čemer pa moramo opozoriti na manjšo moč študije, saj je bila analiza bioptičnih vzorcev  $\mu$ CT narejena na razmeroma majhnem številu preiskovancev.

Preglednica XII prikazuje povezanost vrednosti MKG-k s parametri  $\mu$ CT. Vrednost MKG pozitivno korelira z deležem kostnine, površinsko gostoto kosti in številom trabekul, negativno pa z razmaknjenostjo slednjih. Podobno so dokazali tudi v raziskavi, v kateri so preiskovankam z različnimi tehnikami merili kostne parametre. Ugotovili so, da se ob zvišanju vrednosti MKG zvišajo parametri Tb.Th, Tb.N in BV/TV, ne pa tudi Tb.Sp (45). Sami smo zabeležili podobne rezultate, in sicer s tremi od omenjenih parametrov, z izjemo debeline trabekul. Med vrednostmi BS/BV in Tb.Th nismo ugotovili statistično značilne korelacije. Glede na to, da vrednost MKG odraža vsebnost mineralov v kosti, ne more biti neposredno povezana s parametri  $\mu$ CT (46). Omenjeni parametri nam namreč dajejo informacijo o količini kostnine, v kateri pa je približno 70 % mineralov (47).

Preglednica XII: Korelacija med  $\mu$ CT in MKG kolka v celotni skupini preiskovancev z osteoporozo in osteoartrozo. Vrednosti so podane v obliki Pearsonovih korelacijskih koeficientov, v oklepajih so navedene p vrednosti.

N=21	ln BV/TV	BS/BV	BS/TV	ln Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N
MKG-k	0,659 (P<0,001)	-0,260 (P=0,255)	0,768 (P<0,001)	0,120 (P=0,603)	-0,654** (P=0,001)	0,772 (P<0,001)

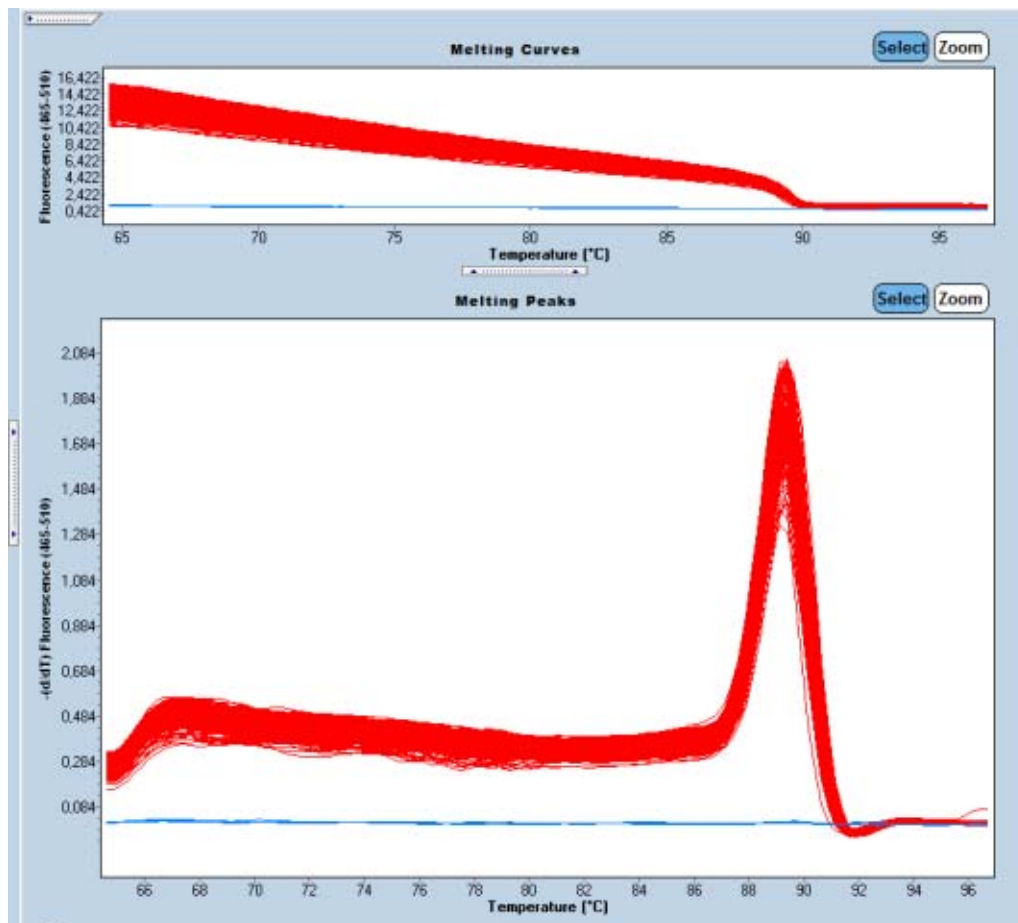
Legenda:

\*\* - korelacija je statistično signifikantna pri vrednosti  $p=0,01$

N – število preiskovancev

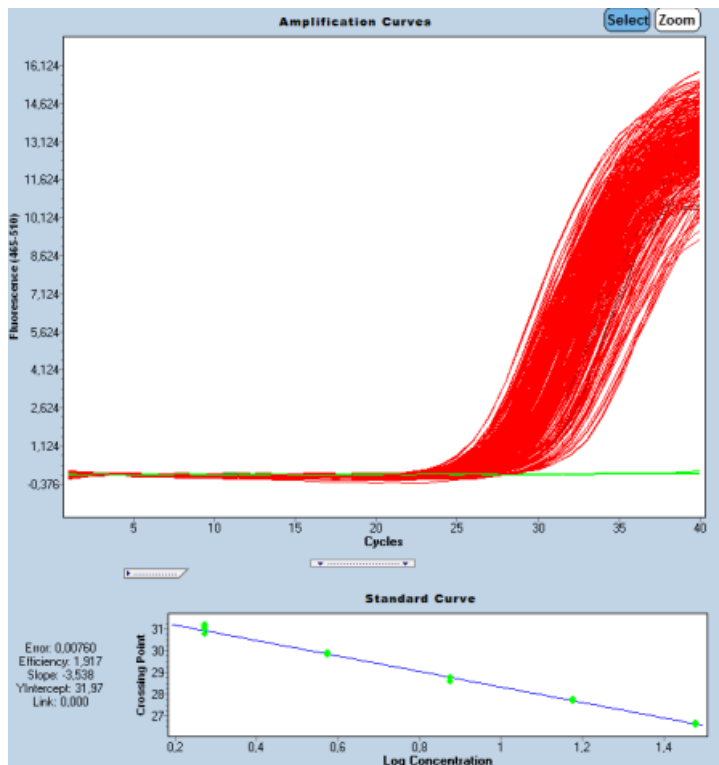
### 4.3. Analiza izražanja preiskovanih genov

Izražanje preiskovanih genov smo merili z metodo PCR v realnem času. Za ugotavljanje obsega izražanja genov FASN in LIPE smo uporabili oligonukleotidne začetnike, medtem ko smo v primeru LPL uporabili sonde TaqMan. Pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov smo najprej izvedli teste optimizacije temperature prileganja. Najprimernejšo temperaturo smo določili s talilno krivuljo, s čemer smo preverili, da je nastal le en produkt, in sicer v čim večji količini. Primer ustrezne talilne krivulje pri kateri spremljamo le en produkt in kjer meritve med seboj ne odstopajo, je prikazan na sliki 6.

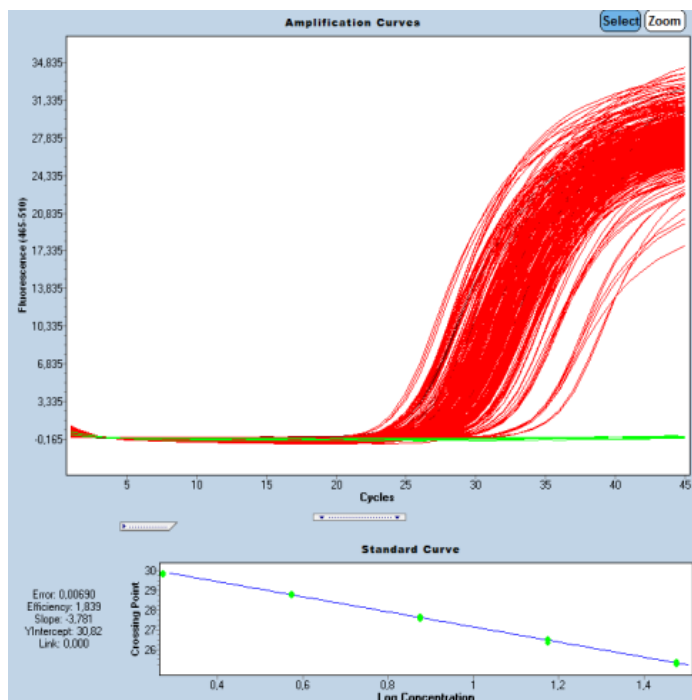


Slika 6: Talilna krivulja pomnoženega produkta za gen FASN.

Nato smo pregledali še prileganje umeritvenih krivulj. Na slikah 7 in 8 sta prikazani uspešno izvedeni reakciji PCR v realnem času, prva za merjenje izražanja gena FASN, s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov, druga pa za merjenje izražanja gena LPL, s pomočjo sond TaqMan.



Slika 7: Rezultat reakcije PCR v realnem času za gen FASN, izmerjen z aparatom Light Cycler 480.



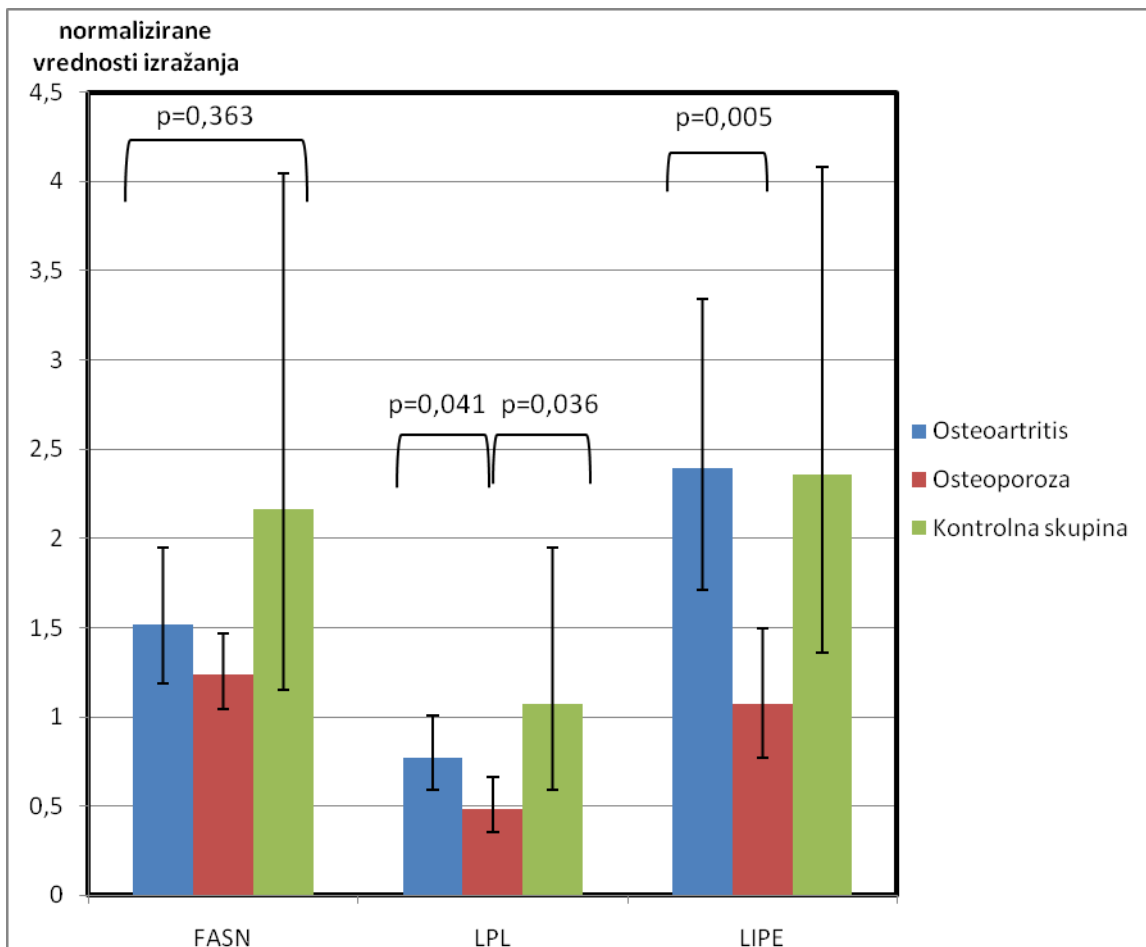
Slika 8: Rezultat reakcije PCR v realnem času za gen LPL, izmerjen z aparatom Light Cycler 480.

#### **4.4. Izražanje genov FASN, LIPE in LPL v kostnem tkivu bolnikov z osteoporozo in osteoartrozo ter preiskovancem v kontrolni skupini**

Za ugotavljanje razlik v izražanju gena za FASN med primerjanimi skupinami smo uporabili Kruskal-Wallisov test, saj variance niso bile homogene. Test je pokazal, da med primerjanimi skupinami ni statistično značilnih razlik, ker se FASN v vseh izraža v enaki meri (slika 9), to pa pomeni, da naj v de novo sintezi prostih MK med njimi ne bi bilo razlik.

Za ugotavljanje razlik v izražanju genov LPL in LIPE smo uporabili test ANCOVA. V obeh primerih smo pokazali, da obstajajo razlike med primerjanimi skupinami, in sicer glede na postavljeno diagnozo. Pri izražanju gena LPL smo ugotovili razlike tako med preiskovanci z osteoporozo in osteoartrozo kot tudi med preiskovanci z osteoporozo in kontrolno skupino. Pri tem so preiskovanci z osteoporozo v manjšem obsegu izražali gen LPL, in sicer tako v primerjavi s skupino z osteoartrozo kot tudi s kontrolno skupino, kar prikazuje slika 9. Posledično bi torej lahko pri bolnikih z osteoporozo nastajalo manj encima lipoproteinske lipaze, ki igra pomembno vlogo v transportu in skladiščenju oziroma v privzemu prostih MK. Pri izražanju gena LIPE pa so se razlike pokazale le pri preiskovancih z osteoporozo in osteoartrozo. V primeru osteoporoze je bilo izražanje tega gena manjše, kar pomeni, da bi lahko pri tej bolezni nastajalo manj hormonsko senzitivne lipaze, encima ki sodeluje pri procesu lipolize. V kostnem tkivu bolnikov z osteoporozo je zaradi zmanjšanega izražanja LPL najverjetneje prisoten manjši privzem MK, v primerjavi s kontrolno skupino in z bolniki z osteoartrozo, poleg tega pa tudi manjše sproščanje MK zaradi manjšega obsega izražanja gena LIPE, a le v primerjavi z bolniki z osteoartrozo. Omenjeni rezultati nakazujejo, da so adipociti, prisotni v kostnem tkivu bolnikov z osteoporozo, na nivoju izražanja preiskovanih genov metabolno manj aktivni.

Slika 9 prikazuje geometrijsko sredino ter 95 % interval zaupanja normaliziranih vrednosti izražanja genov FASN, LPL in LIPE, v vseh treh preiskovanih in primerjanih skupinah. Prikazane so tudi vrednostip, ki smo jih izračunali s pomočjo Kruskal-Wallisovega testa in testa ANCOVA.



Slika 9: Primerjava obsegov izražanja genov za LIPE, LPL in FASN, v vseh treh preiskovalnih skupinah.

#### 4.5. Korelacijska analiza izražanja genov in parametrov $\mu$ CT ter vrednosti MKG

Preverili smo, kako so parametri  $\mu$ CT povezani z izražanjem preiskovanih genov. Iz rezultatov prikazanih v preglednicah XIII, XIV, XV, XVI in XVII je razvidno, da noben od treh genov ni statistično značilno povezan s parametri  $\mu$ CT ter z vrednostmi MKG-k, MKG-fn in MKG-ls. Pri tem pa moramo upoštevati dejstvo, da je bila analiza  $\mu$ CT narejena na razmeroma majhnem številu biopsij preiskovancev; v skupini z osteoporozo in osteoartrozo na 17-ih, v kontrolni skupini pa na 14-ih vzorcih). Ker smo pri izražanju genov za LPL in LIPE ugotovili statistično pomembne razlike med bolniki z osteoporozo in osteoartrozo, za katere so značilne znižane oziroma zvišane vrednosti MKG, bi



lahkopričakovali, pozitivne rezultatekorelacijske analize. Ker temu ni bilo tako, menimo, da bi bilo smiselno raziskavo ponoviti na večjem številu preiskovancev.

Preglednica XIII: Prikaz korelacije med vrednostmi parametrov  $\mu$ CT in izraženostjo preiskovanih genov pri kontrolni skupini. Vrednosti so podane v obliki Pearsonovih korelacijskih koeficientov, v oklepajih pa so prikazane vrednosti p.

	ln BV/TV	BS/BV	BS/TV	ln Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N
ln LPL	-0,242 (p=0,404)	0,190 (p=0,516)	-0,140 (p=0,632)	-0,239 (p=0,411)	0,126 (p=0,668)	-0,132 (p=0,653)
ln LIPE	-0,183 (p=0,531)	0,174 (p=0,553)	-0,081 (p=0,782)	-0,225 (p=0,439)	0,125 (p=0,671)	-0,075 (p=0,800)
ln FASN	0,118 (p=0,688)	-0,067 (p=0,819)	0,213 (p=0,465)	-0,042 (p=0,885)	-0,150 (p=0,609)	0,240 (p=0,409)

Preglednica XIV: Prikaz korelacije med vrednostmi parametrov  $\mu$ CT in izraženostjo preiskovanih genov pri preiskovancih z osteoporozo. Vrednosti so podane v obliki Pearsonovih korelacijskih koeficientov, v oklepajih pa so prikazane vrednosti p.

	ln BV/TV	BS/BV	BS/TV	ln Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N
ln LPL	-0,163 (p=0,546)	-0,033 (p=0,902)	-0,194 (p=0,472)	0,114 (p=0,674)	0,207 (p=0,442)	-0,225 (p=0,403)
ln LIPE	0,268 (p=0,335)	0,186 (p=0,508)	0,342 (p=0,213)	-0,283 (p=0,306)	-0,398 (p=0,142)	0,384 (p=0,157)
ln FASN	-0,040 (p=0,884)	-0,108 (p=0,691)	-0,076 (p=0,779)	0,090 (p=0,739)	0,141 (p=0,603)	-0,058 (p=0,830)

Preglednica XV: Prikaz korelacije med vrednostmi MKG in izraženostjo preiskovanih genov pri preiskovancih z osteoporozo. Vrednosti so podane v obliki Pearsonovih korelacijskih koeficientov, v oklepajih pa so prikazane vrednosti p.

	MKG-k	MKG-fn	MKG-ls
ln LPL	-0,136 (p=0,430)	-0,160 (p=0,353)	0,022 (p=0,897)
ln LIPE	0,060 (p=0,743)	-0,023 (p=0,902)	0,029 (p=0,877)
ln FASN	-0,002 (p=0,990)	-0,017 (p=0,923)	0,029 (p=0,864)

Preglednica XVI: Prikaz korelacije med vrednostmi parametrov  $\mu$ CT in izraženostjo preiskovanih genov pri preiskovancih z osteoartrozo. Vrednosti so podane v obliki Pearsonovih korelacijskih koeficientov, v oklepajih pa so prikazane vrednosti p.

	ln BV/TV	BS/BV	BS/TV	ln Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N
ln LPL	0,213 (p=0,412)	-0,247 (p=0,339)	0,151 (p=0,562)	0,189 (p=0,467)	-0,132 (p=0,615)	0,118 (p=0,651)
ln LIPE	0,037 (p=0,891)	-0,104 (p=0,702)	0,032 (p=0,906)	0,048 (p=0,861)	-0,026 (p=0,925)	0,036 (p=0,896)
ln FASN	0,026 (p=0,922)	-0,128 (p=0,623)	0,028 (p=0,915)	-0,008 (p=0,975)	-0,074 (p=0,778)	0,073 (p=0,782)

Preglednica XVII: Prikaz korelacije med vrednostmi MKG in izraženostjo preiskovanih genov pri preiskovancih z osteoartrozo. Vrednosti so podane v obliki Pearsonovih korelacijskih koeficientov, v oklepajih pa so prikazane vrednosti p.

	MKG-k	MKG-fn	MKG-ls
ln LPL	0,051 (p=0,748)	0,055 (p=0,727)	0,127 (p=0,406)
ln LIPE	0,086 (p=0,614)	0,078 (p=0,646)	0,207 (p=0,201)
ln FASN	0,099 (p=0,528)	0,095 (p=0,546)	0,203 (p=0,182)

## 5. SKLEP

Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času smo izmerili obseg izražanja genov za FASN, LIPE in LPL v kostnem tkivu preiskovancev z osteoporozo in osteoartrozo ter kontrolni skupini.

Pri tem smo ugotovili naslednje:

- razlike v številupredstavnih obeh spolov v vseh treh skupinah preiskovancev, pri čemer je bilo moških v skupini preiskovancev z osteoporozo in osteoartrozo statistično značilno manj kot žensk, v kontrolni skupini pa več;
- preiskovanci so se razlikovali tudi glede starosti in indeksu telesne mase (ITM), pri čemer so bili preiskovanci z osteoporozo starejši od tistih v ostalih dveh skupinah, medtem ko so imeli preiskovanci z osteoartrozo večji ITM od tistih v ostalih dveh skupinah;
- preiskovanci z osteoartrozo so imeli statistično značilno višje vrednosti BV/TV, BS/TV in Tb.N ter manjši Tb.Sp, v primerjavi s tistimi z osteoporozo;
- vrednosti MKG so pozitivno korelirale z izmerjenimi deleži kostnine, površinsko gostoto kosti in številom trabekul, negativno pa z razmahnjenostjo slednjih;
- pri preučevanju izražanja gena za FASN nam izvedeni Kruskal-Wallisov test nakazuje, da naj, v de novo sintezi prostih MK, med primerjanimi skupinami ne bi bilo razlik;
- preiskovanci z osteoporozo so v manjšem obsegu izražali gen za LPL, in sicer v primerjavi tako s skupino bolnikov z osteoartrozo kot tudi s kontrolno skupino;
- preiskovanci z osteoporozo so v statistično značilno nižjem obsegu izražali tudi gen za LIPE, v primerjavi s tistimi z osteoartrozo;
- izražanje preiskovanih genov ni koreliralo s parametri  $\mu$ CT in vrednostmi MKG-k, MKG-fn in MKG-ls.

Znašo raziskavo smo uspeli dokazati statistično značilno šibkejšo izražanje gena za LPL pri preiskovancih z osteoporozo, v primerjavi z drugima skupinama ter manjši obseg izražanja gena za LIPE pri preiskovancih z osteoporozo v primerjavi s tistimi z osteoartrozo, medtem ko med obsegom izražanja genov in parametri  $\mu$ CT ter vrednostmi MKG nismo uspeli dokazati nobene povezave. Na osnovi teh rezultatov sklepamo, da bi bili preiskovani encimi lahko vpleteni predvsem v patogenezi osteoporoze. Zato menimo, da bi bilo smiselno raziskavo ponoviti na večjem številu preiskovancev, pri tem pa bi

morali uravnotežiti število moških in žensk v primerjanih skupinah. Prav tako moramo upoštevati tudi dejstvo, da smo izražanje genov merili na nivoju mRNA, medtem ko na aktivnost lipolize in lipogeneze pomembno vplivajo tudi hormoni, zato bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno vključiti tudi te.

## LITERATURA

1. Hammett-Stabler CA: Osteoporosis, from pathophysiology to treatment: special topics in diagnostic testing. AACCPress, 2004: 1-20.
2. Keenan M, Pignolo R, Hebel N: Fractures in the Elderly, A Guide to Practical Management, Humana Pr Inc, New York, 2011: 4-5.
3. Khurana J: Bone Pathology, 2nd Edition, Humana Pr Inc, New York, 2009: 1-6.
4. Williams D, Lemke T: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5th Edition. Lippincott, Williams & Wilkins, 2002: 741-746.
5. Mundy G: Bone remodeling and its disorders, 2nd Edition. Informa HealthCare, London, 1999: 2-36.
6. Pal M, Kranjc I: Osteoimunologija: RANKL/RANK/OPG citokinski sistem. Medicinski mesečnik, marec-april 2008, 4:94-97.
7. Compston J, Shane E: Bone disease of organ transplantation, Elsevier Academic Press, 2005: 31-41.
8. Kumar P, Clark M: Clinical Medicine, 6th Edition, Elsevier Saunders, 2005: 593-595.
9. Kocijančič A, Mravlje F: Interna medicina, 3 izdaja, Lettera picta, Ljubljana, 2005: 676, 916-925, 1364-1374.
10. Kocijančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. Zdravniški vestnik 2002, 71: 571-573.
11. Pal M, Kranjc I, Potočnik U: Osteoarthritis: patogeneza in farmakološko zdravljenje. Medicinski mesečnik, marec-april 2008, 4:88-93.
12. Esih E: Osteoartroza. Naša lekarna št. 27, november 2008: 38-40.
13. Boyer R: Temelji biokemije. Študentska založba, 2008: 215, 490, 502-505.
14. Bray G, Bouchard C: Handbook of obesity: etiology and pathophysiology, 2nd Edition. Marcel Dekker Inc, New York, 1998: 515-518.

15. Rosen C, Ackert-Bicknell C, Rodriguez J, Pino M: Marrow Fat and the Bone Microenvironment: Developmental, Functional, and Pathological Implications. *CritRev Eukaryot Gene Expr.* 2009, 19(2): 109-124.
16. Ng A, Duque G: Osteoporosis as a Lipotoxic Disease. *IBMS BoneKey*, marec 2010. 7(3): 108-123.
17. Savopoulos C, Dokos C, Kaiafa G, Hatzitolios: Adipogenesis and osteoblastogenesis: trans-differentiation in the pathophysiology of bone disorders. *Hippokratia*, jan-mar 2011. 15(1): 18-21.
18. Williams G, Wang Y, Callon K, Watson M, Lin J, Lam J, Costa J, Orpe A, Broom N, Naot D, Reid I, Cornish J: Vitro and in Vivo Effects of Adiponectin on Bone. *Endocrinology*, avgust 2009. 150(8): 3603-3610.
19. Cao J: Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2011, 6:30.
20. Maurin A, Chavassieux P, Frappart L, Delmas P, Serre C, Meunier P: Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* , 2000. 26:485-489.
21. Kruger MC, Coetzee M, Haag M, Weiler H: Long chain polyunsaturated fatty acids: selected mechanisms of action on bone. *Progress in Lipid Research*, 2010.
22. Elbaz A, Wu X, Rivas D, Gimble J, Duque G: Inhibition of Fatty Acid Biosynthesis Prevents Adipocyte Lipotoxicity on Human Osteoblasts In Vitro. *J Cell Mol Med*, 2009.
23. Oh R, Sul J, Kim Y, Kim J, Yu R, Suh H, Choi S: Saturated fatty acids enhance osteoclast survival. *J Lipid Res*, 2010. 51:892-899.
24. Cornish J, MacGibbon A, Lin J, Watson M, Callon K, Tong P, Dunford J, Van der Does Y, Williams G, Grey A: Modulation of osteoclastogenesis by fatty acids. *Endocrinology*, 2008. 149:5688-5695.
25. Storey K: *Functional metabolism: regulation and adaptation*. Wiley-Liss Inc., Hoboken, New Jersey, 2004: 252,253.

26. Kuchel P, Ralston G: Schaums outlines biochemistry, 2nd Edition. McGraw-Hill, 2003: 362, 374-378.
27. Vance D: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes, 5th Edition. Elsevier, 2008: 171-173.
28. Menendez J, Lupu R: Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 2007. 7: 763-777.
29. Liu H, Liu J, Wu X, Zhang J: Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *Int J Biochem Mol Biol* 2010 in 1(1):69-89.
30. Thompson B, Lobo S, Bernlohr D: Fatty acid flux in adipocytes: The in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology* 318(2010):24-33.
31. Hargreaves M, Spriet L: Exercise metabolism, 2nd Edition. Human Kinetics, Inc. 2006: 89-92.
32. Ailhaud G: Adipose tissue protocols. Humana press inc, New Jersey, 2001: 97-99.
33. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R: Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res.* 2011 January in 14–27., 50(1-4):.
34. Aznar L, Pigeot I, Ahrens W: Epidemiology of Obesity in Children and Adolescents: Prevalence and Etiology. Springer, 2011: 261-262.
35. Wang H, Eckel R: Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E271–E288, 2009.
36. Tsutsumi K: Lipoprotein Lipase and Atherosclerosis. *Current Vascular Pharmacology*, 2003, 1, 11-17.
37. Bouxsein M, Boyd S, Christiansen B, Guldberg R, Jepsen K, Muller R: Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010. 25: 1468–1486.

38. Žuran T: Povezanost fibroblastnega rastnega dejavnika 23 in signalne poti RANK/RANKL/OPG v kostnem tkivu pri bolnikih z osteoporozo. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
39. Drobnič K: Ugotavljanje identitete posameznika z uporabo genetskih informacij, metode verižne reakcije s polimerazo in računalniško podprte tehnologije. Zbornik Mednarodnega posveta Biološka znanost in družba, Zavod RS za šolstvo, Ljubljana 2007, 152-163.
40. Real time analysis: from theory to practice. Invitrogen Corporation, 2008.
41. Foy C, Parkes H: Emerging Homogeneous DNA-based Technologies in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry* 2001. 47: 990–1000.
42. Parida M, Santhosh S, Dash P, Lakshmana Rao P: Assays for Detection and Quantification of Chikungunya Virus: SYBR Green I Real-time RT-PCR. *Future Virology*, 2008. 3(2):179-192.
43. Koch W: Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004. 3: 749-761.
44. Zhang Z, Li Z, Jiang L, Jiang S, Dai L: Micro-CT and mechanical evaluation of subchondral trabecular bone structure between postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2010. 21:1383–1390.
45. Petrantonaki M, Maris T, Damilakis J: MRI Techniques for the Examination of Trabecular Bone Structure. *Current Medical Imaging Reviews*, 2005. 1: 35-41.
46. Čokolič M: Osteoporozo in uradna stališča ISCD. *Zdravniški vestnik*, 2004. 4:165-354.
47. Bilezikian J, Raisz L, Rodan G: Principles of bone biology, 2nd Edition. Academic Press, 2002. Vol.1: 24.



## PRILOGA

Vzorec	Oznaka študije	FASN	LPL	LIPE
101	Darja	1,26673	0,175275	2,091702
102	Darja	/	0,090252	/
103	Darja	0,854563	0,177723	0,617
104	Darja	2,610496	1,381411	5,652552
105	Darja	0,96028	0,23514	0,680004
106	Darja	1,15751	0,620542	0,725365
107	Darja	0,882232	0,205984	0,753016
108	Darja	5,732321	1,509451	7,527519
109	Darja	2,026201	0,098023	0,482755
110	Darja	0,885503	0,192767	0,737899
111	Darja	2,808022	0,642629	6,155788
112	Darja	0,950852	0,058425	0,45547
114	Darja	1,361154	0,699847	0,500323
35	Darja	1,472189	0,278408	/
36	Darja	1,575766	1,923368	0,75139
37	Darja	1,403665	0,267609	1,558656
38	Darja	0,600538	1,258255	/
39	Darja	3,76471	1,436741	4,114208
40	Darja	0,758857	0,545189	0,857342
41	Darja	2,170899	0,649181	1,779221
42	Darja	1,408429	0,077823	0,372968
43	Darja	1,3521	0,678264	0,801987
44	Darja	0,964203	0,652158	0,99784
45	Darja	0,905936	0,235753	1,325034
46	Darja	0,445818	0,479508	/
47	Darja	2,40212	0,588202	/
49	Darja	1,321635	0,06799	/
51	Darja	3,819835	2,138388	6,00269
52	Darja	0,823333	0,175404	0,294637
53	Darja	1,042466	0,163347	0,373515

55	Darja	2,633225	1,31215	/
60	Darja	9,010155	4,677249	23,41513
64	Darja	0,74209	0,461652	/
67	Darja	0,795503	0,319326	0,763765
68	Darja	2,844994	1,74495	/
70	Darja	1,493614	0,40533	1,547623
72	Darja	0,985979	0,327835	1,206632
73	Darja	0,984455	0,401382	1,153045
76	Darja	0,886888	0,375768	2,032521
77	Darja	0,949347	0,343267	1,083598
78	Darja	4,009783	3,016596	9,801085
79	Darja	1,256674	0,761344	2,242391
81	Darja	0,768319	0,257851	1,220013
82	Darja	0,98799	0,20058	0,978575
84	Darja	1,754851	0,501437	5,000534
86	Darja	2,406655	1,227281	1,205412
88	Darja	3,698839	2,82185	8,660701
89	Darja	1,606533	0,569653	/
90	Darja	1,413352	0,311431	0,356109
91	Darja	14,34667	6,0826	13,36616
92	Darja	1,461721	0,703338	2,925544
94	Darja	6,386282	4,202495	27,76851
96	Darja	6,518047	3,47013	6,680108
97	Darja	1,646774	0,684607	1,652091
01-IT	kadavri	10,78689	2,604351	4,54999
02-IT	kadavri	0,784148	0,328648	0,612338
08-IT	kadavri	1,044734	1,210221	1,555006
25-IT	kadavri	1,384384	1,323634	2,343134
26-IT	kadavri	18,76944	8,872029	20,6634
28-IT	kadavri	4,429321	1,784887	4,008808
30-IT	kadavri	1,33507	0,252528	1,696631
33-IT	kadavri	1,653294	1,485349	3,015444
34-IT	kadavri	0,544592	0,581753	1,221321

<b>35-IT</b>	kadavri	0,833824	0,50034	0,767916
<b>37-IT</b>	kadavri	1,262052	0,862452	2,821541
<b>38-IT</b>	kadavri	6,906997	4,188005	8,709986
<b>39-IT</b>	kadavri	4,808883	1,143028	1,355101
<b>40-IT</b>	kadavri	1,13178	0,278978	1,198206
<b>103 V</b>	Vindišar	1,142635	0,286214	0,536116
<b>107 V</b>	Vindišar	0,949016	1,673218	0,650006
<b>108 V</b>	Vindišar	1,729992	0,500153	7,224486
<b>114 V</b>	Vindišar	0,68509	0,675571	1,005866
<b>117 V</b>	Vindišar	0,890292	0,337682	1,119901
<b>121 V</b>	Vindišar	0,538984	0,180791	0,196665
<b>123 V</b>	Vindišar	0,853112	0,903369	0,851031
<b>130 V</b>	Vindišar	2,807617	4,576318	2,835651
<b>133 V</b>	Vindišar	1,118368	0,097646	0,267572
<b>135 V</b>	Vindišar	0,524662	0,145846	0,432065
<b>137 V</b>	Vindišar	1,392466	3,652031	2,737477
<b>141 V</b>	Vindišar	1,133489	1,574017	0,236328
<b>144 V</b>	Vindišar	1,115613	2,078811	0,724103
<b>147 V</b>	Vindišar	6,367396	3,640755	9,845993
<b>151 V</b>	Vindišar	0,842981	0,779253	1,301831
<b>152 V</b>	Vindišar	0,365596	0,620792	0,74332
<b>158 V</b>	Vindišar	3,233124	0,882128	21,23458
<b>162 V</b>	Vindišar	2,594235	1,877768	4,043116
<b>164 V</b>	Vindišar	0,571485	0,405201	0,29411
<b>172 V</b>	Vindišar	0,334975	0,133401	/
<b>179 V</b>	Vindišar	1,84234	0,207205	1,194231
<b>181 V</b>	Vindišar	2,82644	3,264116	6,819994
<b>186 V</b>	Vindišar	0,524402	1,133235	0,424144
<b>187 V</b>	Vindišar	0,559935	0,704331	0,754456
<b>189 V</b>	Vindišar	0,812475	0,520637	0,599355
<b>190 V</b>	Vindišar	1,803679	2,329564	1,478655
<b>191 V</b>	Vindišar	2,146325	0,261876	5,417259
<b>302 V</b>	Vindišar	4,112654	2,060979	3,462778

<b>303 V</b>	Vindišar	0,561497	0,709945	1,295711
<b>304 V</b>	Vindišar	1,291907	0,599257	0,530218
<b>306 V</b>	Vindišar	1,124648	0,673684	1,688364
<b>313 V</b>	Vindišar	0,580876	0,381559	1,04304
<b>315 V</b>	Vindišar	0,943354	0,402192	1,337557
<b>317 V</b>	Vindišar	0,699707	0,376753	1,389921
<b>318 V</b>	Vindišar	6,175308	5,303233	25,29105
<b>319 V</b>	Vindišar	0,936453	0,778359	2,549242
<b>323 V</b>	Vindišar	0,579218	0,386856	0,792388
<b>325 V</b>	Vindišar	2,680589	1,060162	5,128374
<b>335 V</b>	Vindišar	1,401496	0,687206	2,963698
<b>336 V</b>	Vindišar	1,05608	0,357778	1,209737
<b>339 V</b>	Vindišar	0,745589	0,510499	1,84332
<b>340 V</b>	Vindišar	0,544198	0,504584	1,187526
<b>VR1</b>	Vindišar	1,446797	0,770902	2,552409
<b>VR6</b>	Vindišar	0,897925	0,747949	/