

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

# **MAGISTRSKA NALOGA**

**MOJCA ŠMELCER**

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAGISTRSKA NALOGA

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV V GENU ZA  
RECEPTOR VITAMINA D Z RAZVOJEM  
OSTEOPOROZE**

**THE CORRELATION OF POLYMORFISMS OF  
VITAMIN D RECEPTOR GEN WITH OSTEOPOROSIS  
PROGRESS**

MOJCA ŠMELCER

Ljubljana 2009

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. Meritve mineralne kostne gostote so izvedli na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Kliničnega centra v Ljubljani.

Mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., se zahvaljujem za strokovne nasvete pri laboratorijskem delu in pisanju magistrske naloge. Zahvala tudi dr. Simoni Mencej, mag. farm., za praktične in strokovne nasvete pri delu v laboratoriju in svetovanju pri statistični obdelavi podatkov ter Zoranu Troštu mag. farm., Majdi Osredkar, dipl.inž.lab.med., in Manji Cedilnik, dipl.inž.lab.med., za strokovno pomoč v laboratoriju.

Možu Matjažu, sinu Žigu in hčerki Katji se zahvaljujem za razumevanje in strpnost v času študija. Očetu Pavletu in mami Rozaliji se zahvaljujem za pomoč pri usklajevanju študija in aktivnosti v družini.

Iskrena zahvala vsem, ki ste mi svetovali in pomagali pri znanstveno raziskovalnem delu.

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc.

Mojca Šmelcer

Ljubljana, 2009

**VSEBINA**

<b>POVZETEK</b> .....	<b>iv</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. KOSTI</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Klasifikacija kosti .....	1
1.1.2. Kemijska sestava kosti .....	2
1.1.3. Fiziološka remodelacija kosti .....	2
1.1.4. Dejavniki, ki vplivajo na kostno remodelacijo .....	5
<b>1.2. OSTEOPOROZA</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. Prevalenca .....	7
1.2.2. Vrste osteoporoze .....	7
1.2.3. Dejavniki tveganja za razvoj osteoporoze .....	7
1.2.4. Diagnostika in spremljanje zdravljenja osteoporoze .....	11
1.2.4.1. Merjenje mineralne kostne gostote .....	11
1.2.4.2. Biokemični kazalci .....	12
1.2.4.2.1. Biokemični kazalci izgradnje kostnega tkiva.....	12
1.2.4.2.2. Biokemični kazalci razgradnje kostnega tkiva.....	13
1.2.4.2.3. Vpliv različnih faktorjev na biokemijske kazalce .....	16
<b>1.3. GENETIKA OSTEOPOROZE</b> .....	<b>18</b>
1.3.1. Iskanje kandidatnih genov povezanih z osteoporozo .....	18
1.3.2. Vitamin D .....	19
1.3.3. Receptor vitamina D .....	21
1.3.4. Gen za receptor vitamina D .....	22
1.3.5. Polimorfizmi na genu za receptor vitamina D .....	23
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>25</b>
<b>3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE DELA</b> .....	<b>26</b>
3.1. Opis preiskovancev .....	26
3.2. Merjenje biokemijskih kazalcev .....	26
3.3. Merjenje mineralne kostne gostote .....	26
3.4. Izolacija DNA .....	27
3.5. Verižna reakcija s polimerazo.....	27
3.5.1. Reakcija verižnega pomnoževanja odseka 1-e v promotorju gena VDR .....	28
3.5.2. Ocenjevanje uspešnosti reakcije PCR z elektroforezo na agaroznem gelu.....	30
3.5.3. Hkratna reakcija verižnega pomnoževanja odsekov eksona 2 in introna 8 gena VDR .....	31
3.6. Analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih odsekov DNA .....	34
3.6.1. HpyCH4III – RFLP analiza za genotipizacijo polimorfizma Cdx 2.....	34
3.6.2. Fok I - RFLP analiza za genotipizacijo polimorfizma Fok I .....	36
3.6.3. Bsm I - RFLP analiza za genotipizacijo polimorfizma Bsm I .....	38
3.7. Statistična analiza .....	39
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>40</b>
4.1. Optimizacija reakcij .....	40
4.1.1. Optimizacija reakcije verižnega pomnoževanja odseka 1-e gena na promotorju VDR .....	40
4.1.2. Optimizacija reakcije genotipizacije za ugotavljanje dolžin restrikcijskih	

	fragmentov cdx 2 polimorfizmov.....	42
4.1.3.	Optimizacija HYP CH4 III – RFLP analize.....	44
4.1.4.	Optimizacija hkratnega pomnoževanja eksona 2 in introna 8 gena VDR .....	44
4.1.5.	Optimizacija Fok I - RFLP analize .....	45
4.1.6.	Optimizacija reakcije za ugotavljanje polimorfizmov Bsm I dolžin restriksijskih odsekov.....	47
4.2.1.	Genotipske frekvence polimorfizmov Fok I, Bsm I in Cdx 2 .....	49
4.2.2.	Ocena vpliva proučevanih genetskih sprememb na razvoj osteoporoze .....	52
4.2.2.1.	Ocena kliničnega pomena polimorfizma Bsm I .....	53
4.2.2.2.	Ocena kliničnega pomena polimorfizma Fok I .....	55
4.2.2.3.	Ocena kliničnega pomena polimorfizma Cdx 2 .....	57
4.2.3.	Ocena vpliva proučevanih genetskih sprememb na biokemijske kazalce .....	63
4.2.3.1.	Povezanost polimorfizmov VDR z biokemijskimi kazalci tvorbe kosti .....	63
4.2.3.2.	Povezanost polimorfizmov VDR z biokemijskimi kazalci razgradnje kosti .....	64
4.3.1.	Razširjenost haplotipov polimorfizmov gena VDR v slovenski populaciji .....	66
4.3.2.	Ocena skupnih vplivov haplotipov polimorfizmov gena VDR na BMD .....	67
	<b>SKLEP .....</b>	<b>77</b>
	<b>LITERATURA .....</b>	<b>79</b>

## POVZETEK

Osteoporozo je eden od vodilnih zdravstvenih in socialnoekonomskih problemov 21. stoletja. Izraža se z značilno znižano mineralno gostoto kosti (BMD), spremenjeno mikrostrukturo kosti in povečano lomljivostjo kosti. Zlom zaradi osteoporoze doživi skoraj 40 odstotkov žensk med petdesetim in osemdesetim letom starosti, kar tretjina pa ostane odvisna od tuje pomoči. Strokovnjaki predvidevajo, da naj bi se število zlomov do leta 2050 povečalo na 6,3 milijona zaradi podaljševanja življenjske dobe ljudi in večjega števila starostnikov.

Študije na dvojčkih in družinah obolelih z osteoporozo so potrdile, da imajo geni pomemben vpliv na razvoj osteoporoze, ki jo uvrščamo med poligenske in večfaktorske bolezni, ker sodeluje mnogo genov z majhnimi učinki in vplivi okolja. Odkritih je bilo približno 40 kandidatnih genov, katerih raziskave so potrdile povezanost z osteoporozo in vključujejo tudi gen za receptor vitamina D (VDR).

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti povezanost razvoja osteoporoze s tremi najpomembnejšimi polimorfizmi v genu za VDR: *BsmI*- polimorfizem (E8-G+284A, rs 1544410), *FokI*- polimorfizem (E2-C4T, rs 10735810) in *Cdx2*-polimorfizem (1e-G-1739A, rs 11568820).

V raziskavo smo vključili 625 preiskovank in preiskovancev, ki smo jih razdelili v štiri skupine: 57 preiskovank v premenopavzi, 230 bolnic s pomenopavzno osteoporozo, 221 zdravih preiskovank v pomenopavzi in 117 moških preiskovancev.

Fenotip obolelosti za osteoporozo smo ocenjevali na osnovi izmerjene mineralne kostne gostote (BMD) z dvo- rentgensko absorpciometrijo (DEXA), na treh predelih skeleta: na vratu stegenice, kolku in ledvenih vretencih. Biokemijske kazalce tvorbe kosti: kostna specifična alkalna fosfataza (BALP), osteokalcin (OC) in biokemijske kazalce razgradnje kosti: C-terminalni telopeptid (CTx), katepsin K, smo določili z rutinskimi metodami v diagnostičnih laboratorijih. Za polimorfizma *BsmI* in *FokI* smo DNA preiskovancev analizirali z reakcijo verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR) in analizirali polimorfizma glede na dolžine restrikcijskih fragmentov (RFLP), po že razviti hkratni metodi genotipizacije za polimorfizem *BsmI* in *FokI*. Za polimorfizem *Cdx2* smo razvili optimalno reakcijo verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR) in optimizirali analizo polimorfizma glede na dolžine restrikcijskih fragmentov (RFLP).

Vsakemu preiskovancu smo določili genotip na treh polimorfnihih mestih ter določili haplotip. Rezultate smo analizirali s statističnimi testi: Kolmogorov – Smirnov, Levenejev test, ANOVA, ANCOVA, Kruskal – Wallis in test  $\chi^2$ .

Ugotovili smo frekvence genotipov polimorfizmov *Bsm I*, *Fok I* in *Cdx 2* v slovenski populaciji: *BB:Bb:bb*=0,16:0,46:0,38; *FF:Ff:ff*=0,39:0,45:0,15 in *GG:GA:AA*=0,70:0,26:0,04. Moški imajo statistično značilno razliko razširjenosti genotipov polimorfizma *Bsm I* glede na ženske v preiskovani skupini Slovenk in Slovencev. Razširjenost genotipov polimorfizma *Fok I* je značilno različna med zdravimi in osteoporoznimi ženskami v pomenopavzi. Zastopanost genotipa *FF* in *BB* je večja med zdravimi glede na ženske v pomenopavzi, ki so obolele z osteoporozo.

Polimorfizem *Fok I* je značilno povezan z BMD-ls ( $p=0,036$ ) in BMD-fn ( $p=0,040$ ) pri slovenski populaciji moških, pri ženskah pa povezanosti nismo dokazali.

Polimorfizem *Bsm I* ne vpliva na BMD na področju ledvenih vretenc, kolka in medenice v slovenski populaciji, zato verjetno ne vpliva na razvoj osteoporoze.

Polimorfizem *Cdx 2* je samo v premenopavznem obdobju pri ženskah značilno povezan z BMD-tot in BMD-fn.

Polimorfizmi *Bsm I*, *Fok I* in *Cdx 2* gena VDR posamezno ne vplivajo na biokemične kazalce izgradnje kosti, prav tako ne na biokemijske kazalce razgradnje kosti, zato genetski vpliv VDR na kostno remodelacijo verjetno ni klinično pomemben.

Najpogostejši haplotipi in njihove frekvence za polimorfizme Bsm I, Fok I in Cdx 2 v slovenski populaciji so: bFG : bfG : BFG : BfG : bFA : BFA = 0,326 : 0,194 : 0,183 : 0,129 : 0,061 : 0,052.

V slovenski populaciji se haplotip bFG bistveno pogosteje pojavlja, kot haplotipi bfG, BFG, BfG, bFA in BFA, glede na proučevane polimorfizme gena VDR.

Haplotip BFA je povezan z BMD-fn, haplotipa bfG, in bFG, pa s koncentracijo osteokalcina. Zaključimo lahko, da so haplotipi BFA, bfG in bFG verjetno povezani z razvojem osteoporoze v slovenski populaciji in bi jih lahko uporabili kot genetične kazalce dedne nagnjenosti k osteoporozi. Pomagali bi pri uvedbi zgodnje preventive in tako pripomogli k zmanjšanju obolevnosti za osteoporozo.

Naše raziskave, podpirajo študije, ki so potrdile povezanost gena VDR z BMD in biokemijskimi kazalci ter vpliv na razvoj osteoporoze. Zato lahko zaključimo, da je gen za receptor VDR povezan z razvojem osteoporoze pri slovenski populaciji žensk in moških, vendar ne daje enoznačnega odgovora. Z našo raziskavo potrjujemo študije, ki utemeljujejo, da je osteoporoza poligenska in večfaktorska bolezen. V nadaljnjem raziskovanju bolezni osteoporoze bodo nujne raziskave na mnogih populacijah, s katerimi bi lahko povezali najpomembnejše dejavnike razvoja osteoporoze in razumeli korelacije okolje-fenotip-genotip.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ALP	Alkalna fosfataza	
APOE	Apolipoprotein e	
BCE	Ekvivalent kolagena v kosti	(angl. Bone Collagen Equivalent)
BALP	Kostna alkalna fosfataza	(angl. Bone alkaline phosphatase)
BMD	Gostota kostne mase	(angl. Bone mineral density)
BSP	Kostni sialoproteini	(angl. Bone sialoprotein)
COLIA1	Tip 1 kolagena alfa 1	(angl. Type I collagen alpha 1)
CT	Kalcitonin	
CTX	C terminalni telozeptid kolagena tipa I	
DPD	Deoksipiridinolin	
ECLIA	Elektro kemiluminiscenčna imunska analiza	(angl. Electrochemiluminescence Immunoassay)
EGF	Epidermalni rastni faktor	
ER $\alpha$ .	Estrogenski receptor alfa	
ELISA	Encimsko imunski test	(angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ET-Br	Etidijev bromid	
GH	Rastni hormon	(angl. Growth hormone)
HCl	Klorovodikova kislina	
IGF-1	Insulinu podoben rastni faktor -1	(angl. Insulin-like growth factor 1)
IL-1	Interlevkin ena	
LD	Vezavno nesorazmerje	(angl. Linkage disequilibrium)
M-CSF	Makrofagne kolonije spodbujajoči faktor	
NTX	N terminalni telozeptid kolagena tipa I	
OPG	Osteoprotegerin	
PICP	C terminalni propeptid prokolagen tip I	(angl. C terminal propeptide type I procollagen)
PINP	N terminalni propeptid prokolagen tip I	(angl. N terminal propeptide type I procollagen )
PTH	Paratiroidni hormon	
PTHr1	Receptor paratiroidnega hormona 1	
PYD	Piridinolin	
QTL	Quantitative trait loci	
RANKL	Receptor aktivacije nuklealnega faktorja NK- $\kappa$ B ligand	
RXR	Retinoidni X receptor	
SD	Standardna deviacija	
S-OC	Osteokalcin v serumu	
TGF- $\beta$	Transformirajoči rastni faktor $\beta$	(angl. Transforming growth factor $\beta$ )
TNF $\alpha$	Dejavnik timorske nekroze alfa	(angl. Tumor necrosis factor alfa )
TRAP	Tartrat odporna kislina fosfataza	(angl. Tartrate-resistant acid phosphatase)
ucOC	Premalo karboksiliran osteokalcin	
U-DPD	Deoksipiridinolin v urinu	
U-NTX	N terminalni telozeptid kolagena tipa I v urinu	
U-PYD	Piridinolin v urinu	
VDR	Vitamin D receptor	
VEGF	Žilni endotelijski rastni dejavnik	(angl. Vascular endothelial growth factor)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija	(angl. World Health Organisation)
1,25(OH) $_2$ D $_3$	1,25 dihidroksi vitamina D $_3$	



## SEZNAM SLIK

- Slika 1 Zdravo in osteoporozno tkivo ter zdrava in osteoporozna vretenca
- Slika 2 Shematski prikaz extracelularnega matriksa kosti
- Slika 3 Shematski prikaz remodelacije kosti
- Slika 4 Spreminjanje BMD glede na spol in starost
- Slika 5 BMD-ls in BMD-fn pri beli in črni rasi
- Slika 6 Presnova vitamina D
- Slika 7 Sinteza  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D3 in potek molekulskega mehanizma
- Slika 8 Genomska struktura hVDR gena
- Slika 9 Pozicije polimorfizmov gena za VDR
- Slika 10 Shematični prikaz verižne reakcije s polimerazo
- Slika 11 Odsek dolžine 632 bp na promotorju 1-e gena za VDR
- Slika 12 Mesta, kjer encim HpyCH4III cepi odsek dolžine 632 bp na 1-e promotorju gena VDR
- Slika 13 Mesta, kjer encim Fok I cepi odsek dolžine 266 bp na eksonu 2 gena VDR
- Slika 14 Mesta, kjer encim Bsm I cepi odsek dolžine 461 bp na intronu 8 gena VDR
- Slika 15 Ocena produktov prve faze optimizacije reakcije PCR odseka 1-e na promotorju gena VDR
- Slika 16 Ocena produktov reakcije PCR pri temperaturi prileganja 53 °C in 40. ciklih
- Slika 17 Ocena produktov reakcije PCR pri temperaturi prileganja 54 °C in času prileganja 20 s
- Slika 18 Ocena produktov reakcije PCR pri optimalnih pogojih za pomnoževanje odseka 1-e na promotorju gena VDR
- Slika 19 Ocena produktov reakcije RFLP z različno koncentracijo encima HYP CH4 III v prvi fazi optimizacije reakcije
- Slika 20 Ocena uspešnosti reakcije RFLP ob prisotnosti 0,4  $\mu\text{L}$  encima HYP CH4 III in 6,0  $\mu\text{L}$  produkta PCR v reakcijski zmesi
- Slika 21 Ocena uspešnosti reakcije RFLP pri koncentraciji encima HYP CH4 III 0,4  $\mu\text{L}$  in 6,0  $\mu\text{L}$  produkta PCR v reakcijski zmesi
- Slika 22 Sekundarna reakcija PCR pomnoževanja eksona 2 in introna 8 gena VDR
- Slika 23 Reakcija PCR z 0,5  $\mu\text{L}$  nerazredčene DNA v reakcijski zmesi
- Slika 24 Produkti elektroforeze Fok I- RFLP analize pri pogojih iz literature
- Slika 25 Elektroforeza restrikcijskih odsekov Fok I – RFLP analize, pri kateri je bilo 5  $\mu\text{L}$  PCR produkta
- Slika 26 Ocena produktov elektroforeze Bsm I – RFLP analize v prvi fazi optimizacije
- Slika 27 Ocena restrikcijskih odsekov Bsm I – analize, pri kateri je bilo 5  $\mu\text{L}$  PCR produkta, 0,4  $\mu\text{L}$  encima Bsm I in 3,6  $\mu\text{L}$  vode z uporabo barvila Ksilencianol
- Slika 28 Ocena produktov restrikcije Bsm I – RFLP analize z uporabo barvila Bromfenolmodro.
- Slika 39 Zastopanost najpogostejših haplotipov Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR v slovenski populaciji.

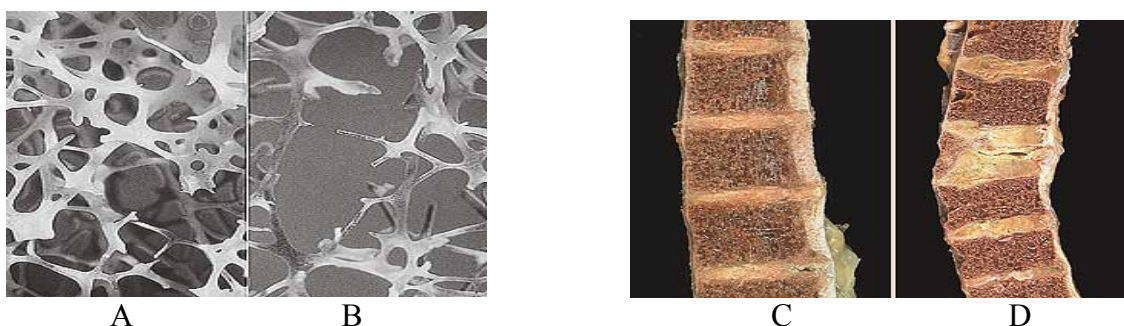
## SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I	Vpliv lokalnih in sistemskih dejavnikov na kostno remodelacijo
Preglednica II	Klasifikacija osteoporoze glede na T vrednosti
Preglednica III	Referenčne vrednosti BALP v serumu
Preglednica IV	Referenčne vrednosti OC v serumu
Preglednica V	Referenčne vrednosti CTx v serumu
Preglednica VI	Referenčne vrednosti NTx v urinu
Preglednica VII	Sestava reakcijske zmesi za pripravo delovne raztopine za pomnoževanje odseka 1-e na promotorju gena VDR.
Preglednica VIII	Optimalni pogoji v cikličnem termostatu za pomnoževanje odseka 1-e na promotorju gena VDR
Preglednica IX	Pogoji, sestavine in količine za pripravo 2 % agaroznega gela za oceno PCR
Preglednica X	Sestava reakcijske zmesi za pripravo delovne raztopine za pomnoževanje odsekov eksona 2 in introna 8 gena VDR
Preglednica XI	Pogoji za pomnoževanje odsekov eksona 2 in introna 8 gena VDR
Preglednica XII	Priprava restrikcijske zmesi encima HpyCH4III za analizo RFLP
Preglednica XIII	Pogoji, sestavine in količine za pripravo 4 % agaroznega gela za oceno produktov RFLP
Preglednica XIV	Priprava restrikcijske zmesi encima Fok I za analizo RFLP
Preglednica XV	Priprava restrikcijske zmesi encima Bsm I za RFLP analizo
Preglednica XVI	Pogoji na začetku optimizacije reakcije PCR, v cikličnem termostatu za pomnoževanje odseka 1-e na promotorju gena VDR
Preglednica XVII	Sestava reakcijske zmesi za analizo RFLP z različno koncentracijo encima HYP CH4 III v prvi fazi optimizacije reakcije
Preglednica XVIII	Reakcijska zmes za Fok I – RFLP analizo v prvi fazi optimizacije Fok I-RFLP analize
Preglednica XIX	Reakcijska zmes za Bsm I – RFLP analizo v prvi fazi optimizacije
Preglednica XX	Frekvence genotipov in test $\chi^2$ za polimorfizme Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR, glede na starostno obdobje in spol
Preglednica XXI	Rezultati $\chi^2$ testa za primerjavo genskih frekvenc med zdravimi in osteoporoznimi ženskami v pomenopavzi
Preglednica XXII	Rezultati $\chi^2$ testa za primerjavo genskih frekvenc žensk in moških
Preglednica XXIII	Povprečne vrednosti BMD za polimorfizme: Bsm I, Fok I, Cdx 2 ter vrednosti biokemijskih kazalcev: sBALP, OC, CTx in Katepsin K za preiskovano skupino v premenopavzi
Preglednica XXIV	Povprečne vrednosti BMD za polimorfizme: Bsm I, Fok I, Cdx 2 ter vrednosti biokemijskih kazalcev: sBALP, OC, CTx in Katepsin K za preiskovano skupino zdravih v pomenopavzi
Preglednica XXV	Povprečne vrednosti BMD za polimorfizme: Bsm I, Fok I, Cdx 2 ter vrednosti biokemijskih kazalcev: sBALP, OC, CTx in Katepsin K za preiskovano skupino bolnih v pomenopavzi
Preglednica XXVI	Povprečne vrednosti BMD za polimorfizme: Bsm I, Fok I, Cdx 2 ter vrednosti biokemijskih kazalcev: OC in CTx, za preiskovano skupino moških
Preglednica XXVII	Najpogostejši haplotipi polimorfizmov Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR, ki so zastopani v slovenski populaciji

Preglednica XXVIII	Povezanost haplotipa BFA z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije
Preglednica XXIX	Povezanost haplotipa bFA z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije
Preglednica XXX	Povezanost haplotipa BfG z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije
Preglednica XXXI	Povezanost haplotipa BFG z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije
Preglednica XXXII	Povezanost haplotipa bfG z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije
Preglednica XXXIII	Povezanost haplotipa bFG z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije
Preglednica XXXIV	Pregled polimorfizmov Bsm I, Fok I in Cdx 2 in haplotipov BFA, bFA, BfG, BFG, bfG in bFG gena VDR v posameznih preiskovanih skupinah glede na BMD in biokemijske kazalce.

# 1. UVOD

Osteoporozoza je ena od vodilnih zdravstvenih in socialnoekonomskih problemov 21. stoletja<sup>1</sup> in je vzrok za mnoge bolezni in prezgodnje smrtosti, tako pri ženskah, kot pri moških povsod po svetu<sup>2</sup>. Izraža se z značilno znižano mineralno gostoto kosti (BMD), spremenjeno mikrostrukturo kosti (slika 1-A,B) in povečano verjetnostjo za zlome<sup>3</sup>. (slika 1-C,D) Zlom zaradi osteoporozne doživi skoraj 40 odstotkov žensk med petdesetim in osemdesetim letom, kar tretjina tistih, ki si zlomijo kolk, pa ostane odvisna od tuje pomoči. Samo v ZDA in Evropi osteoporozoza povzroči približno 2,3 milijona zlomov na leto, s tem povezani stroški pa so ocenjeni na približno 23 milijard dolarjev. Strokovnjaki predvidevajo, da naj bi se število zlomov do leta 2050 povečalo na 6,3 milijona,<sup>4</sup> zaradi podaljševanja življenjske dobe ljudi in večjega števila starostnikov.



*Slika 1: Zdravo in osteoporozno tkivo ter zdrava in osteoporozna vretenca<sup>4</sup>  
 A - zdravo kostno tkivo, B - pomanjkanje kalcija pospešuje izgubo kostne gostote,  
 C - zdrava vretenca, D - vretenca z osteoporoznim zlomom*

V Evropi se zaradi osteoporozne vsakih 30 sekund zlomi ena kost. Do 80. leta starosti si zaradi neprepoznane in nezdravljene osteoporozne kost zlomi vsaka tretja ženska in vsak peti moški.

## 1.1. KOSTI

### 1.1.1. KLASIFIKACIJA KOSTI

#### Po obliki:

- Dolge,
- Kratke,
- Ploščate
- Nepravilnih oblik.

#### Po tipu tkiva:

- Kompaktna ali kortikalna kostnina, je trd zunanji del kostnega tkiva, v njem se kopičijo kalcij, fosfati in kolagen tipa 1, ki se koncentrično razporejajo okoli Haversovih kanalov skozi katere potekajo krvne in limfne žile, ter živci. Kortikalno kostno tkivo predstavlja 80 % volumna in le 30 % površine kosti. Večina presnovnih procesov v kosti se vrši na njeni površini.
- Spongiozna ali trabekularna kostnina sestavlja mineralnega mrežja krhkih kostnih trabekul in predstavlja večinski delež površine kosti.

### 1.1.2. KEMIJSKA SESTAVA KOSTI

**Organski matriks (35 %)**, daje kosti strukturo, prožnost in jo varuje pred deformacijo.

- Organske snovi:

Kolagenska vlakna (90 %), (večinoma kolagen I, prisotni tudi V, VI, VII)

Osnovna substanca (10 %) vsebuje: glikoprotein, osteokalcin in fosfoprotein osteonektin.

- Celice:

**Osteociti** predstavljajo 90 % vseh kostnih celic, nastanejo iz osteoblastov, ko jih v celoti obda matriks. Z dolgimi citoplazemskimi izrastki se povezujejo in zapolnjujejo lakune, ki se s koščnimi lamelami koncentrično razporejajo okoli Haversovih kanalov. Imajo pomembno vlogo pri izmenjavi snovi med kostno tekočino in žilami. Njihovo delovanje povezujejo z občutljivostjo na mehanske spremembe in koordinacijo resorpcije in izgradnje kosti.

**Osteoblasti** nastajajo iz mezenhimalnih matičnih celic, proizvajajo večino organskega matriksa. Glede na stopnjo razvoja lahko postanejo aktivni osteoblasti, popolnoma obdani z matriksom postanejo osteociti ali postanejo neaktivni in tvorijo osteoprogenične celice. Vsebujejo receptorje za PTH in vitamin D in so odgovorni za kostno izgradnjo.

**Osteoklasti** so velike, mnogo jedrne celice, nastajajo iz hematopoetičnih matičnih celic. Imajo veliko celično površino, ki omogoča aktivno izmenjavo med intra- in ekstracelularnim prostorom. Izražajo tartrat rezistentno kislino fosfatazo (TRAP) in katepsin K. Po kostni površini se dobro gibljejo in so odgovorni za resorpcijo kosti.

**Osteoprogenične celice** nastajajo iz mezenhimalnih matičnih celic. So tanke dolge celice, ki pokrivajo večino kostne površine odraslega skeleta. S citoplazmatskimi izrastki se povezujejo med seboj in z osteociti. Njihova vloga še ni dorečena, povezujejo jih z izločanjem encimov, ki odstranjujejo osteoid, definirajo kot prekurzorje osteoblastov, povezujejo s kristalizacijo ali jim pripisujejo vlogo pri barieri med kostjo in ekstracelularno tekočino.

- Osteoid sestavlja mineraliziran organski matriks prepleten s proteinskimi vlakni kolagena.

**Anorganska mineralna komponenta (65 %)**, daje kosti trdoto, moč, trdnost, stanovitnost, odpornost proti sili pritiska in natega. Kopiči kalcij, fosfor, magnezij, baker in minerale soli, predvsem soli kalcija in fosforja<sup>27</sup>.

### 1.1.3. FIZIOLOŠKA REMODELACIJA KOSTI

Skelet je kompleksen in dinamičen organ in ima številne naloge (varuje mehka tkiva, kopiči soli kalcija in fosfatov, je krvotvorni organ, daje oporo, omogoča gibanje). V razvoju človeka se kontinuirano spreminja, tako, da se stara kostnina odstranjuje in nova izgrajuje. Ta proces je dinamičen in dolgotrajen in ga imenujemo proces kostne remodelacije v katerem so osteoblasti odgovorni za gradnjo kostnine, osteoklasti pa za razgradnjo.

Izgradnja in razgradnja kosti sta v ravnovesju in ohranjata čvrstost in integriteto kostnine, ker so ohranjeni vsi mehanizmi samokontrole, lastnega popravljanja in sposobnosti adaptacije na stres. V enem letu se obnovi približno 10 % celotnega skeleta. Ciklus ima šest faz in traja približno štiri mesece.

#### • AKTIVACIJA OSTEOKLASTOV

Mezenhimske stromalne celice, osteoblasti ali njihovi prekurzorji izločajo makrofagne kolonije spodbujajoči faktor (M-CSF), ki se veže na c-Fms prekurzorje osteoklastov, kar omogoča njihovo preživetje, diferenciacijo in proliferacijo. Potrebna je prisotnost citokinov: interlevkin 1 (IL-1) in 6 (IL-6) in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ). Celice osteoblastov imajo na površini ligand RANK, ki se veže na receptor RANK, ki je na

površini osteoklastnih prekurzorjev, tako pride do aktivacije NF- $\kappa$ B transkripcijskega faktorja ob prisotnosti  $1,25(\text{OH})_2$  vitamina  $\text{D}_3$ , ki vodi v ekspresijo gena za diferenciacijo osteoklasta in njegovo aktivacijo<sup>28</sup>.

- **RESORPCIJA**

Osteoklasti se preko točkastih stikov-podozomov, ki jih tvorijo aktin in drugi citoskeletni proteini: vinkulin, talin in  $\alpha$  aktinin, ki povežejo transmembranske proteine integrine z aktinskimi filamenti, povežejo s kostnim mineraliziranim matriksom. Začne se demineralizacija, ki poteka ob prisotnosti klorovodikove kisline (HCl), ki nastaja zaradi delovanja vodikove protonske črpalke in klorovih ionskih kanalov, ter ionskih transportnih dogajanj v osteoklastih. To zniža v resorptivni mikrosredini pH na 4,5 in vodi do razgradnje kostnih mineralov. Sproščanje lizosomskih proteaz, predvsem katepsina K, vodi v razgradnjo kolagena. Sproščajo se tudi katepsin B in L, ter metaloproteaze, katerih vloga ni popolnoma jasna. Produkta razgradnje:  $\text{Ca}^{++}$ , fosfati,  $\text{Mg}^{++}$ , pyridolin, pyridin, N-telopeptidi kolagena, hidroksiprolin in hidroksilizin se izločajo v ekstracelularno tekočino, ki jih osteoklasti s transcitozo odstranijo. Osteociti izločajo osteoprotegerin (OPG), ki prepreči interakcijo med RANKL in RANK in zavira delovanje osteoklastov. Po prenehanju resorpcije, se osteoklasti odcepijo od kosti in se premestijo na novo mesto, kjer se prične nov ciklus resorpcije ali umrejo v procesu celične programirane smrti ali apoptoze<sup>53</sup>. Hormoni ščitnice ( tyroksin in trijodotironin) in estrogeni stimulirajo aktivnost osteoklastov in pospešujejo razgradnjo kosti. Njihovo aktivnost nakazuje tudi tartrat odporna kislj fosfataza (TRAP). Prostaglandini inhibirajo osteoklaste, hkrati pa vplivajo na njihovo večjo tvorbo in proliferacijo<sup>27</sup>. IL-1 in TNF zavirajo apoptozo osteoklastov (pospešujejo pri osteoblastih) in skupaj z TGF- $\beta$  vplivajo na sintezo prostaglandinov, ki sprožijo resorpcijo kosti<sup>28</sup>.

- **PREOBRAT**

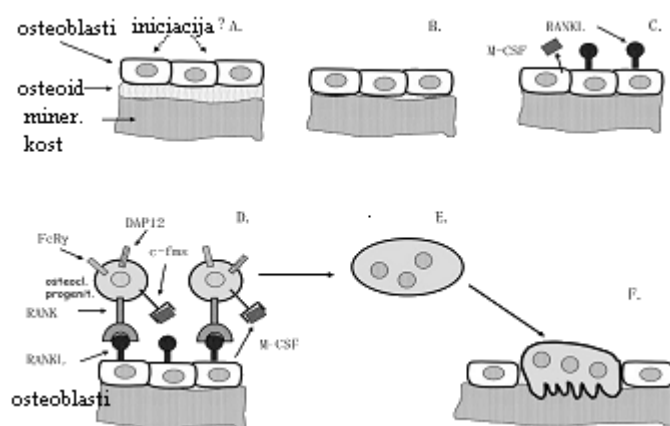
Predpostavljajo, da visoka koncentracija kalcijevih ionov v bližini resorptivne površine osteoklasta deluje na specifične receptorje, ki ustavijo proces resorpcije in povzročijo odcep s površine. Estrogeni in bifosfonati delujejo inhibitorno, tako, da sprožijo proces apoptoze osteoklastov. Deaktivacijo osteoklastov vzpodbudi tudi vezava kalcitonina, ki ga izločajo parafolikularne celice ščitnice. Mononuklearne celice se razvijejo v makrofage, ki očistijo dno lakune in ga prekrijejo s cementom.<sup>28,147</sup>

- **AKTIVIRANJE OSTEOLASTOV**

Kostni ekstracelularni matriks izloča insulinu podoben rastni faktor -1 ( IGF-I) in transformirajoči rastni faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ki prispevata k okrejitvi in aktivaciji osteoblastov v lakuni.<sup>27,147</sup>

- **NASTAJANJE OSTEIDA**

Osteoblasti sintetizirajo predvsem kolagen tipa I. Prokolagen, ki je sestavljen iz dveh  $\alpha 1$  in ene  $\alpha 2$  polipeptidnih verig, ki vsebujejo hidroksilirane proline in lizine izločajo osteoblasti. Cepijo se C-terminalne regije, katerih propeptidi se izločijo tudi v ekstracelularno tekočino in N- terminalne regije, ki se vgradijo v kost in tvorijo trojni heliks kolagena tipa I. Strukturo kolagena tipa I stabilizirajo tri molekule kolagena: piridinolin, ki se nahaja v kolagenu tkiv zunaj kosti in DPD, ki se nahaja v kosti, dentinu, skeletnih mišicah in aorti. Nehelikalne enote kolagena tipa I na C- in N- koncih se imenujejo N-telopeptid (NTX) in C-telopeptid (CTX). Prepletanje vlaken tvori stabilno strukturo in trdnost. Osteoidni matriks tvorijo tudi osteopontin, osteonektin in osteokalcin, ki so produkti osteoblastov.<sup>27,147</sup>



Slika 2: Shematski prikaz ekstraselularnega matriksa kosti

Mineralizirani ekstraselularni matriks v kosti je prekrit z nemineraliziranim ekstraselularnim matriksom (osteoid), ki ga tvorijo osteoblasti. Osteoblasti tvorijo enocelični sloj, ki prekriva kostno površino. (A)

Inicijacijo resorpcije kosti sprožijo hormoni: citokini ali neznani aktivacijski receptorji prisotni na osteoblastih, ki vodijo v degradacijo osteoida (B) in v povečano izražanje M-CSF in RANKL. (C)

M-CSF aktivira sorodne receptorje c-fms na progenitorskih celicah osteoklastov, kar vodi v proliferacijo in v večje preživetje. Prav tako RANKL aktivira receptor RANK na progenitorskih celicah osteoklastov, kar vodi v diferenciacijo celične linije osteoklastov. (D) Diferenciacijo osteoklastov sproži vezava ligandov na imunoreceptorje FcR in DAP12. (D)

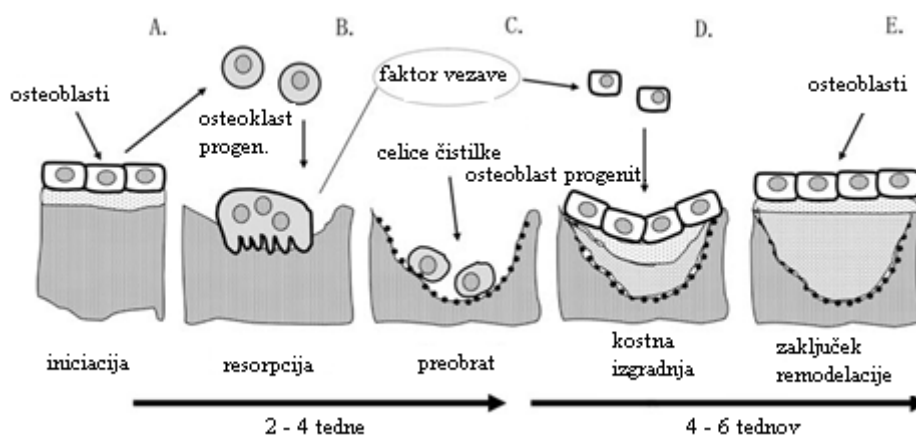
Konec diferenciacije mononuklearnih progenitorskih celic osteoklastov se začne s spojitvijo v prehodni mnogojedrni osteoklast (E), ki postane aktiven osteoklast za resorpcijo kosti. (F) Osteoklasti napadejo mineralizirano kostno površino, ko se osteoblasti pomaknejo iz področja. (F) (Slika 2)<sup>147</sup>

#### • MINERALIZACIJA

Osteoblasti imajo na celični površini receptorje za PTH, ki ga izloča endokrinska žleza obščitnica v odvisnosti od koncentracije  $Ca^{++}$  v plazmi<sup>22</sup>. Vezava PTH na receptor sproži sintezo alkalne fosfataze, s površine osteoblastov se pod vplivom encima glikozilfosfatidilinozitol specifične fosfataze D sprosti alkalna fosfataza, kot topna dimerna in/ali netopna nespremenjena oblika. Alkalna fosfataza katalizira hidrolizo fosfatnih estrov na celični površini osteoblastov in tvori visoko koncentracijo fosfatov potrebnih za mineralizacijo kosti.

Kostni sialoproteini so kisli proteini z visoko afiniteto do hidroksiapatit kristalov in imajo Arg-Gly-Asp področje (RGD), ki delujejo kot ligandi za integrine na celični površini. BSP sintezo sproži  $1,25(OH)_2D_3$ , ki jo regulirana prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) in sodelujejo pri mineralizaciji kosti, tako da se kopičijo v matriksu, kot tudi osteokalcin, osteopontin in osteonektin.<sup>35</sup>

Minerali se vgrajujejo v in med kolagenska vlakna, količina vode in nekolagenskih proteinov upada, razporeditev in količina kolagenskih vlaken ostaja enaka. To potrjuje naraščanje moči in trdnosti kosti. Kvaliteto in kvantiteto izgradnje kosti regulirata osteokalcin in osteonektin, ki ju izločajo osteoblasti.<sup>27,147</sup> (Slika 2)



Slika 3: Shematski prikaz remodelacije kosti

Remodelacija kosti v kostni mnogocelični enoti se začne tako, da osteoblasti aktivirajo diferenciacijo, združitev in aktivacijo osteoklastov. (A,B) Ko nastane resorpcijska lakuna, osteoklasti zapustijo to področje, pojavijo se enojedrne celice, ki očistijo ostanke organskega matriksa in tvorijo cementno površino na dnu lakune. (C) Med resorbcijo združitevni faktorji, IGF-I in TGF, ki so produkt ekstracelularnega matriksa prispevajo k premiku in aktivaciji osteoblastov v resorpcijsko lakuno. (D) Osteoblasti nato zapolnijo lakuno z novo kostnino. Ko je dosežena enaka količina kostnine, kot so jo osteoklasti resorbirali je proces remodelacije zaključen. Mineraliziran ekstracelularni matriks se pokrije z osteoidom in enoceličnim slojem osteoblastov. (E)<sup>31</sup> (Slika 3)

#### 1.1.4. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA KOSTNO REMODELACIJO

Posamezne stopnje remodelacije natančno uravnavajo in nadzorujejo sistemski dejavniki, ki vplivajo na osteoblaste in osteoklaste preko uravnavanja sinteze in delovanja lokalnih dejavnikov in so opisani v preglednici I.<sup>27,28,32,33,34,35,147</sup>

V določenih stanjih izgradnje in razgradnje kosti, pri katerem homeostaza ni vzpostavljena zaradi spremenjenega poteka posameznih faz remodelacije, se pojavijo kostne bolezni razgradnje (osteoporoza) ali kostne bolezni izgradnje (osteopetroza).<sup>32,33</sup>



Preglednica I: Vpliv lokalnih in sistemskih dejavnikov na kostno remodelacijo

	DEJAVNIK	TVORBA KOSTNINE	RESORBCIJA KOSTNINE
SISTEMSKI DEJAVNIKI	Parathormon	pospešuje	pospešuje
	Kalcitriol	pospešuje	Ne vpliva
	Kalcitonin	ne vpliva	zavira
	Estrogeni in androgeni	zavira	zavira
	Vitamin D <sub>3</sub>	pospešuje	pospešuje
	Inzulin	pospešuje	ne vpliva
	Tiroksin	pospešuje	pospešuje
	Glukokortikoidi	zavira	zavira
	Rastni hormon	pospešuje	ne vpliva
LOKALNI DEJAVNIKI	Prostaglandin E <sub>2</sub>	pospešuje	pospešuje
	Interlevkini (IL1-6, IL 11)	/	pospešuje
	Interlevkin 1	zavira	pospešuje
	Faktor tumorske nekroze $\alpha$	/	pospešuje
	Faktor tumorske nekroze $\beta$	/	zavira
	Trombocitni rastni faktor	pospešuje	pospešuje
	Transformirajoči rastni faktor $\beta$	pospešuje	zavira
	Kolonije stimulajoči rastni faktor	/	zavira

## 1.2. OSTEOPOROZA

Leta 1994 je svetovna zdravstvena organizacija (WHO) definirala, da je osteoporozna sistemska skeletna bolezen, pri kateri je T vrednost izmerjene mineralne gostote kosti (BMD) za 2,5 ali več standardnih deviacij (SD) pod povprečno vrednostjo za mlade odrasle osebe, ob sočasni spremembi mikro arhitekture kostnega tkiva in vodi do večje lomljivosti kosti. O normalni BMD govorimo, če je T vrednost BMD znižana za manj kot 1 SD. Če je T vrednost BMD zmanjšana od 2,5 SD do 1 SD pod povprečjem za mlade odrasle, govorimo o osteopeniji. Znižanje BMD za 1 SD pod srednjo vrednost, to je za 10 do 12 odstotkov, poveča verjetnost zlomov merjenega predela 2- do 2,5-krat<sup>6</sup>. (Preglednica II)

Preglednica II: Klasifikacija osteoporoze glede na T vrednosti.

Normalno	BMD $\geq$ - 1,0
Znižana kostna masa (osteopenija)	BMD $>$ - 2,5 in $<$ - 1,0
Osteoporozna	BMD $\leq$ - 2,5
Težka oblika osteoporoze	BMD $\leq$ - 2,5 s prisotnostjo lomljivosti kosti

### 1.2.1. PREVALENCA

Dovzetnost starejših ljudi za večjo pogostnost zlomov kosti je znana že najmanj 200 let. Danes pogostost osteoporoze na Danskem znaša 5 %, v Veliki Britaniji 7,8 % in v ZDA 25 %. V Sloveniji je prevalenca osteoporoze pri ženskah nad 50. letom 27,5 %, pri moških nad 60. letom pa 16,6 %. S starostjo delež osteoporoze narašča. Pri ženskah nad 65 let je delež 40,6 %, pri moških nad 65 let je 16,7 %. Klinična slika osteoporoze je pred pojavom osteoporoznih zlomov neznačilna in neprepoznavna. V Sloveniji prejema terapijo le 21,7 % bolnikov z osteoporozo. Zlomi so pozni zapleti osteoporoze. Vretenca, kolk in zapestje so mesta, kjer so zlomi zaradi osteoporoze najpogostejši. Zdravljenje zlomov zahteva veliko dela in finančnih sredstev v vseh segmentih zdravstvenega varstva in celotne družbe. Zato je osteoporoza tipična bolezen, pri kateri so preventivni ukrepi z vidika stroškov in zapletov bolezni izjemno pomembni. Zato so potrebne raziskave, ki bi razkrile zanesljiv dejavnik zgodnje opredelitve za obolenost z osteoporozo, že veliko pred pojavom zapletov<sup>5</sup>.

### 1.2.2. VRSTE OSTEOPOROZE

#### PRIMARNA OSTEOPOROZA

Pojavi se pri obeh spolih in v vseh starostih. Verjetnost obolenosti pa se s starostjo povečuje. Osteoporoza tipa I ali pomenopavzna osteoporoza se pojavi 15-20 let po nastopu menopavze. Prvi izrazit padec kostnine nastopi v 60. letih in drugi v 70. letih. Zaradi pomanjkanja estrogena, ki pospešuje kostno remodelacijo, se zmanjša trabekularna kostnina. Zmanjšana se produkcija 1,25 dihidroksi vitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), ki povzroči zmanjšano absorpcijo kalcija in hiperparatiroidizem.

Osteoporoza tipa II ali senilna osteoporoza, prizadane moške in ženske po 70. letu starosti in se izraža z izgubo kortikalne in trabekularne kosti. Vzroki za pojav še niso znani<sup>7</sup>.

#### SEKUNDARNA OSTEOPOROZA

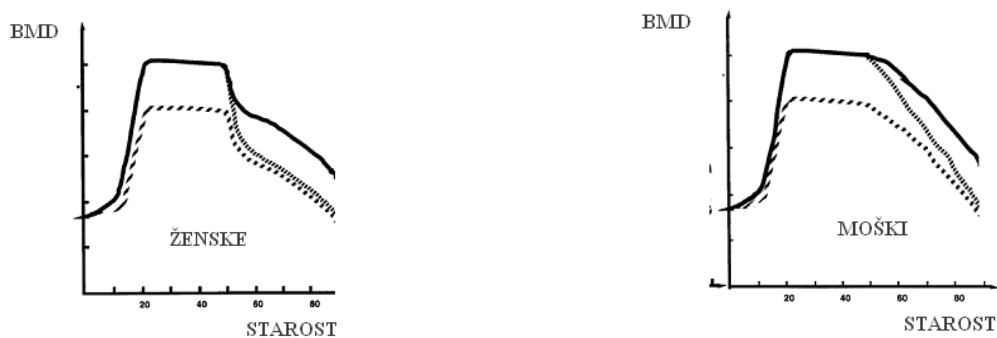
Pojavi se zaradi drugih bolezni, zdravil in drugih dejavnikov okolja, ki vodijo v izgubo kostnine.

### 1.2.3. DEJAVNIKI TVEGANJA ZA RAZVOJ OSTEOPOROZE

Dejavniki tveganja osteoporoze zavirajo gradnjo kostnine v obdobju rasti ali pospešujejo njeno razgradnjo v kasnejšem starostnem obdobju. Vplivajo na vrednost največje dosežene BMD.

- SPOL

Pospešena izguba BMD pri ženskah se začne med 40. in 44. letom, zaradi pomanjkanja estrogenov in doseže višek zniževanja med 50. in 54. letom, nato se stabilizira.. Pri moških nastopi padec BMD med 25. in 39. letom starosti, torej prej kot pri ženskah. Drugo obdobje pospešenega zniževanja BMD je po 70. letu starosti pri ženskah in po 65 letu pri moških<sup>8</sup>.



Slika 4: Spreminjanje BMD glede na spol in starost

Iz slike 4 je razvidno, da se pri ženskah in moških BMD spreminja s starostjo. V zgodnji odraslosti doseže BMD najvišjo vrednost tako pri ženskah, kot pri moških (polna črta). Pri ženskah se pojavi večja izguba s starostjo in nastopom menopavze. Nizka vrednost BMD v starejšem obdobju je lahko posledica nizke vrednosti najvišje dosežene BMD v mladosti (črtkana črta) ali zaradi povečane izgube kostnine, ki je posledica staranja (črta s pikami). Oba vzroka lahko pri posameznikih sovpadata, tako pri moških, kot pri ženskah.<sup>75</sup>

- STAROST

Je vodilni dejavnik znižane BMD. Kritično nizka BMD v starosti je pogojena z največjo BMD, ki jo dosežemo med 25. in 30. letom starosti. Vrednost BMD je nato relativno stabilna do 45-55 leta, oziroma do nastopa menopavze pri ženskah. Nato začne vrednost BMD padati pri obeh spolih. Ženske dosežejo nižjo največjo BMD kot moški. S starostjo se zmanjša tvorba nove kosti tako pri ženskah kot pri moških, verjetno zaradi krajše življenjske dobe osteoblastov in daljše življenjske dobe osteoklastov, nenormalnega signaliziranja osteocit in psiholoških dejavnikov. Pomanjkanje estrogena v pomenopavznem obdobju je tipični negenetski dejavnik v etiologiji osteoporoze. S starostjo upada tudi intenziteta absorpcije kalcija v duodenumu.<sup>8</sup>

- NAČIN ŽIVLJENJA

Uživanje alkohola povzroči povečanje paratiroidnega hormona (PTH) in zmanjšuje resorpcijo kalcija. Vpliva na izločanje kalcija v urinu, to vodi v nižjo koncentracijo kalcija v serumu in znižanje BMD.<sup>148</sup>

Kajenje vodi v zniževanje BMD, čeprav natančen mehanizem delovanja še ni razjasnjen.<sup>150</sup>

Fizična aktivnost poveča BMD tako pri zdravih, kot pri obolelih z osteoporozo. Zmerno gibanje v otroštvu in dobi odraščanja poveča BMD na kolku za 10 %, kar je povezano z manjšo verjetnostjo zlomov kolka.<sup>18</sup> Intenzivna fizična aktivnost športnikov, balerin, maratoncev... in odsotnost menstruacij, v odvisnosti telesne mase, zmanjša količino estradiola in progesterona, kar vodi v nižjo BMD v obdobju premenopavze. Nižja BMD atletov z manjšo koncentracijo steroidov vodi v zlome kratkih kosti stopala in jih ne uvrščamo v rizično skupino osteoporoznih zlomov.

Redko izpostavljanje sončnim žarkom zmanjša sintezo vitamina D, kar ima za posledico malabsorpcijo kalcija, več kot petkrat nižjo koncentracijo 25-hidroksivitamina D in nižji BMD.<sup>9</sup>

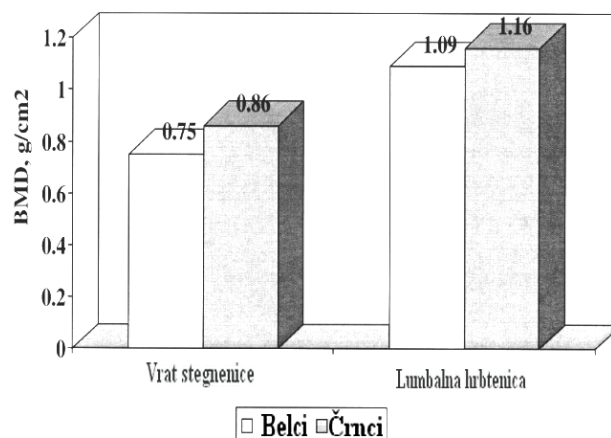
Nosečnost vodi v krhkost vretenc v tretjem trimestrju. Znižana BMD med nosečnostjo in laktacijo je samo začasen pojav.<sup>10</sup>

- TELESNA ZGRADBA

Astenična konstitucija-pod 58 kg je povezana z nižjim BMD in večjo verjetnostjo obolenja z osteoporozo<sup>10,68</sup>.

- RASA

Črnci imajo višji BMD in počasnejše starostno odvisno zniževanje BMD kot belci, zaradi medsebojnega vpliva genetskih faktorjev in okolja. Zato so belci bolj podvrženi verjetnosti za zlome<sup>11,68,70</sup>. (Slika 5)



Slika 5: BMD-Is in BMD-fn pri beli in črni rasi

Prikazuje BMD na vratu stegenice in na lumbalni hrbtenici med 503 starejšimi belimi moški in 191 starejšimi črnci. Razporeditev je statistično značilna za rase, na obeh delih telesa ( $p=0,01$ )<sup>11</sup>.

- ZGODNJA MENOPAVZA

Ženske pri katerih nastopi menopavza pred 40 letom imajo večjo verjetnost, da zbolijo za osteoporozo, zaradi negativnega ravnovesja kalcija, ki je posledica pomanjkanja steroidov, kar vodi v negativno kostno remodelacijo in izgubo kostnega tkiva. Čas nastopa menopavze je odvisen od dejavnikov okolja (uživanje alkohola, kajenje, fizična aktivnost, diete, izobrazbe, čas rojstva prvega in zadnjega otroka...) in genetskih faktorjev<sup>66</sup> (kandidatni geni: apolipoprotein E (APOE); polimorfizem (*PvuII*) na genu za  $ER\alpha$  .<sup>8,18</sup>

- POZNA MENARHA, OLIGOMENOREA ali AMENOREA

Čas nastopa menarhe je pomemben biološki napovedovalec kostne mase, zato je zgodnji nastop prve menstruacije napovedovalec večje maksimalno dosežene BMD, zaradi zgodnje in kontinuirane prisotnosti estrogenov, ki so pomemben dejavnik vzdrževanja homeostaze v kosti.

Ženske, ki imajo več kot 50 % menstruacij glede na normalno število pričakovanih ciklov, dosežejo le 88 % kostne mase, glede na ženske z normalnim številom menstruacij. Če število ciklov menstruacij pade pod 50 %, glede na ženske z rednimi menstruacijami, dosežejo le še 69 % kostne mase žensk z normalnim številom menstruacij. Asimptomatski oligo- ali amenorea sta posledica nizkega nivoja estradiola in vodita v nizko BMD pri ženskah v premenopavzi.<sup>12,18</sup>

- PREHRANA

Hrana z veliko vsebnostjo soli in proteinov vodi v nižjo BMD zaradi povečanega renalnega izločanja kalcija.<sup>29,30,149</sup>

Nizka količina proteinov v prehrani je povezana z večjo verjetnostjo zlomov zaradi podhranjenosti in šibke telesne zgradbe.

Vnos kalcija vpliva na BMD in biokemične kazalce.<sup>133</sup> Sočasno pomanjkanje kalcija in vitamina D v prehrani močnejše vpliva na znižanje BMD, kot če bi primanjkoval le kalcij. Manjši vnos vitamina D zmanjša BMD in poveča nevarnost zlomov kolka.<sup>8</sup>

Vitamin K omogoča karboksilacijo osteokalcina, ki je pomemben dejavnik kostne izgradnje, zato pomanjkanje zaradi neuravnotežene prehrane poveča nevarnost zlomov kolka.<sup>13</sup>

#### • DOLGOTRAJNO UŽIVANJE ZDRAVIL

Glukokortikosteroidi pospešujejo zniževanje BMD in vplivajo na zlome hrbtenice v večji meri pri črni rasi kot pri beli. Vplivajo na replikacijo in diferenciacijo osteoblastov in vzpodbujajo apoptozo zrelih osteoblastov. Glukokortikosteroidi zavirajo regulacijo genov, ki kodirajo kolagen, osteokalcin, TRPV6 in  $Ca^{2+}$  kanale, ki se izražajo v epitelu duodenuma<sup>9</sup>. Izkazalo se je, da so ljudje različno dovzetni za vpliv kortikosteroidov, kar nakazuje korelacijo gen-okolje in nakazuje potrebo za nadaljne raziskovanje.<sup>75</sup>

Študije o vplivu jemanja oralne kontracepcije v obdobju premenopavze še niso ovrgle ali potrdile enotnega dokaza o vplivu na BMD in verjetnostjo za zlome.<sup>8</sup>

Antikoagulantna terapija s heparinom ima morda negativen vpliv na BMD ob prisotnosti drugih rizičnih faktorjev kot so: nepokretnost, nosečnost in endokrine bolezni.<sup>7,14</sup>

Ledvični bolniki po transplantaciji ledvic prejema ciklosporine in v 88 % primerov pride do izgube kostne mase in obolelosti za osteopenijo ali osteoporozo.

Reveromycin A, destruksini, statini, ciklosporin A, simbioimin, prodigiozin zavirajo diferenciacijo ter funkcijo osteoklastov, funkcijo in/ali njihovo preživetje, torej zavirajo razvoj osteoporoze. Statini zavirajo resorpcijo osteoklastov in stimulirajo osteoblaste zato pospešujejo kostno izgradnjo.<sup>15</sup>

#### • BOLEZNI

Bolezni, ki razvijejo kot spremljajoče bolezensko stanje osteoporozo, ki jo, kot posledica druge bolezni imenujemo sekundarna osteoporozo so:

Cushingov sindrom spremlja nižja vrednosti BMD in pojav osteoporoze, zaradi povečane koncentracije glukokortikoidov, ki zmanjšajo produkcijo osteoblastov, zmanjšajo absorpcijo kalcija v črevesju in ledvičnih tubulih.<sup>16</sup>

Hiperparatiroidizem je bolezen povečane proizvodnje PTH, kar vodi v nenormalno homeostazo kalcija in povečano resorpcijo kostnine tako pri ženskah kot pri moških.<sup>17</sup>

Hiperparatiroidizem vodi v povečano remodelacijo.

Hipogonadizem se izraža z nizko koncentracijo folikel stimulirajočega hormona (FSH) in estrogenov, ki stimulirajo resorpcijo osteoklastov, kar vodi v osteoporozo in prisotnost zlomov hrbtenice.<sup>18</sup>

Parkinsonova bolezen je pogosto vzrok sekundarne osteoporoze. Bolniki imajo nizko BMD in nezadostno absorpcijo kalcija. Statistične raziskave kažejo pozitivno značilno korelacijo med BMD in telesno maso, ter negativno značilno korelacijo med BMD in starostjo, težavnostjo parkinsonove bolezni in nivojem osteokalcina.<sup>20</sup>

Anorexia nervosa se najpogosteje pojavi v dobi adolescence, času intenzivnega naraščanja BMD. Pri obolelih z anoreksijo se pojavi mnogo dejavnikov, ki pospešujejo zniževanje BMD in razvoj osteoporoze: amenoreja, nižje vrednosti insulin ravnega faktorja ena (IGF-1), visok nivo kortizola in izguba telesne mase.<sup>18,19</sup>

Akromegalija se izraža z večjim nivojem ravnega hormona (GH) in insulinu podobnega ravnega faktorja ena (IGF-1), kar vodi v znižanje BMD, pri tem je potrebno upoštevati stanje spolnih žlez, spol in bolezensko stanje.<sup>21</sup>

Diabetes vodi v hiperglikemijo in porast produktov glikationa. To vodi v moteno homeostazo kalcija, znižanje izločanja paratiroidnih hormonov, padca absorpcije kalcija zaradi manjšega delovanja vitamina D, poveča se izločanje kalcija skozi ledvica, zmanjša se funkcija osteoblastov in spremeni se kvaliteta kostnine. Zaradi metaboličnih sprememb se kopiči maščoba, ki poveča BMD in štiti pred pojavom osteoporoze, če bolnik uravnava hiperglikemijo in se primerno giblje.<sup>22</sup>

Revmatoidni artritis vodi v znižanje BMD. Zaradi večje koncentracije steroidov in/ali nastopa pomenopavze se pojavi povečana resorpcija. Vnetna citokina: dejavnik timorske nekroze alfa ( $TNF\alpha$ ) in interlevkin ena (IL-1) pospešujeta diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov in razvoj osteoporoze.<sup>58</sup>

Bolniki s kronično ledvično boleznijo obolijo za osteoporozo zaradi pomanjkanja hormonov spolnih žlez (estrogeni, testosteron), padca vnosa kalcija in/ali nastopa pomenopavze. Ledvične bolezni razvijejo fenotip z renalno osteodistrofijo.<sup>18</sup>

Mastocitoza, bolezen kopičenja maščobnih celic, katerih produkti pospešujejo resorpcijo kosti in pospešujejo razvoj osteoporoze.<sup>23</sup>

Vnetna črevesna obolenja vodijo v zniževanje BMD, razvoj osteoporoze in porast zlomov zaradi pomanjkanja vitamina D, malabsorpcije, nezadostne prehrane in vnetja. Malabsorpcija kalcija in pomankanje vitamina D (običajno pri starejših) povzroči sekundarni hiperparatiroidizem, zato se poveča koncentracija PTH, ki vpliva na povečano resorpcijo v kosti.<sup>24</sup>

Downov sindrom, kot posledica trisomije kromosoma 21 se fenotipsko izraža z nižjo BMD in povečano verjetnostjo za obolenost z osteoporozo.<sup>25</sup>

## **1.2.4. DIAGNOSTIKA IN SPREMLJANJE ZDRAVLJENJA OSTEOPOROZE**

### **1.2.4.1. MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE**

Osteoporozo lahko odkrijemo z merjenjem mineralne gostote kosti (BMD) že pred prvim zlomom kosti. Pri tem se uporabljajo različne tehnike merjenja tako perifernih delov skeleta, centralnega skeleta (ledvena vretenca) ali celotnega skeleta. Te tehnike vključujejo enoenergetsko absorpciometrijo (SXA), dvoenergetsko absorpciometrijo (DXA), kvantitativno računalniško tomografijo ter ultrazvočno kvantitativno ultrasonografijo. Zlati standard za diagnostiko in spremljanje zdravljenja osteoporoze je dvoenergetska absorpciometrija (DXA). Kostno gostoto merijo najpogosteje v področju ledvenih vretenc in kolka, ki je cenen in lahko dostopen način diagnosticiranja.<sup>34</sup>

Ker so spremembe v kostni masi relativno počasne, s pogostim merjenjem mineralne kostne gostote pa ne zaznamo sprememb, uporabljamo za spremljanje poteka bolezni in uspešnosti terapije, za oceno intenzivnosti kostne remodelacije in za oceno ravnotežja procesov tvorbe in resorpcije kosti biokemične kazalce kostne tvorbe in resorpcije kosti, ki jih določamo v serumu ali v urinu. Biokemični kazalci omogočajo ugotavljanje sprememb presnove veliko prej kot vrednosti BMD in s tem tudi hitrejše in učinkovitejše ukrepanje.

### 1.2.4.2. BIOKEMIČNI KAZALCI

V procesu kostne izgradnje ali razgradnje, se tvorijo značilni katabolični in anabolični produkti, sproščajo se v kri, in se izločajo z urinom skozi ledvica. Koncentracijo posamezne substance lahko merimo v kliničnem laboratoriju in ji pripišemo vrednost biokemijskega markerja. Kostni biokemični kazalci, ki se tvorijo med izgradnjo ali razgradnjo kosti se imenujejo biokemični kazalci izgradnje kosti ali biokemični kazalci razgradnje kosti. Imenujemo jih biokemični kazalci kostne remodelacije. Uporabljamo jih za oceno kostne tvorbe in razgradnje v času zdravljenja osteoporoze. Strokovne smernice jih ne priporočajo za diagnostiko osteoporoze.

#### 1.2.4.2.1. BIOKEMIČNI KAZALCI IZGRADNJE KOSTI

- **Kostno specifična alkalna fosfataza (BALP)**

BALP je tetramerni produkt zrelih osteoblastov, ki se pod vplivom encima glikozilfosfatidilinozitol specifične fosfataze D sprosti z njihove zunanje celične površine v dveh oblikah: topna dimerna in netopna oblika. Pri zdravih predstavlja topna oblika 35-40 % celotne ALP. Fiziološko doseže aktivnost kostne ALP dva starostno odvisna maksimuma, ob rojstvu in v puberteti zaradi spolnih hormonov. Koncentracija kostno specifične alkalne fosfataze v serumu kaže na celično aktivnost osteoblastov. Funkcija BALP še ni popolnoma razjasnjena, verjetno igra pomembno vlogo pri tvorbi osteoida in mineralizaciji.

Porast celotne ali kostno specifične ALP v serumu je kazalec z bolj predvidljivimi rezultati za mnoge bolezni, kot osteokalcin. Višje vrednosti BALP napovedujejo večjo verjetnost za zlome.<sup>34,35</sup>

Metode za določanje BALP v serumu so kemiluminiscentne imunološke raziskave. Pri spremljanju terapije je potrebno izmeriti vrednosti pred terapijo in 3-6 mesecev po pričetku terapije. ALP v jetrih lahko vpliva na vrednosti BALP.<sup>154</sup> (Preglednica III)

*Preglednica III: Referenčne vrednosti BALP v serumu.*<sup>154</sup>

Leta	Moški	Ženske
7-9 let	48.6-140.4 µg/L	36.3-159.4 µg/L
10-12 let	48.8-155.5 µg/L	44.2-163.3 µg/L
13-15 let	27.8-210.9 µg/L	14.8-136.2 µg/L
16-17 let	15.3-126.8 µg/L	10.5-44.8 µg/L
25 let in starejši	6.5-20.1 µg/L	
Premenopavza		4.5-16.9 µg/L
Pomenopavza		7.0-22.4 µg/L

- **Osteokalcin (OC)**

Osteokalcin je  $\gamma$  peptid bogat s karboksilglutaminsko kislino, ki ga sintetizirajo osteoblasti. Je nekolagenski protein kostnega matriksa. Njegova natančna vloga še ni znana. Znano pa je, da ima visoko afiniteto do hidroksipatita, ki je struktura kalcijevega fosfata, ki se veže na DNA.<sup>155</sup> Koncentracija OC v serumu izraža njegovo sintezo v osteoblastih v fazi mineralizacije in je visoko specifičen biokemični kazalec. V cirkulacijo gre samo 50 % OC, druga polovica se vgradi v hidroksipatit. V serumu je več oblik OC: 1/3 intakten OC, 1/3 N-terminalni srednji del in 1/3 manjši deli. Prisotnost premalo karboksilirane OC napoveduje rizičnost za zlome kolka in je v negativni zvezi z BMD.

Koncentracija OC sledi cirkadianim ritmom. Jutranjemu znižanju sledi najnižji nivo okoli poldneva, nato narašča in doseže višek okoli polnoči. Koncentracija S-OC variira glede na menstrualni cikel in doseže najvišji nivo v lutealni fazi.

Razgradnja OC poteka v ledvičnih glumerulih, če je njihova funkcija zmanjšana, pride do porasta S-OC.

Porast S-OC se pojavi pri visokem razmerju med kostno izgradnjo in razgradnjo in nakazuje pričakovane spremembe pri tvorbi kosti zaradi kirurških ali terapevtskih posegov.<sup>35</sup>

Metode za določanje OC v serumu so elektrokemiluminiscentne imunološke raziskave. (Preglednica IV) Pri spremljanju terapije je potrebno izmeriti vrednosti pred terapijo in 3-6 mesecev po pričetku terapije. Vrednosti OC pri pacientih z okvaro ledvic so skupek direktnega in indirektnega OC.<sup>154</sup>

*Preglednica IV: Referenčne vrednosti OC v serumu.*<sup>154</sup>

Starost	Moški	Ženske
7-9 let	66-182 ng/mL	73-206 ng/mL
10-12 let	85-232 ng/mL	77-262 ng/mL
13-15 let	70-336 ng/mL	33-222 ng/mL
16-17 let	43-237 ng/mL	24-99 ng/mL
18 let in starejši	11-50 ng/mL	11-50 ng/mL

#### 1.2.4.2.2. BIOKEMIČNI KAZALCI RAZGRADNJE KOSTNEGA TKIVA

Povečane koncentracije kazalcev resorpcije kosti v urinu ali serumu kažejo na povečano aktivnost osteoklastov in povečano resorpcijo.<sup>34,35</sup> Posledica aktivnosti osteoklastov je razgradnja kolagena tipa 1. Produkti razgradnje prehajajo v kri, kjer se dokončno razgradijo in se izločijo v urin. To so derivati piridina (piridinolin in deoksipiridinolin) in derivati pirola, ki so deli enote tropokolagenske strukture.

- **Piridinolin (PYD) in deoksipiridinolin (DPD)**

Molekule kolagena tip I so med seboj povezane in stabilizirane z molekulami PYD in DPD. PYD in DPD se pojavljata v kosti, mišicah, kardiovaskularnem sistemu in ligamentih, katerih razgradnja vpliva na koncentracijo v urinu izločenega PYD in DPD, ki je za 20-100% višja kot pri zdravih. Zvišane vrednosti napovedujejo dvakrat večjo verjetnost zlomov. Na koncentracijo PYD in DPD vpliva tudi razgradnja s hrano vnesenega kolagena<sup>34,35</sup>.

Pri zdravih moških zaradi cirkadianih ritmov doseže koncentracija f-DPD v serumu najvišjo vrednost med 5.00 in 10.00 uro, ter najnižjo vrednost med 14.00 in 17.00 uro. Starejši moški imajo nižje maksimalne vrednosti v serumu. Cirkadiani ritem oslabi pri pacientih obolenih z osteoporozo in tirotoksikozo. Vzrok je verjetno izguba teh ritmov tudi pri PTH in fosfatih, ki regulirajo cirkadiani ritem f-DPD. Pri obolenih za osteoporozo in tirotoksikozo je porast celotnega 24-urnega f-DPD močno povečan zaradi povečane resorpcije.

Pri zdravljenju tirotoksikozе, se po dveh mesecih zdravljenja koncentracija v serumu normalizira in opravičuje njegovo napovedno vrednost za porast BMD.

DPD je manj občutljiv kazalec, ki sovпада s stopnjo resorpcije kosti glede na CTX.<sup>35</sup>

Referenčne vrednosti v urinu: ženske: 3,0-7,4 nM DPD/mM kreatinina; moški: 2,3-5,4 nM DPD/mM kreatinina.<sup>36</sup> Koncentracije piridina nam omogočajo spremljanje kratkoročne terapije (2-3 mesece). Določamo z encimsko imunološko preiskavo.<sup>154</sup>



- **Razmerje kalcij/kreatinin v urinu**

Kalcij je kazalec raztapljanja kosti, ki je odvisen od prehoda kalcija glede na status PTH in vnosa kalcija s hrano.

- **Razmerje hidroksiprolin/kreatinin**

Hidroksiprolin je kazalec razgradnje kolagena v kosti, vendar je vedno prisoten tudi kot produkt razgradnje kolagena v hrustancu, koži in vnosu kolagena s hrano.

- **Tartrat rezistentna kislina fosfataza (TRACP)**

Pri razgradnji kostnega matriksa se TRACP sprošča iz osteoklastov in aktiviranih makrofagov v kri zato je biokemični kazalec resorpcije kosti. V serumu se nahajata dve obliki: TRACP 5a, katere izvor je nedoločen in TRACP 5b, ki je produkt osteoklastov.

Študije so pokazale, da je S-TRACP 5b občutljiv in specifičen biokemični kazalec resorpcije kosti in bi ga lahko uporabili za diagnostiko in spremljanje patogeneze skeleta. Potrebne bodo še nadaljnje raziskave za vrednotenje napovedne vrednosti TRACP.<sup>153</sup>

- **Kostni sialoproteini (BSP)**

Koncentracija BSP v serumu je občutljiv kazalec resorpcije v kosti in ima pomembno vlogo pri napovedi ponovitve, rasti in širjenju malignih tumorskih celic pri raku dojke in multiplem mielomu. Cirkadiani ritmi se izražajo z visokimi vrednostmi v zgodnjih jutranjih urah in nižjimi popoldanskimi vrednostmi.

Izrazito višje koncentracije BSP v serumu se pojavijo pri hiperparatiroidizmu, Pagetovi bolezni, osteoporozi in osteomalaciji in povišane pri reumatoidnem artritisu, anksilioznem spondilitisu in normalni nosečnosti.

Zdravljenje starejših žensk z estrogenom, kalcijem in vitaminom D povzroči očiten padec BSP v serumu pri ponovnem pojavu zopet dvigne.<sup>35</sup>

- **Telopektidi kolagena I z značilnimi epitopi**

V procesu resorpcije se z molekule kolagena I odcepijo beta-CTx, beta-prečno prekržani (beta-Crosslaps), 1 N terminalni prečno povezani telopektidi (NTx), C-terminalni telopektid. Beta-CTx in beta-prečno prekržani (beta-Crosslaps) telopektidi imajo beta izomerizirane 8AA oktapeptide, ki tvorijo epitope C terminalnih telopektidov. Beta-prečno prekržani telopektidi imajo en 8AA oktapeptid, beta-CTx pa dva.

Padec vrednosti CTx je zgodnji napovedovalec stabilizacije ali naraščanja BMD zaradi učinkovitosti terapije anti-resorptivnih sredstev pri osteoporozi. Koncentracije v serumu in urinu se znižajo za več kot 70 % pri zdravljenju z bifosfonati in za 50 % pri hormonalni terapiji. Maksimalni učinek zaznamo po 3-6 mesecih terapije, vrednosti pa napovedujejo vrednosti BMD, ki se bodo pojavile po 1-2 letih zdravljenja. Vrednosti CTx so obratno sorazmerne z BMD.

Vrednosti CTx in deoksi piridinolina (DPY) v urinu ter S-CTx napovedujejo verjetnost zlomov pri starejših ženskah. S-CTx nakazuje razlike v kostnem statusu med dekleti v adolescenci in drugimi starostnimi skupinami. Starejše ženske imajo za 23% višje vrednosti CTx glede na ženske v premenopavzi. Hkrati zvišane vrednosti S-CTx in znižanje koncentracije osteokalcina (S-OC) v serumu so povezane z revmatoidnim artritisom. (Preglednica V)

Vrednosti CTx nakazujejo presnovo kosti pri dializnih bolnikih<sup>34,35</sup>.

Koncentracija S-CTx pri zdravih moških variira zaradi cirkadianih ritmov in doseže najvišjo vrednost med 7.00 in 11.00 uro, ter najnižjo vrednost med 14.00 in 17.00 uro. Starejši moški imajo nižje maksimalne vrednosti v serumu. Pacienti z osteoporozo in tirotoksikozo imajo oslabele cirkadiane ritme. Vzrok za to je verjetno izguba teh ritmov tudi pri PTH in

fosfatih, ki verjetno regulirajo cirkadiani ritem CTx. Pri obolelih za osteoporozo in tirotoksikozo je porast celotnega 24-urnega CTx močno povečana zaradi povečane resorpcije. Napovedne vrednosti koncentracije CTx v serumu in urinu so med seboj primerljive za napoved osteoporotičnih zlomov.

Metode za določanje beta-CTx v serumu so elektrokemiluminiscentne imunološke raziskave. (Preglednica V) Uporabljajo se za spremljanje anti-resorptivne terapije pri ženskah v pomenopavzi in pri posameznikih z osteopenijo. Test ne more zamenjati diagnosticiranja z BMD. Pri interpretaciji rezultatov je potrebno upoštevati dieto, fizično aktivnost cirkadiane ritme.<sup>154</sup>

Tabela V: Referenčne vrednosti CTx v serumu.<sup>154</sup>

Starost	Ženske	Moški
18-29 let:	64-640 pg/mL	87-1200 pg/mL
30-39 let:	60-650 pg/mL	70-780 pg/mL
40-49 let	40-465 pg/mL	60-700 pg/mL
Pomenopavza:	104-1008 pg/mL	
50-69 let:		87-345 pg/mL
70 let ali več:		80-1050 pg/mL

Koncentracije NTx se znižajo za 20-30 % pri zdravljenju s kalcitoninom, 35-50 % pri zdravljenju z estrogeni in več kot za 50 % pri zdravljenju z alendronatom ali kombinaciji alendronat estrogen. Vrednosti NTx so obratno sorazmerne z BMD.

Metode za določanje beta-NTx v serumu so kemiluminiscentne imunološke raziskave. (Preglednica VI) Pri spremljanju terapije je potrebno izmeriti vrednosti pred terapijo in 3-6 mesecev po pričetku terapije. 30-40% nižje osnovne vrednosti po treh mesecih terapije so razlog za anti-resorptivno terapijo.

Preglednica VI: Referenčne vrednosti NTx v urinu<sup>154</sup>

BCE = Bone Collagen Equivalent ali ekvivalent kolagena v kosti.<sup>154</sup>

Leta	Moški	Ženske
7-9 let	167-578 nM BCE/mM kreatinin	201-626 nM BCE/mM kreatinin
10-12 let	152-505 nM BCE/mM kreatinin	173-728 nM BCE/mM kreatinin
13-15 let	103-776 nM BCE/mM kreatinin	38-515 nM BCE/mM kreatinin
16-17 let	34-313 nM BCE/mM kreatinin	20-144 nM BCE/mM kreatinin
18 let in starejši	21-83 nM BCE/mM kreatinin	
Premenopavza		17-94 nM BCE/mM kreatinin
Pomenopavza		26-124 nM BCE/mM kreatinin

#### • Katepsin K

Katepsin K je cisteinska proteaza in ima pomembno vlogo pri razgradnji v kostnem matriksu. Cepi helikalno in telopeptidno regijo kolagena tipa I. Katepsin K merimo v plazmi in serumu z laboratorijskimi testi ELISA. Je novejši biokemični kazalec, ki obeta možnosti razvoja novih terapevtskih učinkovin za inhibicijo resorpcije kostnega tkiva.<sup>155</sup>

### 1.2.4.2.3. VPLIVI RAZLIČNIH FAKTORJEV NA BIOKEMIJSKE KAZALCE

#### STAROST

Vpliv starosti na biološke in kemijske kazalce

U-DPD, U-PYD in U-NTX so kazalci, ki imajo višjo koncentracijo ob rojstvu, kot v kasnejših letih. Prav tako velja za kazalce kostne izgradnje: BALP, PICP in S-OC sledijo kazalcem kostne resorpcije. Koncentracije ob rojstvu so zelo velike, verjetno zaradi hitrega procesa rasti, nato pospešeno padajo do drugega leta starosti, ki mu sledi kontinuirano a počasno upadanje koncentracij. V sredini pubertete pride do ponovnega porasta koncentracij kostnih biokemijskih kazalcev zaradi večjega delovanja hormonov spolnih žlez.

Nekatere raziskave so pokazale, da je porast biokemijskih kazalcev resorpcije (U-NTX, U-CTX) tudi za 50-100% večji glede na kazalce izgradnje (BALP, OC) kosti v pomenopavzi glede na premenopavzo.

Pri moških je porast kazalcev resorpcije manj očitien kot pri ženskah.

Tako pri ženskah, kot pri moških raziskave biokemičnih kazalcev niso enotne in kažejo tudi nasprotujoče si rezultate.

U-PYD, U-DPY, U-NTX, kot kazalci resorpcije kosti, so najvišji ob rojstvu in s starostjo upadajo enakemu trendu sledijo kazalci kostne izgradnje: BALP, PICP in S-OC.

Ob rojstvu pride do zviševanja koncentracije biokemijskih kazalcev, ki doseže vrh ob enem mesecu starosti zaradi pospešene rasti. V tretjem mesecu starosti pride do pospešenega upadanja, ki se stabilizira po drugem letu starosti. Nato s starostjo biokemični kazalci upadajo, verjetno zaradi povečevanja telesne mase. Med 30 in 50 letom so kazalci visoki, po petdesetem letu pa začnejo naraščati, verjetno zaradi nastopa menopavze.<sup>35</sup>

#### SPOL

V prvih mesecih življenja spol ne vpliva na naslednje biokemijske kazalce: PYD, U-CTX, U-NTX, OC in PICP. V prvih dveh letih življenja je pri deklicah višji U-CTX in U-NTX, pri dečkih pa PICP.

V pred puberteti je nivo biokemičnih kazalcev primerljiv med deklicami in dečki. V puberteti pa porast kazalcev resorpcije: U-NTX, U-PYD, U-DPD, ICTP in tvorbe OC nastopi pri dekletih kasneje kot pri dečkih. Do padca biokemičnih kazalcev pri dekletih pride kasneje, kot pri dečkih, ker dosežejo kasneje vrh gostote kosti. Moški imajo dlje zvišane biokemične kazalce remodelacije, zaradi dlje trajajoče rasti.

V zgodnji odrasli dobi so kazalci tvorbe BALP in resorpcije: U-PYD, U-DPD višji pri moških, kot pri ženskah. To je posledica kasnejšega doseganja zrelosti skeleta pri moških. V odrasli dobi in starosti imajo moški višji nivo kazalcev remodelacije. Po petdesetem letu, pa so višji pri ženskah. V odraslosti ni povezave med spoloma in biokemičnimi kazalci. Vpliv starosti na biokemične kazalce pri moških so nasprotujoči in so potrebne nove raziskave.<sup>35</sup>

#### RASA

Študije so pokazale, da je pri otrocih, ki so črne rase nižji nivo kazalcev resorpcije TRACP in PYD ter izgradnje OC. V odrasli dobi večinoma ni razlik, kar utemeljujejo s tem, da so bili v preiskavo vključeni preiskovanci, ki so bili v zgodnji odrasli dobi, ko je kostna remodelacija v ravnotežju. Nadaljnje raziskave so nujne za razjasnitev povezave etničnega ozadja in biokemičnih kazalcev.<sup>35</sup>

**VPLIV ZDRAVLJENJA OSTEOPOROZE NA BIOKEMIČNE KAZALCE KOSTI****• VPLIV HORMONSKE TERAPIJE**

Pomanjkanje estrogenov povzroči za 50-100% večje koncentracije kazalcev kostne remodelacije, obstoječe v normalnem življenju. Hormonska terapija povzroči padec koncentracije biokemijskih kazalcev: U-CTX, U-NTX, S-CTX za 40-60 % in U-prosti DPD za 20-30 %. Druge raziskave so pokazale padec S-OC in PINP v začetku terapije in nato še padec BALP. To je posledica spremembe presnove v jetrih, ki vpliva na proizvodnji IGF-1, ki vodi v padec S-OC, PINP in BALP.<sup>35</sup>

**• VPLIV BIFOSFONATOV**

Zdravljenje z bifosfati povzroči padec koncentracije kazalcev kostne remodelacije v odvisnosti od doze zdravila. Po mesecu zdravljenja pride do izrazitega padca kazalcev razgradnje kosti: U-CTX, U-NTX in S-CTX za 60-70 % in DPD za 50 %. Porast kazalcev izgradnje doseže plato po 6-12 mesecih zdravljenja v odvisnosti od vrste zdravila, doze in kazalca. Tri mesece po prenehanju zdravljenja se pojavi izrazito povečanje kazalcev razgradnje, kasneje se zniža tudi nivo kazalcev izgradnje. Čas ponovnega doseganja koncentracij kazalcev prvotnih, še nezdravljenih stanj, še ni znan.

Z zdravljenjem doseženo kratkotrajno znižanje kostnih kazalcev remodelacije (3-6 mesecev), to vodi v dolgotrajni - dvoletni porast BMD na hrbtenici. Večji kot je padec biokemičnega kazalca: OC, DPD, NTX, CTX, večji je porast BMD.

Uporaba biokemijskih kazalcev za spremljanje delovanja terapije po krajšem-šest mesečnem obdobju je bistvenega pomena, ker v tako kratkem času ne zaznamo bistvenih sprememb pri merjenju BMD s preiskavo DEXA.<sup>35</sup>

Ženske v pomenopavzi z višjo koncentracijo kazalcev resorpcije: prosti U-DPD, U-NTX, U-CTX in S-CTX, imajo dvakrat večjo verjetnost za pojav zlomov glede na ženske, ki imajo v premenopavzi normalne koncentracije omenjenih kazalcev. S-BALP in ucOC kot kazalca kostne izgradnje sta napovedovalca verjetnosti pojava zlomov. Kazalci kostne remodelacije napovedujejo zlome kolka pri starejših zdravih ženskah. Visoke koncentracije NTX, CTx, PYD in DPD, ter OC v serumu vodijo v hitrejšo izgubo kosti na kolku.

Nizka koncentracija estradiola v serumu ima veliko napovedno vrednost za zlome na kolku in hrbtenico pri starejših ženskah. Ženske, ki imajo hkrati povišane vrednosti kazalcev kostne resorpcije in nižje vrednosti estradiola imajo veliko verjetnost za zlome.<sup>35</sup>

Biokemijski kazalci resorpcije kosti bolj zanesljivo napovedujejo zlome, kot kazalci tvorbe kosti. Zanesljive kombinacije vrednosti posameznih kazalcev, kot napovedne vrednosti osteoporotičnih zlomov, bodo lahko določene na osnovi nadaljnjih primerjalnih raziskav ostalih rizičnih faktorjev, kot so BMD in kliničnih rizičnih faktorjev. Kot tudi raziskave, ki bodo pokazale praktično uporabo presejalnih testov za ugotavljanje verjetnosti pojava zlomov pri posamezniku.<sup>35</sup>

### 1.3. GENETIKA OSTEOPOROZE

Osteoporoza je kompleksna več faktorska bolezen, močno pod vplivom genetskih dejavnikov in dejavnikov okolja, ter njihovih interakcij. Raziskave so pokazale, da je regulacija BMD posameznika dedna, kot tudi ostali rizični faktorji: kvaliteta kosti, geometrija vratu stegenice in kostni preobrat, ki so vzrok za osteoporotične zlome.

Diagnostika osteoporoze se razvija v smeri odkrivanja vpliva genetskih dejavnikov, odkrivanja rizičnih posameznikov - genetske predispozicije za razvoj bolezni, pri čemer so primerjali razlike v mineralni kostni gostoti enojajčnih in dvojajčnih dvojčkov. Ugotovili so, da je razlika pri dvojajčnih dvojčkih značilno večja kot pri enojajčnih, ni pa še poznan gen, ki je odgovoren za razvoj osteoporoze. Osteoporoza je namreč poligenška in polifaktorska bolezen.<sup>7</sup> Odkritih je bilo približno 40 kandidatnih genov, katerih raziskave so potrdile ali ovrgle povezanost z osteoporozo.<sup>53</sup> Kandidatni geni, ki so bili raziskovani vključujejo tudi gen za vitamin D receptor (VDR).<sup>2,44</sup>

#### 1.3.1. ISKANJE KANDIDATNIH GENOV POVEZANIH Z OSTEOPOROZO

Temeljijo na raziskavah vezanega dedovanja (ang. Linkage studies), odkrivanja kandidatnih genov in raziskovanja izražanja genov na ljudeh in na živalih. Z raziskavami vezanega dedovanja so bili odkriti določeni odseki na kromosomu (ang. QTL), na katerih se nahajajo lokusi, ki regulirajo BMD in geometrijo kosti. BMD je lahko merljiva in najbolj značilna determinanta, s katero ugotovimo fenotip, za gene, ki so povezani z osteoporozo.

Z raziskavami vezanega dedovanja družinskih članov, so odkrili mnoge polimorfne kazalce, ki so 5-10 cM oddaljeni od lokusa, na katerem se nahaja kandidatni gen, za katerega predvidevajo, povezanost z dedovanjem kostne mase. To pomeni, da se polimorfni kazalec, ki ga lahko sledimo deduje vezano s kandidatnim genom, oziroma obolenjem, in je njuna frekvenca rekombinacije 5-10 %.<sup>42</sup> Rezultati raziskav vezanega dedovanja so izraženi v razvrstitvi LOD (ang. LOD score), ki je skupni logaritem razmerja verjetij (verjetnosti dogodka, v seriji dogodkov vezanosti pri določeni rekombinacijski frakciji), v primerjavi z verjetjem, da je dogodek naključen in ni vezanosti. Zaradi naključnosti križanja in rekombinacije, se nevezani lokusi dedujejo skupaj v polovici (50 %) vseh mejoz. Osnovna verjetnost, da sta lokusa vezana je torej 1/50. Vrednosti LOD, ki so enake ali večje od 3 pomenijo 1000x večjo verjetnost, da sta lokusa vezana, kot da se naključno dedujeta skupaj. Vrednosti LOD nižje od -2 izključujejo vezano dedovanje.

Z raziskavami vezanega dedovanja z BMD so bili odkriti naslednji kandidatni geni: PTHR1 gen, EGF gen, COLIA1 gen, COLIA2 gen, gen VDR, gen ER- $\alpha$ , gen IL-1, IL-4, IL-6, CaSR, TNF-  $\alpha$  in IGF.<sup>44</sup> Mnogo raziskav je pokazalo nasprotno rezultate, ker so raziskave vezanega dedovanja manj ustrezne za analizo kompleksnih bolezni, ki so genetsko heterogene in imajo nizko statistično moč odkrivanja napačnih pozitivnih rezultatov.<sup>43,44</sup>

Dednost (ang. Heritability)  $h^2$  definira delež BMD varianc (fenotipskih varianc določenega obolenja), ki je povzročen s seštevkom genetskih varianc. Raziskave na dvojčkih so pokazale, da je vpliv dednosti  $h^2$  za BMD na hrbtenici in kolku 70-85 % in 50-60% na zapestju. Pri tem ne smemo zanemariti mnogih drugih faktorjev, ki vplivajo na geometrijo kosti, na nevarnost zlomov, na biokemične kazalce kostnega preobrata, telesno težo, mišično moč, starost nastop menopavze.... Mnogi imajo velik vpliv na fenotip, hkrati pa so genetsko neodvisni med seboj.<sup>44</sup>

Z raziskavami kandidatnih genov, odkrivamo polimorfizme določenih genov in povezave alelnih variant z BMD ali osteoporoznimi zlomi na populacijskih študijah in študijah posameznih primerov.

Kandidatni gen je izbran izključno na osnovi biološkega učinka na presnovo kosti ali na aktivnost kostnih celic. Raziskave kandidatnih genov so lahke za izvedbo in učinkovito odkrivajo majhne učinke. Pomanjkljivost raziskav je možnost napačno pozitivnih in napačno negativnih rezultatov glede na faktorje in populacijsko slojevitost. Z raziskavami povezav z boleznijo (ang. Association Studies) primerjamo pojavnost določenega polimorfizma pacientov s pojavnostjo istega polimorfizma v kontrolni skupini. Če sta pojavnosti statistično značilno različni, dobimo pozitivno ali negativno asociacijo. Določimo relativno tveganje, koliko pogosteje je obolenje pri osebkih z določenim kazalcem v primerjavi z osebki brez kazalca. Asociacija in identifikacija lokusa še ne pomeni, da smo določili bolezenski gen, ker na pojav obolenja vplivajo drugi genetski in okoljski dejavniki.<sup>42</sup> Medsebojne povezave alelov bližnjih polimorfizmov določajo meritve vezavnega nesorazmerja (ang. Linkage disequilibrium LD), kar pomeni, da se kromosomski haplotip, ki je sestavljen iz bolezenskega in markerskega alela, v populaciji pojavlja pogosteje, kot bi pričakovali. To pomeni, da en polimorfizem lahko napoveduje bližnjega, ker se med njimi pojavi zelo malo rekombinacij v času zgodovine populacije in poteka evolucije.

To pomeni, da sta vezavno nesorazmerje LD in struktura haplotipov vsakega kandidatnega gena pomembna za raziskave povezav z boleznijo, ki omogočajo razlago polimorfnihih variacij vsakega gena in omogočajo razlago populacijskih variacij fenotipa, ki nas zanima.

Odkritje haplotipa, ki je nosilec rizičnega alela vodi v funkcionalne raziskave celične in molekularne biologije, ki bodo potrdile različico na haplotipu alelov, ki resnično povzroča določen fenotip.<sup>45</sup>

### 1.3.2. VITAMIN D

Vitamin D<sub>3</sub> ali 9,10-seko(5Z,7E)-5,7,10(19)holestatatrien-3β-ol ali holekalciferol nastane v koži ob prisotnosti UVB z valovno dolžino 290 – 315 nm ali ga zaužijemo s hrano. Vitamin D<sub>2</sub> ali 9,10-seco(5Z,7E)-5,7,10(19),22-ergostatatrien-3β-ol je sintetična oblika vitamina D, ki nastane iz ergosterola ob prisotnosti iradiacije. Vitamin D ima A, B, C in D obroče, ki so derivati ciklopentanoperihidrofenantrena. Uvrščamo ga v sekosteroide, ker je na D obroču prekinjena C-9 in C-10 vez. Strukturna razlika med vitaminom D<sub>2</sub> in D<sub>3</sub> je v stranski verigi vitamina D<sub>2</sub>, ki vsebuje dvojno vez med C-22 in C-23 ter metilno skupino na C-24.

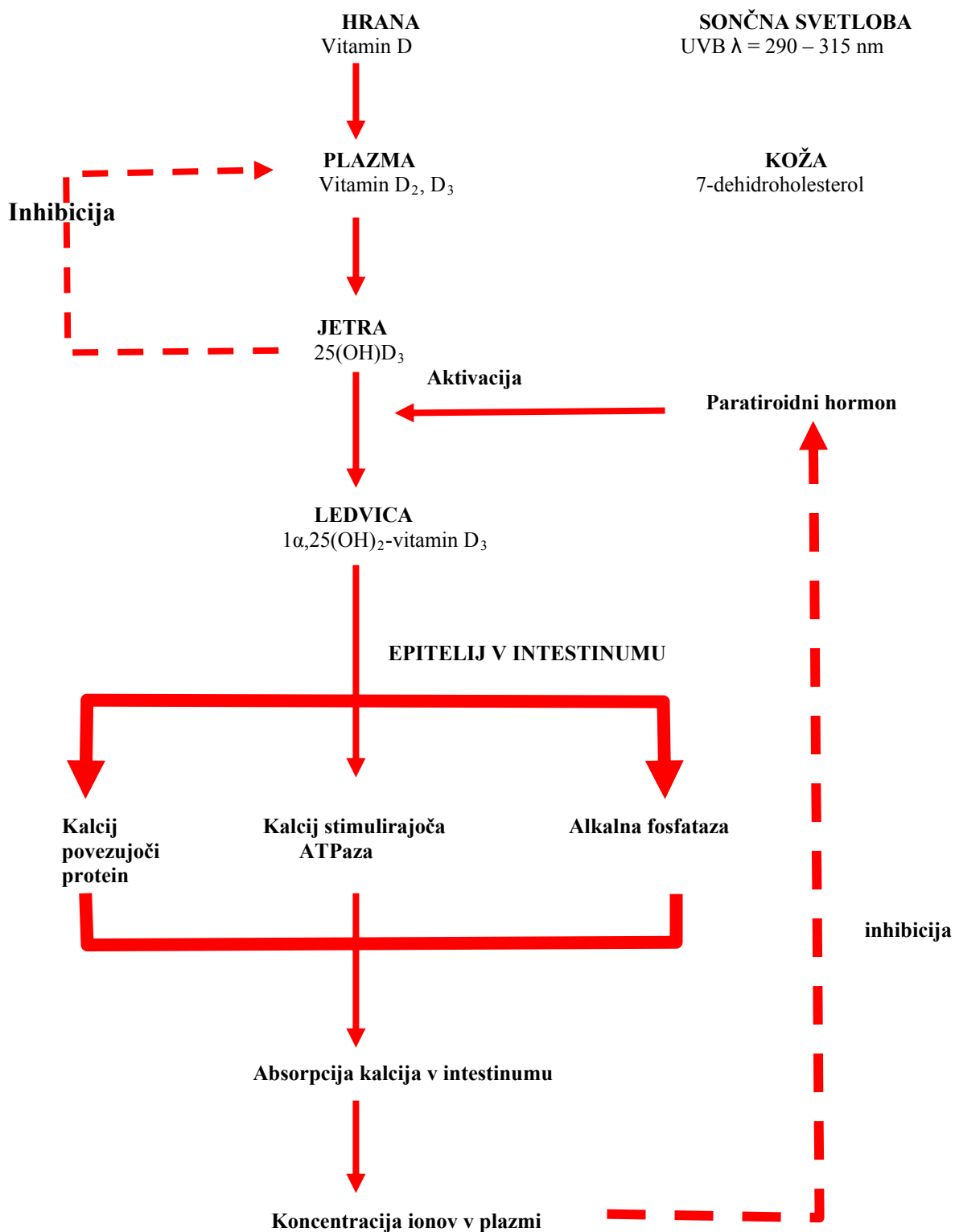
Vitamin D je nujno potreben za življenje in je zelo pomemben biološki regulator homeostaze kalcija, ki je dosežena v procesu presnove vitamin D endokrinega sistema (slika 6), ki vključuje:

- pretvorbo 7-dehidroholesterola v vitamin D<sub>3</sub> v koži ali vnos vitamina D<sub>3</sub> s hrano,
- presnova vitamina D<sub>3</sub> v jetrih, ki vodi v tvorbo 25(OH)D<sub>3</sub>, ki je najpomembnejša oblika vitamina D v krvi,
- pretvorbo 25(OH)D<sub>3</sub> v ledvicah, ki vodi v tvorbo dveh dihidroksiliranih metabolitov: 1α,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> in 24R,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>,
- sistemski transport dihidroksilizitanih metabolitov 1α,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> in 24R,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> v distalne tarčne organe,
- vezava steroidnega hormona 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> na jedrski receptor v tarčnih organih, ki imajo za posledico različno biološko odgovornost. (Slika 6)

Encimi, ki sodelujejo v vitamin D endokrinem sistemu so jetrna vitamin D<sub>3</sub>-25-hidroksilaza ter ledvični 25(OH)D<sub>3</sub>-1α hidroksilaza in 25(OH)D<sub>3</sub>-24R hidroksilaza in imajo funkcijo

citokrom P-450 oksidaze. Glavni regulatorji Vitamin D endokrinega sistema so  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin  $\text{D}_3$ , paratiroidni hormon ter koncentracija kalcija in fosfatov v serumu.

$1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin  $\text{D}_3$  se veže na jedrni receptor VDR, ki regulira gensko transkripcijo in vpliva na celično membrano in njeno propustnost.<sup>50</sup> (Slika 7)

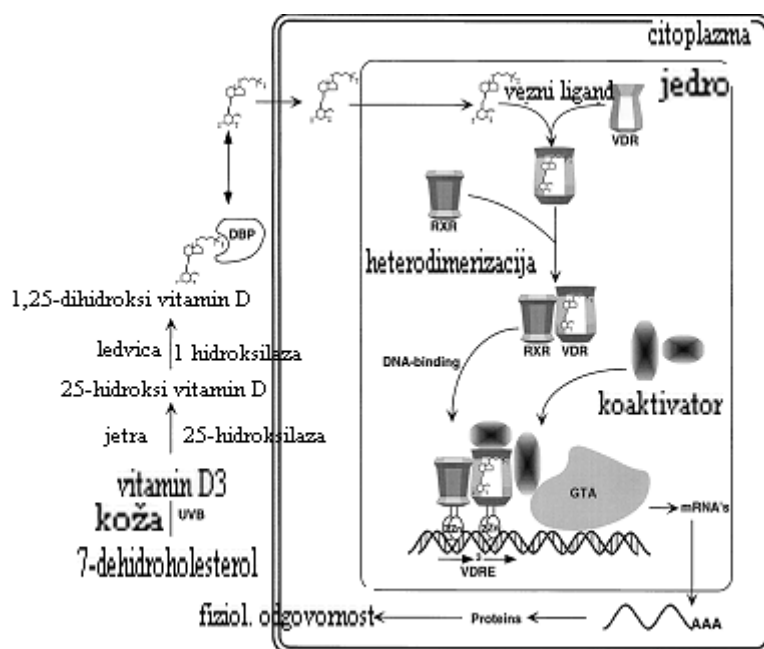


Slika 6: Presnova vitamina D

### 1.3.3. RECEPTOR VITAMINA D (VDR)

Vitamin D receptor (VDR) je protein v velikosti 50 kDa, ki se z visoko afiniteto povezuje z  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitaminom  $\text{D}_3$ .<sup>50</sup> Primarna struktura VDR obsega pet funkcijskih regij: regija, ki omogoča lokalizacijo v jedru (N-terminal in COOH terminal), DNA povezovalna regija, regija za heteromerizacijo z drugimi jedrskimi proteini, regija za povezovanje z ligandi in regija za transkripcijsko aktivacijo. (Slika 9)

Receptorji za vitamin D se v telesu nahajajo v različnih tkivih npr. črevo, jetra, ledvica, kosti, koža, srce, itd. Njegovo delovanje v tankem črevesju, ledvicah in kosteh je poglavitnega pomena za homeostazo kalcijevih ionov ter posredno za kostno premeno. V tankem črevesju vzpodbuja absorpcijo kalcija in sodeluje pri prenosu kalcijevih ionov skozi citoplazmo. V ledvicah sodeluje pri reabsorpciji kalcijevih ionov iz primarnega seča, v tubularni celici, omogoča sintezo proteinov, ki vežejo kalcijeve ione, omogoča prenos le teh skozi celico in uravnava lastno sintezo. V kosteh pospešuje tvorbo kostnine, ker omogoča sintezo osteokalcina in osteopontina. Pospešuje tudi dozorevanje prekursorskih celic osteoklastov, zato prispeva k razgradnji kosti.<sup>50</sup>



Slika 7: Sinteza  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina  $\text{D}_3$  in potek molekulskega mehanizma.

V koži se ob prisotnosti UV svetlobe 7-dehidroholesterol pretvori v vitamin  $\text{D}_3$ . V jetrih se hidroksilira na mestu 25 in tvori 25-hidroksivitamin  $\text{D}_3$ . Na mestu 1,  $1\alpha$  hidroksilaza pretvori metabolit v aktivni  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin  $\text{D}_3$ , ki vstopa v kri in se veže na vitamin D-povezovalni protein. Prosti lipofilni ligand difundira skozi lipidni sloj celične membrane in prehaja v jedro, kjer se z visoko afiniteto veže na VDR. Vezava liganda povzroči spremembo konformacije VDR, kar omogoči heterodimerizacijo z retinoidnim X receptorjem (RXR). Specifično vez med DNA povezujočim delom receptorja vitamina D in DNA tvori dve cinkovi zanki. VDR-RXR heterodimer veže še druge koaktivatorje, ki skupaj tvorijo kompleks, ki reagira z glavnim transkripcijskim aparatom, ki sproži transkripcijo gena. Novo sintetizirani proteini vodijo v fiziološke učinke.<sup>157</sup> (Slika 7)



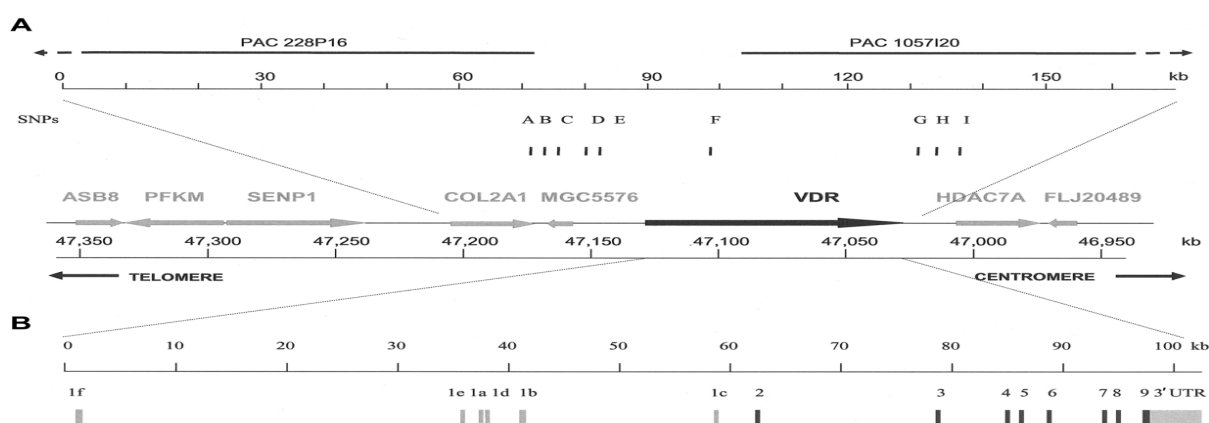
### 1.3.4. GEN ZA RECEPTOR VITAMINA D

Kandidatni geni, ki so bili raziskovani vključujejo tudi gen za vitamin D receptor (VDR)<sup>2,44</sup>, ki je bil prvič povezan z osteoporozo leta 1994 in je eden prvih genov, ki so ga proučevali v povezavi z zmanjšano mineralno gostoto kosti<sup>47</sup>. Določene spremembe v VDR genu spremenijo stabilnost, strukturo, izražanje in učinkovitost VDR, kar vodi v variacije fenotipov, kot so mineralna kostna gostota in osteoporotični zlomi<sup>11</sup>.

Zato je gen za VDR upravičeno kandidatni gen za regulacijo BMD. Uravnavanje VDR poteka na nivoju transkripcije in posttranslacije. Izražanje gena VDR pospešuje protein kinaza A, zavira pa protein kinaza C. Oba signala vplivata na delovanje PTH v tarčnih celicah, ki predstavljajo mehanizem homeostaze celične občutljivosti na 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Prav tako estrogeni, tiroidni hormon, glukokortikoidi, retinoična kislina, stanje diferenciacije in celični cikel vlivajo na spreminjanje nivoja mRNA, katere izražanje je tkivno specifično. Zato ima količina VDR verjetno pomembno vlogo pri proliferaciji in diferenciaciji ob prisotnosti 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.<sup>49</sup>

Seko-steroidni hormon 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, njegov receptor VDR in metabolni encimi so dejavniki, ki tvorijo endokrini sistem vitamina D, ki je vključen v številne presnovne poti. Ima pglavitno vlogo v presnovi kalcija, imunskem statusu, pri regulaciji rasti in diferenciaciji celic, kot so keratinocite, osteoblasti, raketvorne celice, T-celice. Zaradi pleotropične narave gena VDR raziskave podajajo njegove povezave z mnogimi bolezenskimi fenotipi: osteoartritis, hiperparatiroidizem, rak, infekcije... (Slika 10) Raziskave so pokazale variacije v DNA sekvenci pomembnih proteinov tega sistema. Mutacije, ki povzročijo delecije v genu za VDR vodijo v fenotip rahitisa z rezistenco na 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ki jo uvrščamo med monogenske bolezni.

Manj opazne variacije sekvence so polimorfizmi, ki se pojavijo pogosteje, njihovi učinki so slabo raziskani, mnogi od njih so neznani, pri oblikovanju fenotipa se z majhnimi medsebojnimi učinki dopolnjujejo in vodijo v kompleksne bolezni, kot je osteoporoz, pri katerih je razvoj fenotipa posledica genetskih in okoljskih dejavnikov.<sup>49</sup>



Slika 8: Genomska struktura hVDR gena

A Organizacija 12q13 hVDR (kb 47032–47145). Smer puščice za vsak gen prikazuje smer prepisovanja.

B Črne črte ponazarjajo kodirajoče eksone, sive črte pa 5 eksonov in 3' UTR področje.<sup>50</sup>

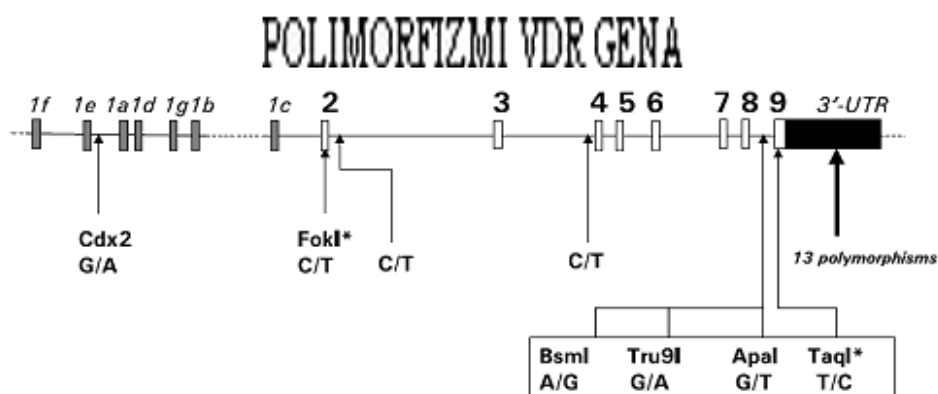
Gen za hVDR se nahaja na kromosomu 12q13, ki ga sestavlja 11 eksonov in 8 intronov, ki obsegajo 75 kb. Trije eksoni 1A, 1B in 1C se nahajajo na 5' nekodirajočem koncu-promotorju,

sledi 8 eksonov, ki kodirajo strukturo produktov VDR. Sekvenca 1A eksona je bogata z GC, ki tvori mesto vezave za transkripcijski faktor SP1 ter druge transkripcijske faktorje in nima prisotnosti ponovitev TATA, kar nakazuje, da je struktura gena hVDR enaka, kot pri vseh ostalih promotorjih steroidnih genov. Mnogi DNA fragmenti eksona 1C, so aktivirani z 1,25 dihidroksivitamin D<sub>3</sub> in vplivajo na transkripcijsko aktivnost. Ekson 2 vsebuje mesto začetka translacije.<sup>45,49,50</sup> (Slika 8)

### 1.3.5. POLIMORFIZMI NA GENU ZA RECEPTOR VITAMINA D

Do danes so odkrili že več kot 62<sup>48,54</sup> različnih polimorfizmov v promotorju, kodirajoči in regulatorni regiji gena *VDR*. Večina polimorfizmov je bila odkritih na regulatornem 3'-koncu gena: BsmI (Morrison et al., 1992), Tru9I (Ye et al., 2000), EcoRV (Morrison et al., 2000), APAI (Faraco et al., 1989), TaqI (Morrison et al., 1994), polyA (Durrin et al., 1999). Polimorfizem C/T v drugem intronu (Brown et al., 2000) in insercija/delecijaG v sedmem intronu (Brown et al., 2000), Fok I na drugem eksonu (Arai et al) in v 1e promotorju Cdx2 (Fang et al., 2001 in Yamamoto et al., 1999). Dokazani so veliki medsebojni vplivi med polimorfizmi v promotorju, kodirajoči in 3' UTR regiji gena za VDR<sup>48,54</sup>.

Trije najpomembnejši polimorfizmi v genu za VDR so: BsmI- polimorfizem (E8-G+284A, rs 1544410), FokI- polimorfizem (E2-C4T, rs 10735810) in Cdx2-polimorfizem (1e-G-1739A, rs 11568820). (Slika 9)



Slika 9: Pozicije polimorfizmov gena za VDR.<sup>55</sup>

#### **BsmI- polimorfizem (E8-G+284A, rs 1544410)**

Morrison s sodelavci je leta 1994 na osnovi raziskav dvojčkov in populacij objavil signifikantne povezave med polimorfizmi 3' UTR regije gena za VDR in BMD. Povzel je, da polimorfizmi v 3' UTR regiji nakazujejo značilne razlike v transkripciji gena. Na intronu 8 je bila odkrita tranzicija G→A, ki so jo imenovali polimorfizem BsmI in je kazalec za druge različice v sekvenci te regije, kar vpliva na stabilnost RNA<sup>58</sup>. Prišel je do zaključkov, da je vrednost BMD več kot 75 % odvisna od genetskih faktorjev in je nižja vrednost povezana z alelom B. Dokazal je povezavo BsmI s kostnim preobratom, ki se izraža s koncentracijo osteokalcina v serumu, ki je bistveno večja pri genotipu BB glede na bb<sup>44</sup>. Mnoge nadaljnje študije so to potrdile ali celo ovrgle. Ferrari s sodelavci in Krall s sodelavci so leta 1995 našli povezavo med BMD in vnosom kalcija. Leta 1997 je Graafmans s sodelavci dokazal povezavo med BMD in vnosom vitamina D.

Dawson-Hughes s sodelavci, leta 1995 in Gennari s sodelavci, leta 1997 sta dokazala, da je vnos kalcija v intestinum odvisen od BsmI polimorfizma.<sup>56</sup> Študije dokazujejo povezavo

haplotipov BsmI-ApaI-TaqI z BMD<sup>58</sup> in potrjujejo vpliv BsmI polimorfizma na BMD, vendar z majhnim učinkom<sup>44</sup>.

### **FokI – polimorfizem (E2-C4T, rs 10735810)**

Arai s sodelavci, leta 1997 in Gross s sodelavci, leta 1998 so dokazali polimorfizem FokI, kot prehod timidin/citozin T/C, ki se nahaja v eksonu 2, gena za VDR. Tranzicija T/C povzroči nastanek alternativnega začetnega kodona ATG → ACG, ki se kaže kot krajša izoforma proteina VDR. Ta polimorfizem zaznamo z analizo RFLP, z uporabo endonukleaze Fok I. Daljša različica proteina VDR (M1) s T alelom ima metionin na prvi poziciji in za tri amino kisline daljši protein. Krajša različica proteina VDR (M4) s C alelom, ima metionin na četrti poziciji. Študije so pokazale, da je daljša oblika manj učinkovita.<sup>45</sup>

Fok I polimorfizem je povezan z BMD v študijah Arai et al.1997, Gross s sodelavci 1997, Harris s sodelavci 1997. V drugih študijah, kot so Eccleshall s sodelavci 1998, Lucotte s sodelavci 1999, Sowers s sodelavci, 1999, niso našli povezav z BMD. Povezavo s kalcijem so dokazali v študiji Ames s sodelavci, 1999, vendar dve drugi študiji tega nista potrdili: Cauley s sodelavci 1999 in Zmuda s sodelavci 1999. Študija Arai s sodelavci 1997 je potrdila vpliv polimorfizma na aktivnost luciferaze. Gross je s sodelavci, 1998 dokazal povezanost FokI z gensko regulacijo kostne mase, ki je povezana z absorpcijo kalcija v črevesju in vnosa kalcija in vitamina D v telo.<sup>56</sup> Abrams je dokazal povezavo polimorfizma Fok I z absorpcijo kalcija v intestinumu.<sup>107</sup>

### **Cdx2 – polimorfizem (1e-G-1739A, rs 11568820)**

Leta 2001 je Arai s sodelavci pri raziskavi Japonskih žensk dokazal substitucijo G z A v promotorju 1a gena za VDR. Yamamoto s sodelavci je dokazal povezanost s specifičnim transkripcijskim faktorjem v črevesju in ga poimenoval Cdx2 polimorfizem.<sup>45</sup>

Cdx 2 alel se v največji meri izraža v intestinumu. Molekulski mehanizmi povezani z aleli Cdx 2 vodijo v znižano izražanje mRNA VDR. Geni v 3' UTR regiji regulirajo ekspresijo genov preko stabilnosti mRNA in povzročijo manjše izražanje VDR v intestinumu.<sup>58</sup>

Alel A poveča transkripcijsko aktivnost promotorja VDR, ker se bolj učinkovito veže na Cdx2 protein, ki ima kot transkripcijski faktor pomembno vlogo pri transkripciji v črevesju, ker lahko posreduje transkripcijo gena VDR preko cis elementa v 1e regiji promotorja gena za VDR in tako vpliva na izražanje VDR v intestinumu. Genotipa AA in GA v celicah intestinuma vodita v povečano koncentracijo VDR, kar vpliva na vitamina D, ki preko kalcijevih kanalov in kalcijevih transportnih proteinov vpliva na absorpcijo kalcija in vodi v povečanje BMD in zmanjšano verjetnost za zlome. Na manjši skupini japonskih žensk v pomenopavzi so dokazali povezanost alela A z višjo vrednostjo BMD na lumbalnem delu hrbtenice.<sup>58</sup>

Polimorfizem, ki ni funkcionalen služi kot kazalec v povezavi z boleznijo.

Alel je funkcionalen, če je povezan z markerskim alelom, ki se nahaja kjerkoli, vendar vedno v bližini določenega gena. Vezano dedovanje markerskega alela in funkcionalnega alela je odvisno od LD obeh alelov. Interakcije med različnimi geni in/ali dejavniki okolja so poglobitnega pomena v delovanju transkripcijskega faktorja steroidnega hormona 1,25 dihidroksivitamin D<sub>3</sub>. Koncentracije 1,25 dihidroksivitamin D<sub>3</sub> v serumu zaradi pomanjkanja kalcija, ki je posledica premajhnega vnosa s hrano se razlikuje med populacijami.<sup>45</sup>

## 2. NAMEN DELA

Raziskave na dvojčkih in družinah z osteoporozo so potrdile genetske vplive na razvoj osteoporoze. Danes še ne poznamo genov, ki so zaradi poligenske narave osteoporoze vpleteni v njen razvoj. Vitamin D ima pomembno vlogo v kostni presnovi in regulaciji  $Ca^{++}$ , zato je bil eden prvih kandidatnih genov, ki so jih raziskovali na tem področju, vendar končnih zaključkov še ni.

Predpostavljamo, da kombinacija polimorfizmov v genu za VDR lahko značilno vpliva na BMD in s tem na razvoj osteoporoze.

Zato želimo z našo raziskavo ugotoviti povezanost BMD in koncentracijo biokemijskih kazalcev kostne premene s tremi najpomembnejšimi polimorfizmi v genu za VDR: *BsmI*-polimorfizem (E8-G+284A, rs1544410), *FokI*-polimorfizem (E2-C4T, rs10735810) in *Cdx2*-polimorfizem (1e-G-1739A, rs11568820).

V ta namen bomo analizirali DNA 625 preiskovancev. Najprej bomo razvili novo metodo genotipizacije za polimorfizem *Cdx2* in nato določili genotip za SNP.

Vsakemu preiskovancu bomo določili genotip na treh polimorfnihih mestih ter določili haplotip. Ugotovili bomo njihovo frekvenco, ter proučili povezanost z razvojem osteoporoze v slovenski populaciji. V raziskavo bomo vključili 508 preiskovank in 117 preiskovancev.

Rezultate bomo analizirali s statističnimi testi: ANOVA, ANCOVA in Kruskal – Wallis. Skušali bomo ugotoviti povezanost polimorfizmov: *BsmI*, *FokI* in *Cdx2* z BMD in biokemijskimi kazalci tvorbe kosti: kostna specifična alkalna fosfataza (BALP), osteokalcin (OC) in biokemijske kazalce razgradnje kosti: C-terminalni telopeptid (CTx), katepsin K. Biokemični kazalci bodo določeni z rutinskimi metodami v diagnostičnih laboratorijih.

Z našimi rezultati bomo prispevali k odkritju klinično pomembnih kombinacij genskih polimorfizmov, ki so z medsebojnimi vplivi lahko z majhnimi učinki povezani z razvojem osteoporoze. Te bi lahko v bodoče uporabljali kot genetične kazalce za odkrivanje oseb s povečanim tveganjem za osteoporozo.

## **3.0 PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE**

### **3.1. OPIS PREISKOVANCEV**

V raziskavo smo vključili 625 preiskovank in preiskovancev, ki smo jih razdelili v štiri skupine:

- 57 preiskovank v premenopavzi,
- 230 bolnic s pomenopavzno osteoporozo,
- 221 zdravih preiskovank v pomenopavzi in
- 117 moških preiskovancev.

Vsi preiskovanci so bili klinično pregledani, imeli so opravljene biokemične in genske analize. S tem smo izključili preiskovance s sekundarno osteoporozo in tiste, ki so imeli prisotna morebitna druga patološka stanja.

Vsem preiskovancem je bila izmerjena mineralna kostna gostota (BMD), ker smo fenotip obolelosti za osteoporozo ocenjevali na osnovi izmerjene mineralne kostne gostote.

Vsem preiskovancem je bila odvzeta periferna venska kri in so bili izmerjeni biokemijski kazalci kostne izgradnje in razgradnje.

### **3.2. MERJENJE BIOKEMIJSKIH KAZALCEV**

Biokemijski kazalci tvorbe kosti so bili določeni z rutinskimi metodami v diagnostičnih laboratorijih.

Kostna specifična alkalna fosfataza (BALP) in katepsin K sta bila določena z encimskimi imunskimi testi (ELISA, Biomedica GmbH). Biokemični kazalec kvantitativno določimo tako, da monoklonalno telo reagira z biokemičnim kazalcem v vzorcu preiskovanca, nato encim, konjugiran s protitelesom reagira z brezbarvnim substratom, pri tem nastane obarvan produkt. Neznano koncentracijo v vzorcu razberemo iz umeritvene krivulje, ki temelji na znanih koncentracijah substance, ki jo določamo.<sup>57</sup>

Osteokalcin (OC) in C-terminalni telopeptid (CTX) sta bila določena z elektro kemiluminiscentno imunsko analizo (ECLIA, Elecysis Roche). Sendvič kompleks se tvori tako, da specifično biotinizirano rekombinantno protitelo, ki je specifično za biokemijski kazalec, inkubiramo z neznano koncentracijo biokemijskega kazalca, ki se ob dodatku s streptavidinom prekritih mikrodlecev poveže s specifičnim rekombinantnim protitelesom, ki je označeno z rutenijem. Reakcijska mešanica se vnese v merilno celico, kjer napetost na elektrodi inducira kemiluminiscentno sevanje, ki ga izmeri fotomultiplikator. Rezultati se določijo s kalibracijsko krivuljo.<sup>43</sup>

### **3.3. MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE**

Mineralna kostna gostota je bila izmerjena z neinvazivno metodo, dvo-rentgenske absorpcimetrije (angl. Dual Energy X-ray Absorptiometry, DEXA), na treh predelih skeleta: na vratu stegenice (BMD-fn), kolku (BMD-tot) in ledvenih vretencih (BMD-ls).

### 3.4. IZOLACIJA DNA

DNA je bila izolirana iz levkocitov periferne venske krvi (antikoagulant EDTA) s postopkom izsoljevanja proteinov po Müllerju.

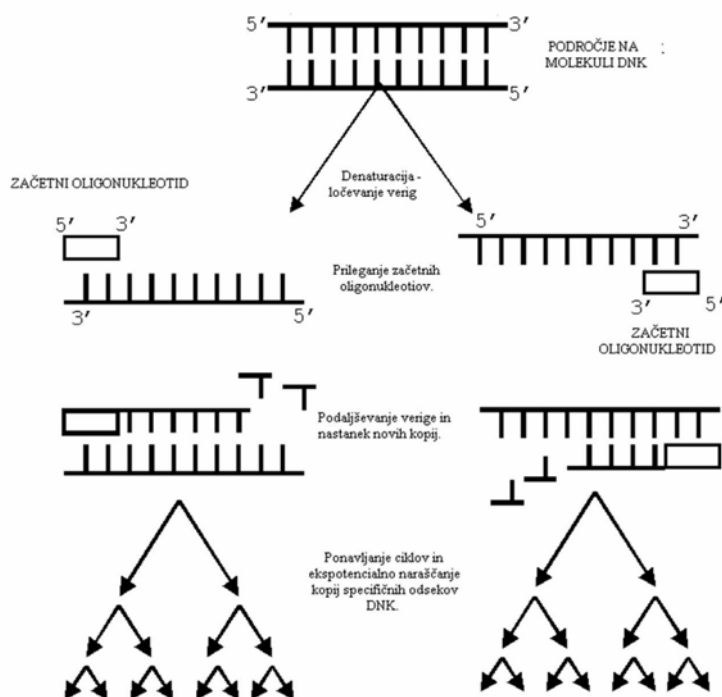
### 3.5. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR, ang. Polymerase Chain Reaction) je odkril Kary Mullis leta 1985 in zanjo leta 1993 dobil Nobelovo nagrado za kemijo.

PCR je metoda, s katero lahko pomnožimo posamezne odseke DNA, za katere poznamo robni zaporedji nukleotidov. Potrebujemo 16-24 nukleotidov dolga oligonukleotidna začetnika (ang. oligonucleotide primers), ki sta komplementarna zaporedju odseka DNA, na katerega se prilegata. Prvi nukleotidni začetnik se v smeri  $5' \rightarrow 3'$  prilega - verigi DNA na koncu odseka, ki ga želimo pomnožiti, drugi se v smeri  $5' \rightarrow 3'$  prilega +verigi DNA na nasprotnem koncu odseka, ki ga želimo pomnožiti. V reakcijsko raztopino damo manjšo količino DNA, velik prebitek obeh nukleotidnih začetnikov in deoksinukleotidov: dATP, dGTP, dCTP in dTTP, ki so gradbeni elementi pri sintezi DNA ter temperaturno stabilen encim Taq-polimerazo. To je encim, ki kot vsaka polimeraza na eno verižni matrični DNA v smeri  $5' \rightarrow 3'$  izgradi komplementarno (drugo) verigo DNA. Končni produkt reakcije PCR je novi (dvovijačni) odsek molekule DNA. Od ostalih polimeraz se razlikuje po stabilnosti pri visokih temperaturah.

Reakcija poteka v treh stopnjah. Prva stopnja imenovana denaturacija poteka pri  $95^\circ\text{C}$ , s katero razklenemo dvojno verigo DNA. V drugi stopnji, ki jo imenujemo naleganje začetnikov, hitro znižamo temperaturo na  $37\text{-}55^\circ\text{C}$ , da se oba oligonukleotidna začetnika priležeta. V tretji fazi imenovani podaljševanje, hitro dvignemo temperaturo na  $72^\circ\text{C}$ , ki je optimalna za delovanje encima Taq-polimeraze. Vse tri stopnje se ponovijo 25-40 krat, pri tem se število tarčnih kopij DNA podvoji z vsakim ciklom, torej n-ciklov PCR vodi v  $2^n$  kopij tarčnih odsekov DNA (Slika 10).

Prednosti metode PCR so: občutljivost, ker potrebujemo zelo majhne količine DNA, ni potrebno radioaktivnega označevanja kemikalij, je hitra in enostavna.<sup>60,61</sup>




Slika 10: Shematični prikaz verižne reakcije s polimerazo.<sup>159</sup>



Pomnoževanje odsekov smo izvedli v seriji 30 vzorcev. Za pomnožitev vsake serije in slepega vzorca, smo pripravili skupno reakcijsko zmes, v skupni epruveti 31-kratne količine. Sestavine smo dodajali v enakem vrstnem redu, kot je navedeno v Preglednici VII, razen vzorčne DNA. V označene epruvete smo odpipetirali po 19  $\mu\text{L}$  reakcijske zmesi. Nato smo v vsako epruveto dodali 1  $\mu\text{L}$  vzorčne DNA. V slepi vzorec smo namesto vzorčne DNA odpipetirali enako količino ultra čiste vode.

Epruvete z reakcijskimi zmesmi smo prenesli v ciklični termostat. Pomnoževanje je potekalo pri specifičnih pogojih za določen odsek 1-e na promotorju gena VDR in so opisani v Preglednici VIII.

*Preglednica VIII: Optimalni pogoji v cikličnem termostatu za pomnoževanje odseka 1-e na promotorju gena VDR.*

STOPNJE PCR REAKCIJE (RANKL PR 3; Primus 96 plus, MWG-BIOTECH AG)		TEMPERATURA (°C)	ČAS
1.	Začetna denaturacija	95	10 min
2.	Denaturacija Prileganje Podaljševanje	95 58 72	45 s 20 s 45 s  40 ciklov
3.	Končno podaljševanje	72	7 min
4.	Prekiniev	8	$\infty$

Po končani reakciji smo epruvete s produkti PCR hladilnik pri temperaturi 3-8 °C. nato smo preverili njihovo količino in kvaliteto.

#### **Materiali in reagenti za PCR reakcijo:**

- delovna raztopina DNA
- 10 x PCR Gold pufer, Proomega
- dNTP (2 mmol/L): dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems, Perkin Elmer)
- $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L)
- ultra čista voda (bidestilirana, avtoklavirana, pripravljena z aparatom ELGA PURELAB Classic)
- Ampli Taq Gold polimeraza (5U/  $\mu\text{L}$ ) (Applied Biosystems, Perkin Elmer)
- začetni oligonukleotid Cdx 2-F: 5' - ACTGCAGCCTTGACCTCCTA - 3'
- začetni oligonukleotid Cdx 2-R: 5' - AAAGCAAACCAAGGGGTCTT - 3'
- bidestilirana, avtoklavirana ultračista voda



### 3.5.2. OCENJEVANJE USPEŠNOSTI REAKCIJE PCR Z ELEKTROFOREZO NA AGARONEM GELU

Elektroforeza je metoda za ločevanje komponent v določeni zmesi. Pri elektroforezi se komponente porazdelijo na osnovi pozitivnih in negativnih delcev v električnem polju. Zaradi električnega polja potujejo negativno nabiti odseki DNA proti pozitivno nabiti anodi. Ločenje dosežemo na osnovi različnega naboja. Tako dobimo posamezne elektroforetske frakcije v različni oddaljenosti in smeri od izhodišča.

Uspešnost reakcije PCR smo preverili z elektroforezno ločbo na 2 % agaroznem gelu (Preglednica IX), katerih produkte smo posneli z UV dokumentacijskim sistemom ( $\lambda = 302$  nm).

Za pripravo 2 % agaroznega gela in potek elektroforeze smo uporabili enake metode in tehnike dela. Spremenili smo le čas poteka elektroforeze pri napetosti 90 V.

Po končani elektroforezi smo ločene PCR produkte posneli z UV transluminatorjem ( $\lambda = 302$  nm).

*Preglednica IX: Pogoji, sestavine in količine za pripravo 2 % agaroznega gela za oceno PCR.*

SESTAVINE	KOLIČINA	NAPETOST	ČAS
Agaroz za PCR	1,5 g	100 V	30 min.
1 x TAE pufer	75 mL		
ET-Br (10 mg/mL)	4 $\mu$ L		

Gel smo pripravili na malem nosilcu (20cm X 15cm X 0,5cm) z dvema glavničkoma, tako smo dobili 60 žepkov. V erlenmajerici smo natehtali agarozo, z merilnim valjem smo odmerili pufer, ki smo ga nato dodali agarozni. Nato smo pritisnili tipko tare. Zmes smo dobro premešali, erlenmajerico pokrili z urnim steklom in zmes segrevali v mikrovalovni pečici. Zmes smo med segrevanjem večkrat premešali. Ko je nastala bistra tekočina smo dodali manjkajočo izparelo vodo, tako, da je tehtnica kazala skupno maso 0. Nato smo zmes ohlajali cca. 15 min. Ohlajeni raztopin smo v digestoriju dodali 4  $\mu$ L ET-Br. Pripravljeno raztopino smo vlili v veliki nosilec s pripravljenima glavničkoma in počakali, da se je zmes ohladila cca 30 min. Odvečni gel smo hranili v hladilniku pri +4°C.

#### **Priprava delovne raztopine tris – acetat - EDTA (TAE) pufra**

Delovno raztopino smo pripravili iz osnovne raztopine TAE pufra (50-kratni koncentrat), ki je bila pripravljena iz 242 g TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-1,3 propandiol) baze, 57,1 ml očetne kisline in 100 ml 0,5 M EDTA. V 20 ml osnovne raztopine smo dodali 800 ml vode in dobili 1 x TAE pufer oz. delovno raztopino.

#### **Izvedba elektroforeze**

Produkte PCR smo po končani reakciji PCR centrifugirali cca 1 min pri 12000 obratih. V elektroforezno kadičko, napolnjeno z 1 x TAE pufrom, smo horizontalno položili 2 % agarozni gel. Na parafilm smo nanесли kapljice (2  $\mu$ L) pufra, ki vsebuje barvilo ksilencianol. Nato smo kapljici dodali 2  $\mu$ L produkta PCR in vse skupaj nanесли v žepok na gelu.

V prvi žepok smo nanесли označevalec dolžin odsekov DNA, v sledeče žepke smo nanašali produkte PCR, v zadnji žepok smo nanесли slepi vzorec.

Po ločbi smo posamezne elektroforetske frakcije, kot produkta PCR posneli z UV dokumentacijskim sistemom ( $\lambda = 302$  nm). Zaradi prisotnosti ET-Br, ki se je vgradil med bazne pare dvoverižne DNA, lahko DNA fluorescira v oranžnem delu spektra.

**Materiali in reagenti:**

- agarozna za PCR (Sigma)
- osnovna raztopina TAE pufru (50-kratni koncentrat)
- etidijev bromid (10 mg/  $\mu\text{L}$ , Sigma)
- nanašalni pufer, ki vsebuje barvilo ksilencianol (Fluka)
- očetna kislina (1 mol/L, Carbo Erba)
- TRIS base (2 mol/L, Fluka)
- očetna kislina (1 mol/L, Carbo Erba)
- EDTA (0,5 mol/L, Fluka)
- označevalec dolžin DNA odsekov (50-1000 bp, PCR Marker Promega G 316 A)

**Aparature in delovni pribor**

- elektronska tehtnica Exacta 300 EB (Tehtnica Železniki)
- nosilec za vlivanje gela
- glavnički
- erlenmajerica 200 mL
- merilni valj 100 ml
- urno steklo
- steklena palčka
- mikrovalovna pečica Optiquick Compact Y52, Moulinex
- centrifuga Mikro-242 (Tehtnica, Železniki)
- elektroforezna kadička (BioRad ali Sigma Aldrich)
- vir napetosti POWER PAC 300 (BioRad)
- PCR pomnoževalnik, PRIMUS 96 plus, MWG-BIOTECH AG.
- UV transluminator ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ , Vilber Lourmat)

**3.5.3. HKRATNA REAKCIJA VERIŽNEGA POMNOŽEVANJA ODSEKOV EKSONA 2 IN INTRONA 8 GENA VDR**

Hkratna verižna reakcija s polimerazo (Multiplex PCR, ang. Multiplex Polymerase Chain Reaction) je vrsta reakcije PCR, pri kateri hkrati pomnožujemo dva ali več odsekov DNA v isti reakcijski zmesi.

S hkratno verižno reakcijo s polimerazo smo istočasno pomnožili odsek dolžine 461 bp na intronu 8, ki vsebuje polimorfizem in odsek dolžine 266 bp na eksonu 2, ki vsebuje polimorfizem FokI.

Nukleotidne začetnike za PCR smo oblikovali z uporabo Primer3 programa, ki je prosto dostopen na svetovnem spletu ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) in uporabo referenčnih identifikacijskih števil polimorfizmov: rs 10735810, rs 1544410 in rs 11568820.

**GGCAACCTGAAGGGAGACGTA** zaporedje levega začetnika z oznako VDR-8IB-F in zaporedje desnega začetnika **CTCTTTGGACCTCATCACCGAC** z oznako VDR-8IB-R.

**AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT** zaporedje levega začetnika z oznako VDR-2-F in zaporedje desnega začetnika **ATGGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC** z oznako VDR-2-R.

**Priprava delovne raztopine začetnih oligonukleotidov VDR-8IB-F in VDR-8IB-R.**

Obe delovni raztopini smo pripravili na enak način. Osnovna raztopina je imela koncentracijo 100 pmol/ $\mu\text{L}$  (MWG Biotech), ki smo jo redčili v razmerju 1:20 tako, da smo zmešali 10  $\mu\text{L}$

osnovne raztopine in 190  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode. Končna koncentracija delovne raztopine je bila 5 pmol/ $\mu\text{L}$ .

#### **Priprava delovne raztopine začetnih oligonukleotidov VDR-2-F in VDR-2-R**

Delovno raztopino VDR-2-F smo pripravili tako, da smo k 6  $\mu\text{L}$  osnovne raztopine VDR-2-F (200 pmol/ $\mu\text{L}$ , MWG Biotech) dodali 150  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode. Nato smo nastalo raztopino dodatno razredčili v razmerju 1:2, tako, da smo k 80  $\mu\text{L}$  delovne raztopine VDR-2-F dodali 80  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode. Končna koncentracija delovne raztopine VDR-2-F je bila 3,8 pmol/ $\mu\text{L}$ .

Delovno raztopino VDR-2-R smo pripravili tako, da smo k 15  $\mu\text{L}$  osnovne raztopine VDR-2-R (100 pmol/ $\mu\text{L}$ , MWG, Biotech) dodali 135  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode. Nastalo raztopino smo dodatno razredčili v razmerju 1:3 tako, da smo k 50  $\mu\text{L}$  delovne raztopine VDR-2-R dodali 100  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode. Končna koncentracija delovne raztopine VDR-2-R je bila 3,3 pmol/ $\mu\text{L}$ .


*Preglednica X: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje odsekov eksona 2 in introna 8 gena VDR.*

SESTAVINE	VOLUMEN $\mu\text{L}$	KONCENTRACIJA V KONČNI ZMESI
10x Gold pufer	2,0	1 x Gold pufer, Tris-HCl (10mM), KCl (50 mM)
dNTP (2 mmol/L)	3,0	0,3 mmol/L
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	1,6	2,0 mmol/L
VDR-8IB-F (5 $\mu\text{mol/L}$ )	0,5	0,125 $\mu\text{mol/L}$
VDR-8IB-R (5 $\mu\text{mol/L}$ )	0,5	0,125 $\mu\text{mol/L}$
VDR-2-F (3,8 $\mu\text{mol/L}$ )	1,2	0,16 $\mu\text{mol/L}$
VDR-2-R (3,3 $\mu\text{mol/L}$ )	0,8	0,13 $\mu\text{mol/L}$
Ampli Taq Gold polimeraza (5U/ $\mu\text{L}$ )	0,2	0,05 U/ $\mu\text{L}$
Ultra čista voda	9,2	
DNA (0,05 g/L)	1,0	0,002 g/L
Skupni volumen zmesi enega vzorca	20 $\mu\text{L}$	

Za pomnožitev vsake serije 19 vzorcev in slepi vzorec smo pripravili skupno reakcijsko zmes, v skupni epruveti 20-kratne količine. Sestavine smo dodajali v enakem vrstnem redu, kot je navedeno v preglednici X, razen vzorčne DNA. V označene epruvete smo odpipetirali po 19  $\mu\text{L}$  reakcijske zmesi. Nato smo v vsako epruveto dodali 1  $\mu\text{L}$  vzorčne DNA, ki smo jo pripravili iz osnovne raztopine, ki smo jo razredčili v razmerju 1:10; k 2 $\mu\text{L}$  raztopine izolirane DNA smo dodali 18  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode. V slepi vzorec smo namesto vzorčne DNA odpipetirali enako količino ultra čiste vode.

Epruvete z reakcijskimi zmesmi smo prenesli v ciklični termostat. Hkratno pomnoževanje odseka eksona 2 in introna 8 gena VDR je potekalo pri optimiziranih pogojih za oba odseka, ki so opisani v preglednici XI.

Preglednica XI: Pogoji za pomnoževanje odsekov eksona 2 in introna 8 gena VDR.

STOPNJE PCR REAKCIJE		TEMPERATURA (°C)	ČAS
1.	Začetna denaturacija	95	12 min
2.	Denaturacija	94	30 s
	Prileganje	56	45 s
	Podaljševanje	72	30 s
			 40 ciklov
3.	Končno podaljševanje	72	8 min
4.	Prekiniev	8	∞

Uspešnost reakcije PCR smo preverili z elektroforezno ločbo na 2 % agaroznem gelu, katerih produkte smo posneli z UV transluminatorjem ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ).

## PCR

### Materiali in reagenti:

- delovna raztopina DNA
- 10 x PCR Gold pufer, Proomega
- dNTP (2 mmol/L): dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems, Perkin Elmer)
- $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L)
- ultra čista voda (bidestilirana, avtoklavirana, pripravljena z aparatom ELGA PURELAB Classic)
- Ampli Taq Gold polimeraza (5U/  $\mu\text{L}$ ) (Applied Biosystems, Perkin Elmer)
- začetni oligonukleotid VDR-2F: 5' - AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT - 3'
- začetni oligonukleotid VDR-2R: 5' - ATGGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC - 3'
- začetni oligonukleotid VDR-8IB-F: 5' - GGCAACCTGAAGGGAGACGTA - 3'
- začetni oligonukleotid VDR-8IB-R: 5' - CTCTTTGGACCTCATCACCGAC - 3'
- bidestilirana, avtoklavirana ultračista voda

### Aparature in delovni pribor

- avtoklav a-21, Kambič, Laboratorijska oprema
- sušilnik ST-01/02, instrumentaria
- Ciklični termostat, Biometra, Personal Cycler
- centrifuga CENTRIC 150 (Tehtnica, Železniki)
- komora za PCR z UV lučko
- polavtomatske pipete (Eppendorf)
- avtoklavirani nastavki za pipete
- 0,5 in 1,5 mL avtoklavirane epruvete za enkratno uporabo (Eppendorf)
- Stojala za epruvete

### Ocena produktov PCR z elektroforezo

Uspešnost reakcije PCR smo preverili z elektroforezno ločbo na 2 % agaroznem gelu, katerih produkte smo posneli z UV dokumentacijskim sistemom ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ).

Za pripravo 2 % agaroznega gela in potek elektroforeze smo uporabili enake metode in tehnike dela kot pri elektroforezi za detekcijo produktov PCR, pri pomnoževanju 1-e odseka na promotorju gena za VDR. Spremenili smo le čas poteka elektroforeze na 20 min. pri napetosti 90 V. (Preglednica VIII, str.24 ) Po končani elektroforezi smo ločene produkte PCR posneli z UV transluminatorjem ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ).

### 3.6. ANALIZA POLIMORFIZMOV DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH ODSEKOV DNA

Pri analizi uporabimo restrikcijske encime, ki cepijo predhodno namnožene odseke DNA ob točno določenem zaporedju. Če se zaporedje, ki ga prepoznava endonukleaza spremeni samo za en nukleotid, encim mesta ne prepozna in do cepitve ne pride. Kombinacija nastalih odsekov različnih dolžin je značilna za posameznika, razen pri enojajčnih dvojčkih, ki imajo identično DNA. Nastale odseke restrikcije ločimo z elektroforezo na poliakrilamidnem ali agaroznem gelu. Z elektroforezo na agaroznem gelu lahko dobro ločujemo odseke DNA velike od približno 50 bp do nekaj deset tisoč baznih parov. Po elektroforezi ugotovimo velikost odsekov vzorca DNA s primerjavo hitrosti potovanja odsekov vzorcev in linearnega DNA velikostnega standarda. Na osnovi prisotnosti specifičnih odsekov lahko odkrivamo spremembe v zaporedju nukleotidov, zato lahko govorimo o polimorfizmu dolžin restrikcijskih odsekov oz. RFLP.

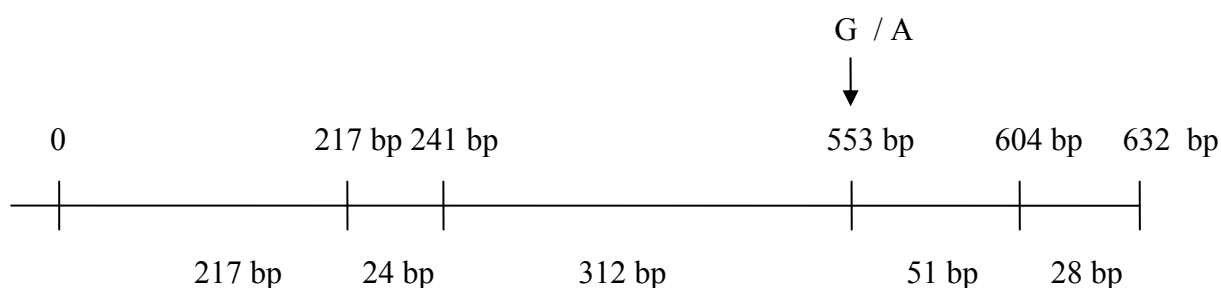
#### 3.6.1. HpyCH4III – RFLP ANALIZA ZA GENOTIPIZACIJO POLIMORFIZMA Cdx2

632 bp velike produkte PCR smo analizirali glede na prisotnost polimorfizma Cdx 2, z metodo restrikcije odsekov DNA z encimom HpyCH4III. To je encim, ki prepozna naslednje zaporedje nukleotidov:



Na označenih mestih encim HpyCH4III cepi fosfodiesterske vezi. Na mestu N je lahko katerikoli nukleotid.

Polimorfizem Cdx 2 na promotorju gena VDR, je substitucija guanin/adenin - G/A. Pomnožene odseke, dolžine 632 bp encim HpyCH4III cepi na štirih mestih, tako, da dobimo lahko odseke v velikosti: 217 bp, 24 bp, 312 bp, 52 bp in 28 bp. Pri analizi smo spremljali odseke z dolžino: 217 bp, 312 bp in 363 bp (Slika 12).



Dolžine odsekov po cepitvi.

*Slika 12: Mesta, kjer encim HpyCH4III cepi odsek dolžine 632 bp na 1-e promotorju gena VDR.*

Če encim zaradi substitucije G/A, ne prepozna restrikcijskega mesta, nastaneta odseka v dolžini 217 bp in 363 bp. Če substitucije G/A ni, encim HpyCH4III cepi na označenem mestu, zato dobimo odseka dolžine 217 bp in 312 bp. (Slika 12) Prisotnost restrikcijskega mesta označimo z A, odsotnost restrikcijskega mesta pa z G. V primeru heterozigota nastanejo odseki dolžine: 217 bp, 312 bp in 363 bp.

Reakcijsko zmes smo pripravili z dodajanjem posameznih sestavin v enakem vrstnem redu, kot v Preglednici XII, razen produkta PCR. Nato smo pripravili in označili epruvete, v katere smo odpipetirali 5  $\mu\text{L}$  dobro premešane reakcijske zmesi. Nato smo v vsako epruveto dodali še 5  $\mu\text{L}$  produkta PCR. Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali in inkubirali 12 ur v vodni kopeli pri 65°C.

*Preglednica XII: Priprava restriksijske zmesi encima HpyCH4III za analizo RFLP.*

SESTAVINE	VOLUMEN ENEGA VZORCA $\mu\text{L}$
Pufer 10x NEB4	1,5
Ultra čista voda	7,0
Encim HYP CH4 III (5 U/ ml)	0,5
PCR produkt	6,0
VOLUMEN ZMESI	15,0

### Ocena produktov restrikcije z elektroforezo

*Preglednica XIII: Pogoji, sestavine in količine za pripravo 4 % agaroznega gela za oceno produktov RFLP.*

SESTAVINE	KOLIČINA	NAPETOST	ČAS
Agaroz za RFLP	3,0 g	90 V	45 min.
1 x TAE pufer	75 mL		
ET-Br (10 mg/mL)	5 $\mu\text{L}$		

Gel smo pripravili na malem nosilcu (20cm X 15cm X 0,5cm) z dvema glavničkoma, tako smo dobili 20 žepkov.

Uporabili smo sestavine iz preglednice XIII, postopek priprave pa je potekal tako kot pri pripravi agaroznega gela za elektroforezo RFLP odsekov DNA za polimorfizma Fok I in Bsm I. Elektroforeza je potekala 45 min. pri napetosti 90 V.

Produkte restrikcije smo po končani reakciji centrifugirali 1 min pri 12000 obratih. V elektroforezno kadičko, napolnjeno z 1 x TAE pufrom, smo horizontalno položila 4% agarozni gel. Na parafilm smo nanesti kapljice (3  $\mu\text{L}$ ) pufera, ki vsebuje barvilo brom fenil modro. Nato smo kapljici dodali 10  $\mu\text{L}$  RFLP produkta in vse skupaj nanesti v žep na gelu.

V prvi žep smo nanesti označevalec dolžin odsekov DNA, v sledeče žepke smo nanašali produkte PCR, v zadnji žep smo nanesti produkt PCR, ki ni bil izpostavljen restrikciji.

Po končani elektroforezi smo ločene produkte restrikcije posnela z UV transluminatorjem ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) in določila haplotipe.

### Materiali, reagenti, aparature in delovni pribor za oceno produktov restrikcije z elektroforezo za polimorfizem Cdx 2:

- agarozna za RFLP (Sigma)
- osnovna raztopina TAE pufra (50-kratni koncentrat)
- etidijev bromid (10 mg/  $\mu\text{L}$ , Sigma)
- nanašalni pufer, ki vsebuje barvilo fenil modro (Fluka)
- očetna kislina (1 mol/L, Carbo Erba)
- TRIS base (2 mol/L, Fluka)
- očetna kislina (1 mol/L, Carbo Erba)
- EDTA (0,5 mol/L, Fluka)
- označevalec dolžin DNA odsekov (50-1000 bp, PCR Marker Promega G 316 A)
- Pufer 10x NEB2 (BioLabs, New England)
- Encim HpyCH4III (5 U/ ml) (BioLabs)
- Avtoklavirana ultra čista voda

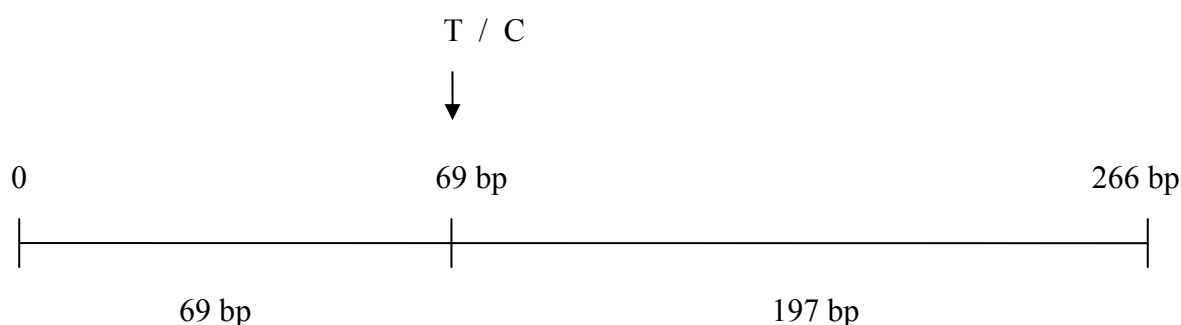
#### 3.6.2. Fok I – RFLP ANALIZA ZA GENOTIPIZACIJO POLIMORFIZMA Fok I

Polimorfizem Fok I smo analizirali na osnovi pomnoženih, 266 bp velikih odsekov DNA s PCR, z metodo restrikcije odsekov DNA z encimom Fok I. To je encim, ki prepozna naslednje zaporedje nukleotidov:



Na označenih mestih encim Fok I cepi fosfodiesterske vezi. Na mestu N je lahko katerikoli nukleotid

Polimorfizem FokI, kot tranzicija timidin/citozin - T/C, povzroči spremembo alternativnega začetnega kodona ATG v ACG, zato encim Fok I ne prepozna restrikcijskega mesta in odseka odseka eksona 2 gena VDR ne cepi, torej ostane odsek velik 266 bp. Če pa tranzicije ni, encim Fok I cepi na označenem mestu, zato dobimo dva odseka z dolžino 197 bp in 69 bp (Slika 13). Prisotnost restrikcijskega mesta označimo s f, odsotnost restrikcijskega mesta pa s F.



Dolžine odsekov po cepitvi.

Slika 13: Mesta, kjer encim Fok I cepi odsek dolžine 266 bp na eksonu 2 gena VDR.

Reakcijsko zmes smo pripravili z dodajanjem posameznih sestavin v enakem vrstnem redu, kot v Preglednici XIV, razen produkta PCR. Nato smo pripravili in označili epruvete, v katere smo odpipetirali 6  $\mu\text{L}$  dobro premešane reakcijske zmesi. Nato smo v vsako epruveto dodali še 6  $\mu\text{L}$  produkta PCR. Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali in inkubirali 12 ur v vodni kopeli pri 37°C.

*Preglednica XIV: Priprava restriksijske zmesi encima Fok I za analizo RFLP.*

SESTAVINE	VOLUMEN ENEGA VZORCA $\mu\text{L}$
Pufer 10x NEB4	1,2
Ultra čista voda	4,4
Encim za Fok I (4 U/ $\mu\text{L}$ )	0,4
PCR produkt	6,0
VOLUMEN ZMESI	12,0

### Ocena produktov restrikcije z elektroforezo

Produkte restrikcije smo po končani reakciji centrifugirali 1 min pri 12000 obratih. V elektroforezno kadičko, napolnjeno z 1 x TAE pufrom, smo horizontalno položili 4 % agarozni gel (st. 29). Na parafilm smo nanesti kapljice (3  $\mu\text{L}$ ) pufrja, ki vsebuje barvilo blue orange. Nato smo kapljici dodali 12  $\mu\text{L}$  produkta RFLP in vse skupaj nanesti v žepček na gelu.

V prvi žepček smo nanesti označevalec dolžin DNA odsekov, v sledeče žepčke smo nanašali produkte PCR, v zadnji žepček smo nanesti produkt PCR, ki ni bil izpostavljen restrikciji. Elektroforeza je potekala 45 min. pri napetosti 90 V.

Po končani elektroforezi smo ločene produkte restrikcije posneli z UV transluminatorjem ( $\lambda=302\text{ nm}$ ).

### Materiali, reagenti, aparature in delovni pribor za oceno produktov restrikcije z elektroforezo za polimorfizem Fok I:

- agaroz za RFLP (Sigma)
- osnovna raztopina TAE pufrja (50-kratni koncentrat)
- etidijev bromid (10 mg/  $\mu\text{L}$ , Sigma)
- nanašalni pufer, ki vsebuje barvilo blue orange (Fluka)
- očetna kislina (1 mol/L, Carbo Erba)
- TRIS base (2 mol/L, Fluka)
- očetna kislina (1 mol/L, Carbo Erba)
- EDTA (0,5 mol/L, Fluka)
- označevalec dolžin DNA odsekov (50-1000 bp, PCR Marker Promega G 316 A)
- Pufer 10x NEB4 (BioLabs, New England)
- Encim FokI (4 U/  $\mu\text{L}$ ) (BioLabs)
- Avtoklavirana ultra čista voda



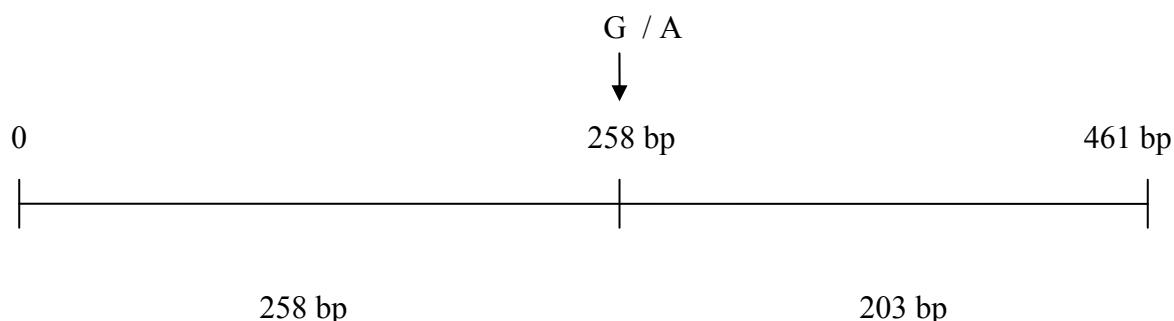
### 3.6.3. Bsm I – RFLP ANALIZA ZA GENOTIPIZACIJO POLIMORFIZMA Bsm I

461 bp velike produkta PCR smo analizirali polimorfizem Bsm I, z metodo restrikcije odsekov DNA, z encimom Bsm I. To je encim, ki prepozna naslednje zaporedje nukleotidov:



Na označenih mestih encim Bsm I cepi fosfodiesterne vezi. Na mestu N je lahko katerikoli nukleotid.

Polimorfizem BsmI na intronu 8 je tranzicija guanin/adenin – G/A, kar povzroči, da restrikcijski encim Bsm I ne prepozna restrikcijskega mesta in zato ne cepi odseka introna 8 gena VDR. Zato pomnoženi odsek velik 461 bp obdrži svojo velikost. Če tranzicije ni, encim Bsm I cepi na označenem mestu, zato dobimo dva odseka: dolžine 258 bp in 203 bp (Slika 14). Prisotnost restrikcijskega mesta označimo z b, odsotnost restrikcijskega mesta pa z B.



Dolžine odsekov po cepitvi.

Slika 14: Mesta, kjer encim Bsm I cepi odsek dolžine 461 bp na intronu 8 gena VDR.

#### Priprava reakcijske zmesi

Reakcijsko zmes smo pripravili z dodajanjem posameznih sestavin v enakem vrstnem redu, kot v Preglednici XV, razen PCR produkta. Nato smo pripravili in označili epruvete, v katere smo odpipetirali 5  $\mu\text{L}$  dobro premešane reakcijske zmesi. Nato smo v vsako epruveto dodali še 5  $\mu\text{L}$  PCR produkta. Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali in inkubirali 12 ur v vodni kopeli pri 65°C.

Preglednica XV: Priprava restrikcijske zmesi encima Bsm I za RFLP analizo.

SESTAVINE	VOLUMEN ENEGA VZORCA $\mu\text{L}$
Pufer 10x NEB2	1
Ultra čista voda	3,6
Encim za Bsm I (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0,4
PCR produkt	5,0
VOLUMEN ZMESI	10,0

#### Ocena produktov restrikcije z elektroforezo

Produkte restrikcije smo analizirali z elektroforezno ločbo na 4 % agaroznem gelu. Sestavine in količine za pripravo 4 % agaroznega gela za oceno produktov RFLP so opisane v Preglednici XII, st. 29.

Produkte restrikcije smo po končani reakciji centrifugirali 1 min pri 12000 obratih. V elektroforezno kadičko, napolnjeno z 1 x TAE pufrom, smo horizontalno položili 4 % agarozni gel. Na parafilm smo nanесли kapljice (3  $\mu$ L) pufera, ki vsebuje barvilo brom fenil modro. Nato smo kapljici dodali 10  $\mu$ L RFLP produkta in vse skupaj nanесли v žepček na gelu.

V prvi žepček smo nanесли označevalec dolžin DNA odsekov, v sledeče žepčke smo nanašali PCR produkte, v zadnji žepček smo nanесли PCR produkt, ki ni bil izpostavljen restrikciji. Elektroforeza je potekala 30 min. pri napetosti 90 V.

Po končani elektroforezi smo ločene produkte restrikcije posneli z UV transluminatorjem ( $\lambda = 302$  nm) in določili haplotipe.

### **Materiali, reagenti, aparature in delovni pribor za oceno produktov restrikcije z elektroforezo za polimorfizem Bsm I:**

- agaroz za RFLP (Sigma)
- osnovna raztopina TAE pufera (50-kratni koncentrat)
- etidijev bromid (10 mg/  $\mu$ L, Sigma)
- nanašalni pufer, ki vsebuje barvilo fenil modro (Fluka)
- očetna kislina (1 mol/L, Carbo Erba)
- TRIS base (2 mol/L, Fluka)
- očetna kislina (1 mol/L, Carbo Erba)
- EDTA (0,5 mol/L, Fluka)
- označevalec dolžin DNA odsekov (50-1000 bp, PCR Marker Promega G 316 A)
- Pufer 10x NEB2 (BioLabs, New England)
- Encim BsmI (10 U/  $\mu$ L) (BioLabs)
- Avtoklavirana ultra čista voda

## **3.7. STATISTIČNA ANALIZA**

Za presojo normalnosti porazdelitev naših rezultatov smo uporabili Kolmogorov – Smirnov test.

Homogenost varianc smo testirali z Levenejevim testom za več skupin.

Za oceno razlik med genetskimi podskupinami smo uporabili neparametričen Kruskal – Wallisov test, če predpostavke normalnosti in enakosti varianc niso bile izpolnjene.

Neenakost varianc, v primeru več skupin, smo skušali zmanjšati s transformacijami. Če transformacije niso bile uspešne smo uporabili neparametrični Kruskal – Wallisov test.

Za analizo genotipov in haplotipov glede na BMD smo uporabili parametrični test ANOVA, pri pogoju homogenosti in normalnosti.

Analizo povezanosti biokemičnih kazalcev z BMD smo ocenili s parametričnim testom ANCOVA, ob prisotnosti normalne porazdelitve in homogenosti.

Test  $\chi^2$  smo uporabili za ugotavljanje, če so eksperimentalni podatki v Hardy – Weinbergovem ravnotežju.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. OPTIMIZACIJA REAKCIJ

#### 4.1.1. OPTIMIZACIJA REAKCIJE VERIŽNEGA POMNOŽEVANJA 1-e ODSEKA NA PROMOTORJU GENA VDR


Z reakcijo verižnega pomnoževanja 1-e odseka na promotorju smo želeli dobiti čim večjo količino specifičnih produktov za analizo RFLP. Kritični dejavniki, ki najbolj vplivajo na reakcijo PCR so: koncentracija  $MgCl_2$ , začetnih oligonukleotidov, pufru, deoksinukleotidov, temperatura in čas posameznih stopenj ter količina in čistost DNA.

$MgCl_2$ , kot kofaktor vpliva na aktivnost encima DNA polimeraze in s tem na količino produkta. Zato smo pri pregledu literature, ki obravnava reakcijo verižnega pomnoževanja 1-e odseka na promotorju gena za VDR ocenili količino  $MgCl_2$ , ki je bila uporabljena pri reakciji PCR. Na osnovi danih podatkov smo se odločili, da bomo pričeli optimizacijo reakcije PCR s štirimi različnimi koncentracijami  $MgCl_2$  : 0,8 mmol/L, 1,6 mmol/L, 2,4 mmol/L in 3,2 mmol/L.

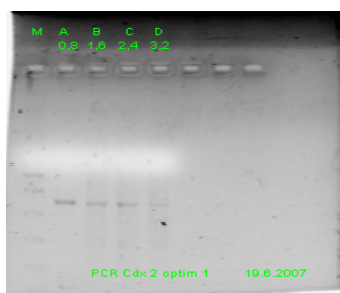
Pripravili smo 20  $\mu L$  skupnega volumna zmesi enega vzorca, tako, da smo po vrstnem redu dodajali: 1 x Gold pufer Tris-HCl (10mM), KCl (50 mM); 0,3 mmol/L dNTP; določena koncentracija  $MgCl_2$ ; 0,375  $\mu mol/L$  Cdx2-F; 0,375  $\mu mol/L$  Cdx2-R; 0,05 U/  $\mu L$  Ampli Taq Gold polimeraza (5U/  $\mu L$ ); ustrezna količina ultra čiste vode (10,0  $\mu L$  ali 9,2  $\mu L$  ali 8,4  $\mu L$  ali 7,6  $\mu L$ ) in 0,002 g/L DNA (0,05 g/L).

Pomnoževanje odseka 1-e na promotorju DNA gena za VDR smo izvajali v cikličnem termostatu, PRIMUS 96 plus, MWG-BIOTECH AG pri pogojih, ki so opisani v Preglednici XVI.

*Preglednica XVI: Pogoji na začetku optimizacije reakcije PCR, v cikličnem termostatu za pomnoževanje odseka 1-e na promotorju gena VDR.*

STOPNJE REAKCIJE PCR		TEMPERATURA (°C)	ČAS
1.	Začetna denaturacija	95	10 min
2.	Denaturacija Prileganje Podaljševanje	95 <b>55</b> 72	45 s <b>30</b> s 45 s  <b>36</b> ciklov
3.	Končno podaljševanje	72	7 min
4.	Prekiniev	8	$\infty$

Uspešnost in specifičnost reakcije PCR smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Položaj in intenziteto lis, ki sta merilo za specifičnost in količino produkta PCR smo zaznali z UV-dokumentacijskim sistemom.



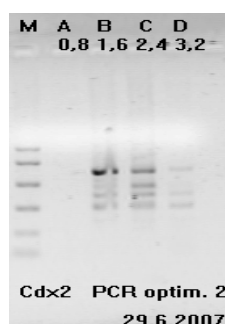
Slika 15: Ocena produktov prve faze optimizacije reakcije PCR odseka 1-e na promotorju gena VDR.

Iz posnetka je razvidno, da je največ specifičnega produkta reakcije PCR nastalo pri vzorcu A, pri katerem smo v skupni volumen zmesi dali 0,8 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (Slika 15).

Nastalo je premalo specifičnega produkta, zato smo morali spremeniti pogoje za reakcijo PCR.

Da bi zagotovili uspešno analizo RFLP smo želeli povečati količino produkta PCR.

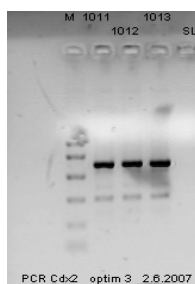
Temperatura in čas prileganja vplivata na specifičnost in količino produkta, zato smo danim pogojem znižali temperaturo prileganja iz 55 °C na 53 °C in podaljšali čas prileganja iz 30 s na 40 s. Da bi povečali količino produkta smo povečali tudi število ciklov iz 36 na 40 (Slika 16).



Slika 16: Ocena produktov reakcije PCR pri temperaturi prileganja 53 °C in 40. ciklih.

Pri teh pogojih se je presenetljivo izkazalo, da produkta vzorca A s koncentracijo 0,8 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ni bilo, kljub ponovitvi reakcije. Povečala se je tudi nespecifičnost produktov (Slika 16).

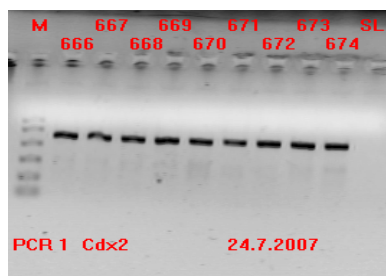
Vzorec B s koncentracijo 1,6 mmol/L MgCl<sub>2</sub> je imel največ produkta, vsi produkti danih vzorcev pa so bili nespecifični. Zato smo se odločili, da nadaljujemo optimizacijo z reakcijsko zmesjo, ki vsebuje 1,6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. Da bi povečali specifičnost produktov, smo dvignili temperaturo prileganja iz 53 °C na 54 °C ter zmanjšali čas prileganja iz 40 s na 20 s. (Slika 17)



Slika 17: Ocena produktov reakcije PCR pri temperaturi prileganja 54 °C in času prileganja 20 s.

Produkti so nastali v dovolj veliki koncentraciji (Slika 18), ker so lise intenzivne. Nespecifičnost produktov je še vedno prisotna a opazno zmanjšana.

Povečati smo morali specifičnost produkta. Ker so bili nastali produkti v dovolj veliki koncentraciji, smo lahko nespecifičnost produktov zmanjšali z nekoliko večjim povišanjem temperature prileganja, iz 54 °C na 58 °C, ker povišanje temperature prileganja hkrati zmanjšuje tudi količino produkta, ki ga pomnožujemo pri PCR reakciji. Reakcijo smo izvajali v zmesi za 10 vzorcev (Slika 18).



Slika 18: Ocena produktov reakcije PCR pri optimalnih pogojih za pomnoževanje odseka 1-e na promotorju gena VDR.

Izkazalo se je, da je optimalna reakcijska zmes z 20  $\mu$ L skupnega volumna zmesi enega vzorca, ki smo jo pripravili tako, da smo po vrstnem redu dodajali: 1 x Gold pufer Tris-HCl (10mM), KCl (50 mM); 0,3 mmol/L dNTP; 1,6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 0,375  $\mu$ mol/L Cdx2-F; 0,375  $\mu$ mol/L Cdx2-R; 0,05 U/  $\mu$ L Ampli Taq Gold polimeraza (5U/  $\mu$ L); 9,2  $\mu$ L ultra čiste vode in 0,002 g/L DNA (0,05 g/L). Optimalni pogoji v cikličnem termostatu so opisani v preglednici VII, st. 28.

Odseke 1-e promotorja DNA gena VDR, smo pomnožili pri optimalnih pogojih reakcije PCR v končni zmesi 31 vzorcev.

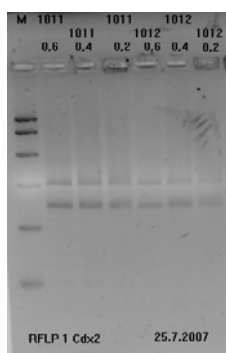
#### 4.1.2. OPTIMIZACIJA REAKCIJE GENOTIPIZACIJE ZA UGOTAVLJANJE DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH ODSEKOV Cdx 2 POLIMORFIZMOV

Z analizo RFLP smo preizkovanecem določili haplotipe za polimorfizem Cdx 2. Zato smo želeli pripraviti reakcijsko zmes, ki bi omogočila specifičnost in dovolj veliko koncentracijo nastalih restrikcijskih produktov, da bi lahko restrikcijsko zmes analizirali z elektroforezno ločbo na agaroznem gelu.

Ugotoviti smo želeli optimalno količino encima za pripravo reakcijske zmesi za analizo RFLP, zato smo pripravili reakcijsko zmes po Tabeli 16, v katero smo po enakem vrstnem redu dodajali posamezne sestavine, tako, da smo dobili skupni volumen reakcijske zmesi 15,0  $\mu$ L. Pripravili smo dva produkta PCR ( št.: 1011, 1012), pri katerih smo imeli v zmesi različno količino restrikcijskega encima HYP CH4 III: 0,2  $\mu$ L, 0,4  $\mu$ L in 0,6  $\mu$ L (Preglednica XVII). Tako pripravljene vzorce smo centrifugirali in inkubirali 12 ur v vodni kopeli pri 65°C.

*Preglednica XVII: Sestava reakcijske zmesi za analizo RFLP z različno koncentracijo encima HYP CH4 III v prvi fazi optimizacije reakcije.*

SESTAVINE	A	B	C
	$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$
Pufer 10x NEB4	1,5	1,5	1,5
Ultra čista voda	9,3	9,1	8,9
<b>Encim HYP CH4 III (5 U/ ml)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>
PCR produkt	4,0	4,0	4,0
VOLUMEN ZMESI	15,0	15,0	15,0



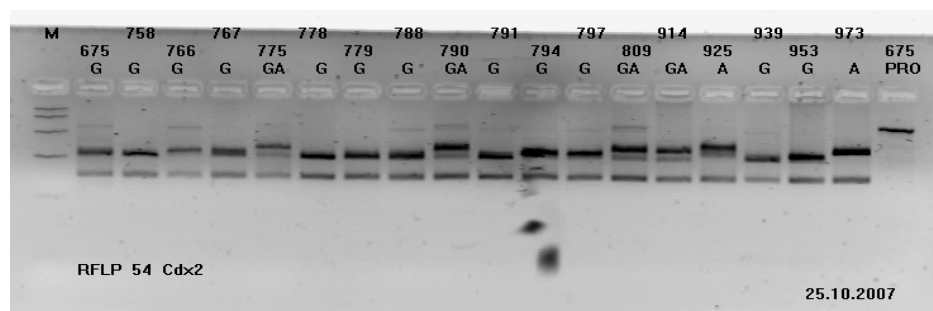
*Slika 19: Ocena produktov reakcije RFLP z različno koncentracijo encima HYP CH4 III v prvi fazi optimizacije reakcije.*

Uspešnost reakcije in produkte restrikcije smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Položaj in intenziteto lis, ki sta merilo za specifičnost in količino odsekov restrikcije smo zaznali z UV-dokumentacijskim sistemom.

Iz slike 19 je razvidno, da je bila restrikcija najuspešnejša pri koncentraciji encima HYP CH4 III 0,6  $\mu\text{L}$ , pri vzorcu 1011 pa tudi pri 0,4  $\mu\text{L}$  encima.

Da bi dobili večjo količino produktov restrikcije in s tem močnejše lise, ki bi povečale zanesljivost določanja haplotipov, smo izvedli reakcijo RFLP tako, da smo reakcijski zmesi s prisotnostjo 0,4  $\mu\text{L}$  encima povečali količino PCR produkta iz 4,0  $\mu\text{L}$  na 6,0  $\mu\text{L}$ .

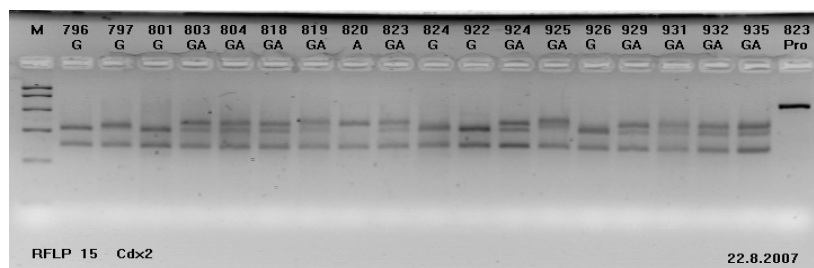
Reakcijo RFLP smo izvedli na večjem številu vzorcev, da smo dobili primere vseh haplotipov (Slika 20).



*Slika 20: Ocena uspešnosti reakcije RFLP ob prisotnosti 0,4  $\mu\text{L}$  encima HYP CH4 III in 6,0  $\mu\text{L}$  produkta PCR v reakcijski zmesi.*

Pri produktih 766, 788, 790, 791, 797 in 809 je v reakcijski zmesi ostal še ostanek odsekov PCR produkta, ki ni reagiral zaradi premajhne prisotnosti encima restrikcije (Slika 20).

V nadaljevanju smo morali oblikovati pogoje, pri katerih bi dosegli popolno restrikcijo PCR produktov. Zato smo povečali koncentracijo restriksijskega encima iz 0,4  $\mu\text{L}$  na 0,5  $\mu\text{L}$  v reakcijski zmesi (Slika 21). Tako smo povečali tudi količino produktov restrikcije in zagotovili zanesljivost detekcije.



Slika 21: Ocena uspešnosti reakcije RFLP pri koncentraciji encima HYP CH4 III 0,4  $\mu\text{L}$  in 6,0  $\mu\text{L}$  produkta PCR v reakcijski zmesi.

S slike 21 je razvidno, da so produkti 819, 925 in 931 nekoliko manj prepričljivi, zato smo reakcijo RFLP ponovili in dobili jasne rezultate.

Občasno so se pojavili nekateri primeri restrikcije posameznih vzorcev, ki smo jih s potrditvenim testom, torej s ponovno reakcijo RFLP ponovili in rezultate ponovno vrednotili.

Dani pogoji restrikcije pomnoženega odseka promotorja 1-e so bili optimalni, zato smo v nadaljevanju izvedli reakcijo RFLP pri navedenih pogojih, ki so opisani v poglavju metode dela.

#### 4.1.3. OPTIMIZACIJA HYP CH4 III – RFLP ANALIZE

Glede na izkušnje pri elektroforezi za določanje odsekov restrikcije za polimorfizem Bsm I in Fok I smo podaljšali čas elektroforeze na 45 minut, da sta se odseka velikosti 312 bp in 363 bp, ki se med seboj razlikujeta le za 51 bp dobro ločila pri potovanju po 4 % agaroznem gelu.

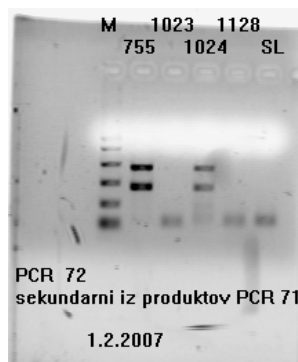
#### 4.1.4. OPTIMIZACIJA HKRATNEGA POMNOŽEVANJA EKSONA 2 IN INTRONA 8 GENA VDR

Reakcijo PCR pomnoževanja eksona 2 in introna 8 gena VDR smo izvajali po že razviti metodi optimalne hkratne Reakcije PCR.<sup>59</sup> Uporaba te metode se je izkazala za uspešno in racionalno pri raziskavi 621 preiskovancev.

Za štiri vzorce smo morali pogoje prilagoditi in spremeniti.

Zaradi prenizke koncentracije DNA v delovni raztopini se posamezni odseki DNA za vzorce 755, 1023, 1024 in 1128 niso hoteli namnožiti.

Da bi posamezne odseke DNA namnožili v dovolj veliki količini, smo za vse štiri vzorce uporabili za pomnoževanje odsekov metodo sekundarne reakcije PCR (Slika 23).



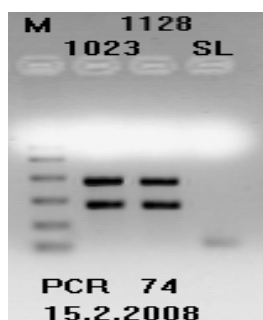
Slika 22: Sekundarna reakcija PCR pomnoževanja eksona 2 in introna 8 gena VDR.

Iz slike 22 je razvidno, da sta se pri preiskovancih 755 in 1024 odseka eksona 2 in introna 8 uspešno namnožila, zato vidimo lisi, ki označujta produkta v velikosti 461 bp in 266 bp. Pri preiskovancih 1023 in 1128, ter pri kontrolnem vzorcu, vidimo tudi liso, ki je posledica velike koncentracije začetnih oligonukleotidov, ker reakcija PCR ni potekla.

Tako nam je uspelo pomnožiti v dovolj veliki količini odseke vzorcev 755 in 1024.

Sklepali smo, da je v izolirani DNA zelo majhna koncentracija molekul DNA, zato pri preiskovancih 1023 in 1128 kljub izvedbi sekundarne reakcije PCR ni prišlo do pomnoževanja odsekov eksona 2 in introna 8.

Reakcijski zmesi vzorcev preiskovancev 1023 in 1128 za PCR reakcijo smo dodali 0,5  $\mu$ l nerazredčene DNA (Slika 23).



Slika 23: Reakcija PCR z 0,5  $\mu$ l nerazredčene DNA v reakcijski zmesi.

Iz slike 23 je razvidno, da je reakcija PCR uspela, ker smo uspešno namnožili odseke eksona 2 in introna 8 gena VDR vzorcev preiskovancev 1023 in 1128.

#### 4.1.5. OPTIMIZACIJA Fok I – RFLP ANALIZE

Preiskovancem smo določili haplotipe za polimorfizem Fok I z analizo RFLP. Zato smo pripravili reakcijsko zmes, z znanimi pogoji, ki so opisani v Tabeli 17<sup>160</sup>. Reakcijsko zmes smo pripravili z dodajanjem posameznih sestavin v enakem vrstnem redu, kot v preglednici XVIII in dodali 5  $\mu$ L PCR produkta. Pripravljene vzorce smo centrifugirali in inkubirali 12 ur v vodni kopeli pri 37°C.

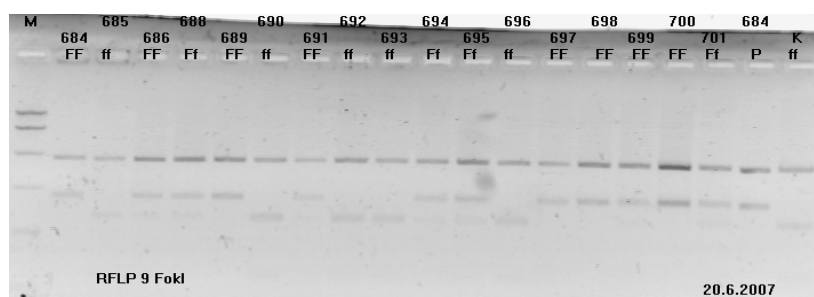


Preglednica XVIII: Reakcijska zmes za Fok I – RFLP analizo v prvi fazi optimizacije Fok I-RFLP analize.<sup>160</sup>

SESTAVINE	VOLUMEN ENEGA VZORCA μL
Pufer 10x NEB4	1,2
Ultra čista voda	5,4
Encim za Fok I (4 U/ μL)	0,4
PCR produkt	5,0
VOLUMEN ZMESI	12,0

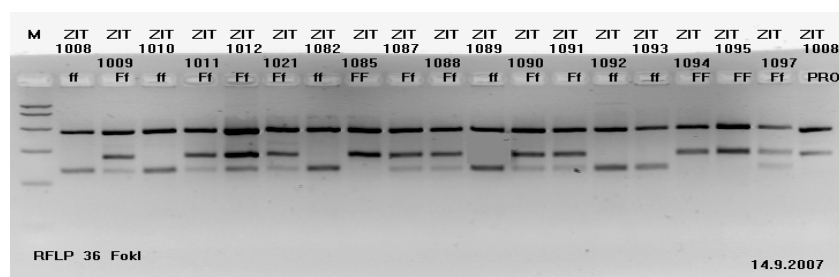
Produkte restrikcije smo ločili z elektroforezo na 4 % agaroznem gelu in zaznali z UV-dokumentacijskim sistemom.

Rezultati, ki jih prikazuje slika 24, so slabo vidne črte, ki kažejo na slabo koncentracijo produkta restrikcije.



Slika 24: Produkti elektroforeze Fok I- RFLP analize pri pogojih iz literature.<sup>160</sup>

Da bi lahko iz elektroforeze gelov odčitali genotip, smo morali optimizirati količino produkta PCR glede na pogoje elektroforeze. Zato smo v reakcijski zmesi povečali količino dodanega produkta PCR na 5 μL in zmanjšali količino vode na 4,4 μL (Slika 26).



Slika 25: Elektroforeza restrikcijskih odsekov Fok I – RFLP analize, pri kateri je bilo 5 μL PCR produkta.

Na sliki 25 so črte jasno vidne, zato ker je koncentracija pomnoženih odsekov dovolj visoka.

Iz danih rezultatov restrikcije z encimom Fok I smo lahko zaključili, da so produkti restrikcije v dovolj veliki koncentraciji in jasno razvidni, da bomo genotipe lahko zanesljivo določili.

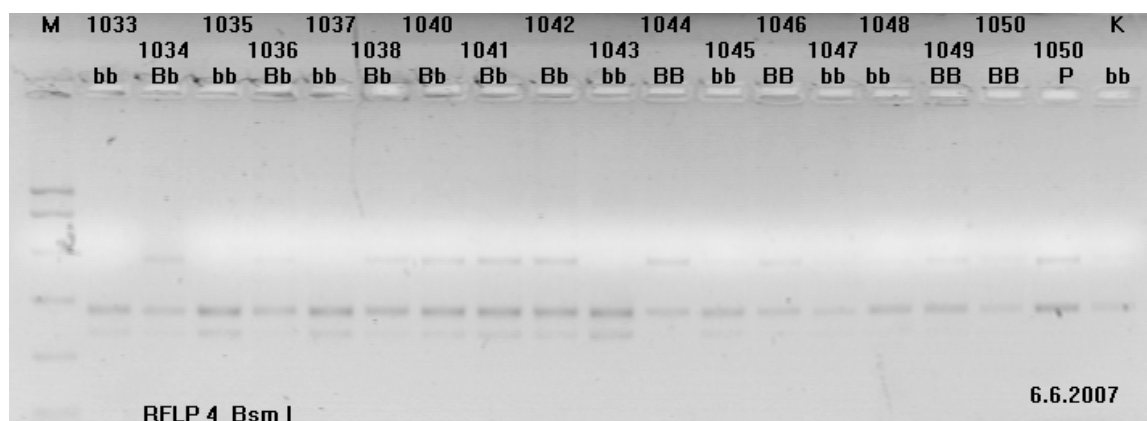
#### 4.1.6. OPTIMIZACIJA REAKCIJE ZA UGOTAVLJANJE POLIMORFIZMOV Bsm I DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH ODSEKOV

Prav tako kot za določitev genotipov za polimorfizem Fok I z analizo RFLP smo tudi za določitev genotipov za polimorfizem Bsm I z analizo RFLP, pripravili reakcijsko zmes, z znanimi pogoji, ki so opisani v Tabeli 18<sup>64</sup>. Reakcijsko zmes smo pripravili z dodajanjem posameznih sestavin v enakem vrstnem redu, kot v preglednici XIX in dodali 4  $\mu\text{L}$  PCR produkta.

Pripravljene vzorce smo centrifugirali in inkubirali 12 ur v vodni kopeli pri 65°C.

*Preglednica XIX: Reakcijska zmes za Bsm I – RFLP analizo<sup>64</sup> v prvi fazi optimizacije.*

SESTAVINE	VOLUMEN ENEGA VZORCA $\mu\text{L}$
Pufer 10x NEB2	1
Ultra čista voda	4,8
Encim za Bsm I (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0,2
PCR produkt	4,0
VOLUMEN ZMESI	10,0

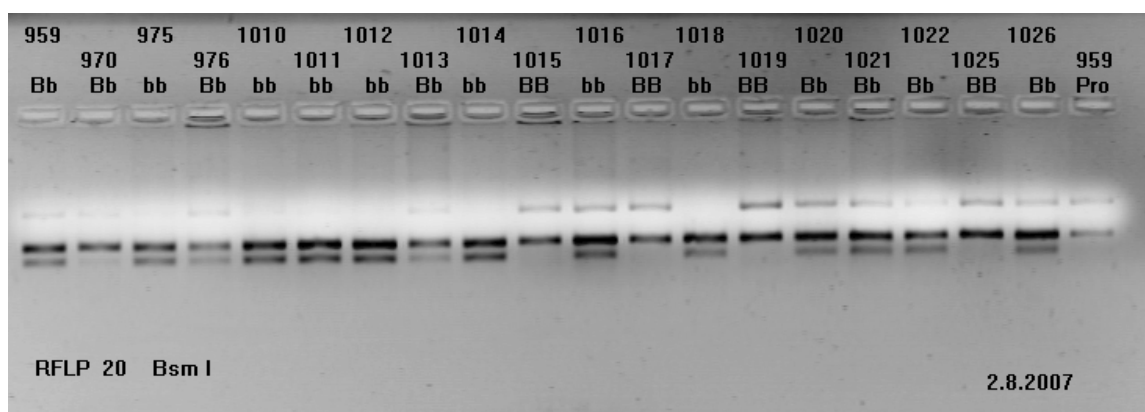


*Slika 26: Ocena produktov elektroforeze Bsm I – RFLP analize v prvi fazi optimizacije. Pogoji pri katerih je potekala analiza RFLP so opisani v preglednici XIX.*

Produkte restrikcije ločene z elektroforezo na 4 % agaroznem gelu in zaznane z UV-dokumentacijskim sistemom prikazuje slika 26. Črte so slabo vidne, ker je koncentracija restriksijskega produkta nizka.

Da bi lahko iz elektroforeze gelov odčitali genotip, smo morali optimizirati količino PCR produkta glede na pogoje elektroforeze.

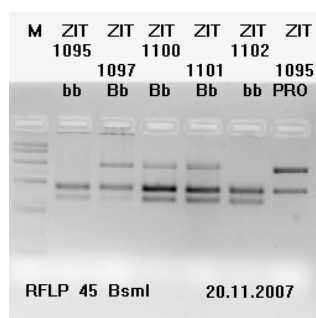
Zato smo povečali količino PCR produkta, ki smo ga dodali v reakcijsko zmes na 5  $\mu\text{L}$ . Povečali smo tudi količino restriksijskega encima Bsm I na 0,4  $\mu\text{L}$  in zmanjšali količino vode na 3,6  $\mu\text{L}$ , tako, da smo dobili skupni volumen zmesi 10  $\mu\text{L}$ . (Slika 27)



Slika 27: Ocena restrikcijskih odsekov *Bsm I* – analize, pri kateri je bilo 5  $\mu\text{L}$  PCR produkta, 0,4  $\mu\text{L}$  encima *Bsm I* in 3,6  $\mu\text{L}$  vode z uporabo barvila *Ksilencianol*.

Na Sliki 27 so lise, ki označujejo produkte *Bsm I* - RFLP reakcije jasno vidne.

Da bomo genotipe lahko zanesljivo določili smo zaradi fluoresciranja barvila *Ksilencianola* v območju branja rezultatov (Slika 27), v nadaljevanju uporabili barvilo *Bromfenolmodro* (Slika 28).



Slika 28: Ocena produktov restrikcije *Bsm I* – RFLP analize z uporabo barvila *Bromfenolmodro*.

Elektroforeza produktov restrikcije *Bsm I* – RFLP analize z uporabo barvila *Bromfenolmodro* daje jasne črte, ker pri uporabi barvila *Bromfenolmodro* ni prišlo do fluoresciranja v območju rezultatov (Slika 28).

*Bromfenolmodro* pri poteku elektroforeze potuje hitreje kot naši produkti, zato interpretacije rezultatov ne moti več, zato smo lahko iz rezultatov restrikcije z encimom *Fok I* zaključili, da so produkti restrikcije v dovolj veliki koncentraciji in jasno razvidni, da bomo genotipe lahko zanesljivo določili.

#### 4.2.1. GENOTIPSE FREKVENCE POLIMORFIZMOV Fok I, Bsm I in Cdx 2

Zanimalo nas je kakšne so genotipske frekvence oz. pogostost posameznih genotipov v naši preiskovani populaciji in kako se razlikujejo glede na starost, spol in obolelost.

Zato smo preiskovano skupino (N=625), v kateri smo analizirali frekvence genotipov, razdelili na štiri podskupine: preiskovanke v premenopavzi (N=57), bolnice s pomenopavzno osteoporozo (N=230), zdrave preiskovanke v pomenopavzi (N=221) in moški preiskovanci (N=117). Iz podatkov smo izračunali pogostost oz. frekvenco pojavljanja genotipov v preiskovanih skupinah. (Preglednica XX)

*Preglednica XX: Frekvence genotipov za polimorfizme Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR, glede na starostno obdobje in spol ter ujemanje s Hardy – Weinbergovem ravnotežjem.*

	Bsm I			Fok I			Cdx 2		
	BB	Bb	bb	FF	Ff	ff	GG	GA	AA
Premenopavza N=57	15,8% 9	47,4% 27	36,8% 21	35,1% 20	43,8% 25	21,1% 12	75,4% 43	19,3% 11	5,3% 3
<i>Verjetnost p</i>	0,00			0,63			3,27		
ZDRAVE Pomenopavza N=221	18,1% 40	43,4% 96	38,5% 85	46,6% 103	42,1% 93	11,3% 25	75,1% 166	21,3% 47	3,6% 8
<i>Verjetnost p</i>	1,94			0,33			3,73		
OSTEOPOROZA Pomenopavza N=230	10,9% 25	45,2% 104	43,9% 101	35,2% 81	47% 108	17,8% 41	65,2% 150	30,4% 70	3,9% 10
<i>Verjetnost p</i>	0,05			0,23			0,05		
SKUPAJ Pomenopavza N=451	14,5% 65	44,3% 200	41,2% 186	40,9% 184	44,6% 201	14,6% 66	70,2% 317	25,9% 117	3,8% 17
<i>Verjetnost p</i>	0,88			0,84			2,14		
MOŠKI N=117	23,1% 27	49,6% 58	27,4% 32	35,9% 42	50,4% 59	13,7% 16	68,4% 81	27,4% 31	4,3% 5
<i>Verjetnost p</i>	0,01			0,43			0,81		
SKUPAJ N=625	16,2% 101	45,6% 285	38,2% 239	39,4% 246	45,6% 285	15,0% 94	70,4% 441	25,6% 161	4,0% 23
<i>Verjetnost p</i>	1,06			0,59			2,88		

V primeru polimorfizma Cdx 2 v 1-e promotorju gena VDR je frekvenca genotipa GG največja v vseh preiskovanih skupinah, frekvenca genotipa AA pa najmanjša. Razširjenost genotipa GG je pri Slovenkah bistveno večja kot pri Kitajkah 25,7%,<sup>102</sup> kar je najverjetneje posledica razlik v rasi. Razširjenost genotipov polimorfizma Cdx 2 pa se bistveno ne razlikuje od žensk v Veliki Britaniji v zgodnji pomenopavzi (GG, 64.1%; GA, 31.5%; AA, 4.4%).<sup>55</sup>

Pri polimorfizmu Bsm I je genotip Bb najbolj, genotip BB pa najmanj razširjen v vseh preiskovanih skupinah. Kitajci v premenopavzi imajo nizko prisotnost genotipa BB (0,4%)<sup>84</sup>, glede na belce in Japonce (1,6%)<sup>83</sup> in gen VDR ni pomemben dejavnik za opredelitev BMD

pri kitajskih ženskah in moških.<sup>84</sup> Evropske belke, vključno s Slovenkami imamo večjo prisotnost genotipa BB (15,8%-19%)<sup>130</sup>, kot Kitajke (0%-8,64%) in Japonke v premenopavzi. Razširjenost genotipov polimorfizma Bsm I v slovenski populaciji žensk, ki so bile vključene v našo raziskavo, pa se ne razlikuje od žensk v Veliki Britaniji (BB, 18.5%; Bb, 47.6%; bb, 33.9%).<sup>55</sup> Slovenke imamo glede na Čehinje, tako obolele z osteoporozo (BB=32 %), kot zdrave (BB=30%), bistveno nižjo zastopanost genotipa BB.<sup>78</sup> Pri Slovencih je genotip bb (27,4%) manj zastopan kot pri Švicarjih (44,0%).<sup>133</sup>

Zhang s sodelavci je prišel do zaključkov, da frekvenca genotipa bb VDR variira znotraj Kitajskih narodov Han in Uygur in da je prisotnost BB genotipa pri Uygurih 8 % pri Hanih pa 0 %<sup>77</sup>. Zanimivo je, da je pri Korejcih in Japoncih največja zastopanost genotipa bb, ki mu sledi Bb, pri zdravih ženskah v pomenopavzi.<sup>77</sup> Raziskave torej kažejo na veliko razliko v pojavnosti polimorfizma Bsm I med rasami.

Pri polimorfizmu Fok I gena VDR, je genotip ff najmanj zastopan v vseh preiskovanih skupinah polimorfizma Fok I, prav tako je za vse genotipe Fok I najmanjša zastopanost genotipa ff pri Čehinjah tako pri obolelih z osteoporozo (ff=17 %), kot pri zdravih (ff=15 %).<sup>78</sup> Najmanjšo zastopanost polimorfizma ff imajo tudi ženske v veliki Britaniji (ff=15,5 %).<sup>55</sup> Razširjenost genotipov Fok I se ne razlikuje med Slovenkami, Čehinjami in ženskami v veliki Britaniji.<sup>55,78</sup> Razširjenost genotipov Fok I ne kaže razlik med Slovenci, Japonci<sup>115</sup> in moškimi v Veliki Britaniji.<sup>124</sup>

Zanimalo nas je, ali se pogostost genotipov razlikuje med zdravimi in osteoporoznimi ženskami v pomenopavzi. Zato smo uporabili test  $\chi^2$  in primerjali genotipske frekvence vseh treh polimorfizmov. (Preglednica XXI)

*Preglednica XXI: Rezultati  $\chi^2$  testa za primerjavo genskih frekvenc med zdravimi in osteoporoznimi ženskami v pomenopavzi.*

Test $\chi^2$	Bsm I	Fok I	Cdx 2
	Verjetnost p	Verjetnost p	Verjetnost p
ZDRAVE POMENOPAVZA	0,083	0,024	0,072
OSTEOPOROZA POMENOPAVZA			

Povezanost polimorfizma Bsm I in razširjenosti genotipov med zdravimi in bolnimi preiskovankami v pomenopavzi je mejno značilna. Morebitno povezanost lahko predvidevamo tudi na osnovi rezultatov v preglednici XX, iz katere lahko razberemo, da je zastopanost genotipa BB pri bolnih preiskovankah v pomenopavzi nižja za 40 % glede na zdrave preiskovanke v pomenopavzi. Dani rezultati so v nasprotju s študijami, ki potrjujejo prisotnost genotipa BB z razvojem osteoporoze<sup>125,162</sup> in potrjujejo študije, ki polimorfizem Bsm I ne povezujejo z osteoporozo.<sup>58,66,67,163,164,165</sup> Morrison s sodelavci je celo dokazal, da na osnovi genotipa VDR lahko predvidevamo verjetnost razvoja osteoporoze pri posamezniku. Zdrave ženske starejše od 60 let, ki so imele genotip BB, so v 75 % doživele zlom v starosti, tiste z genotipom bb pa v 61 %. Pacienti z osteoporozo imajo višjo frekvenco genotipa BB kot zdravi.<sup>76</sup>

Na osnovi dobljenih rezultatov testa  $\chi^2$ , ki so prikazani v preglednici XXI, smo ugotovili, da je vrednost p nižja od 0,05, za razširjenost genotipov polimorfizma Fok I, zato lahko povzamemo, da je razlika v razširjenosti genotipov polimorfizma Fok I značilno različna med zdravimi in bolnimi ženskami v pomenopavzi. To potrjujejo tudi rezultati v pregledni XX, kjer lahko razberemo, da je genotip FF pri zdravih preiskovankah v pomenopavzi 34,5 % bolj razširjen, kot pri bolnih. Nasprotno je v pomenopavzi genotip ff pri zdravih za 36,5 % manj razširjen kot pri bolnih.

Razporeditev genotipov Fok I v populaciji Slovenk, ki niso obolele za osteoporozo je podoben populaciji Fincev, Francozev, Angležev, Avstralcem, Japoncem in Tajvancem. Od vseh naštetih populacij se bistveno razlikuje razširjenost genotipov zdravih Indijcev, ki imajo močno zmanjšano zastopanost genotipa ff. Različna razširjenost genotipov v različnih populacijah lahko vodi do odkrivanja povezanosti s posameznimi obolenji. S tem bi omogočili lažje ugotavljanje verjetnosti razvoja obolenja in razvoj kliničnega managementa.<sup>74</sup> Naši rezultati potrjujejo raziskave, ki povezujejo genotip FF z zmanjšano verjetnostjo za obolelost z osteoporozo in genotip ff s povečano verjetnostjo za obolelost<sup>85</sup>. In ne podpira raziskav, ki polimorfizem Fok I ne povezujejo z obolelostjo z osteoporozo<sup>58,87,102,110,125</sup>.

Z uporabo testa  $\chi^2$ , lahko iz dobljenih rezultatov v preglednici XXI razberemo vrednost p, ki je večja od 0,05, vendar kaže na mejno značilno razliko v razširjenosti genotipov polimorfizma Cdx 2 med zdravimi in bolnimi ženskami v pomenopavzi. Prav tako vrednosti razširjenosti genotipov polimorfizma Cdx 2 v preglednici XX, ne kažejo značilnih razlik med skupino zdravih in bolnih preiskovank v pomenopavzi. Zato se rezultati naše raziskave ujemajo z raziskavami, ki ne potrjujejo povezave polimorfizma Cdx 2 z razvojem osteoporoz<sup>137</sup> in ne potrjujejo raziskav, ki povezanost polimorfizma Cdx 2 in osteoporoz<sup>85</sup> potrjujejo.

**Razlika v razširjenosti genotipov polimorfizma Fok I je značilna med zdravimi in bolnimi Slovenkami v pomenopavzi in mejno značilna za razširjenost genotipov polimorfizma Bsm I in Cdx 2. Pri zdravih Slovenkah v pomenopavzi je zastopanost genotipa BB in FF večja, genotipa ff pa manjša, glede na ženske v pomenopavzi, ki so obolele z osteoporozo.**

V nadaljevanju nas je zanimalo, kako spol vpliva na frekvenco genotipov.

Zato smo primerjali razširjenost genotipov v populaciji žensk in moških s pomočjo testa  $\chi^2$ . Ugotovili smo, da je genotipska distribucija genotipov žensk: BB:Bb:bb = 14,6% : 44,7% : 40,7%; FF:Ff:ff = 0,402 : 0,445 : 0,153 in GG:GA:AA = 0,709 : 0,255 : 0,036 in moških: BB:Bb:bb = 0,231 : 0,496 : 0,274; FF:Ff:ff = 0,359 : 0,504 : 0,137 in GG:GA:AA = 0,684 : 0,274 : 0,043. (Preglednica XX)

Rezultati testa  $\chi^2$ , s katerim smo primerjali razširjenost genotipov polimorfizmov Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR med spoloma, v preglednici XXII kažejo, da je vrednost p nižja od 0,05 in statistično značilna za razširjenost genotipov polimorfizma Bsm I. Iz tabele XX lahko razberemo, da je zastopanost genotipa BB pri ženskah bistveno manjša, kot pri moških, nasprotno, pa je zastopanost genotipa bb pri ženskah bistveno večja kot pri moških.

Preglednica XXII: Rezultati  $\chi^2$  testa za primerjavo genskih frekvenc žensk in moških.

	Bsm I	Fok I	Cdx 2
	VERJETNOST	VERJETNOST	VERJETNOST
	p	p	p
ŽENSKE	0,010	0,509	0,943
MOŠKI			

**Moški imajo statistično značilno razliko razširjenosti genotipov polimorfizma Bsm I glede na ženske v preiskovani skupini Slovenk in Slovencev. Genotip BB je pri ženskah bistveno manj zastopan, kot pri moških. Nasprotno, pa je genotip bb pri ženskah bolj zastopan, kot pri moških.**

Želeli smo ugotoviti, če je naša preiskovana skupina v Hardy – Weinbergovem ravnotežju, ki velja v velikih populacijah z naključnim razmnoževanjem, selekcije, mutacij in migracij. Populaciji, ki je v Hardy – Weinbergovem ravnotežju, se frekvenca genotipov iz generacije v generacijo ohranja.

V populaciji označimo frekvenco enega alela na kromosomu s p, frekvenco drugega alela na istem kromosomu pa s q. Kromosom ima dva alela zato velja  $p+q=1$ . Vsota frekvenc genotipov v populaciji pa je  $p^2 + 2pq + q^2$ . Za ugotovitev skladnosti naše frekvence genotipov s frekvencami v Hardy – Weinbergovem ravnotežju, smo uporabili  $\chi^2$  test. Nismo dobili značilnih razlik med frekvencami preiskovane skupine in frekvencami Hardy – Weinbergovega ravnotežja.<sup>161</sup> (Preglednica XX)

Zato lahko zaključimo, da so naše skupine preiskovancev v Hardy – Weinbergovem ravnotežju in njihove značilnosti veljajo za slovensko populacijo.

#### 4.2.2. OCENA VPLIVA PROUČEVANIH GENSKIH SPREMEMB NA RAZVOJ OSTEOPOROZE

Spremembe DNA vodijo v molekulske in genetske spremembe organizma. Po odkritju zaporedja človeškega genoma v projektu Human Genome Project leta 2001, so se študije na tem področju močno razširile. Namen znanstvenikov je odkriti tiste genetske spremembe, ki bi jih kot »genetske« kazalce lahko uporabili. To bi omogočilo že predsimpltomatično in prenatalno diagnostiko, ki omogoča učinkovito gensko svetovanje in pravilno izbiro zdravljenja ali lajšanja bolezni že v samem začetku, kar izboljša kakovost življenja bolniku. S preiskavami DNA je diagnostika hitra, natančna in zanesljiva in omogoča prepoznavanje bolezni že pred pojavom kliničnih znakov. Preiskave DNA uporabljamo tudi za posredno diagnostiko, pri kateri preiskujemo DNA v bližini bolezenskega gena, ki se zaradi bližine po značilnostih dedovanja prenese skupaj z bolezenskim genom na potomce in lahko sklepamo, da je potomec bolezen dedoval ali ne. Odkrivamo lahko tudi prenašalce mutiranih genov, ki ne kažejo znakov bolezni, bolezenski gen pa lahko prenesejo na potomce. Razvoj laboratorijskih metod raziskovanja DNA bo prinesel tudi nove dosežke na področju terapije, preventive, genetskega zdravljenja in forenzike.<sup>60</sup>

Pri proučevanju genetskih sprememb v povezavi z razvojem osteoporoze je 23 raziskav od 63 potrdilo, da so polimorfizmi VDR povezani z BMD-ls in 22 raziskav od 51 zavrglo povezavo

polimorfizmov VDR z BMD-tot.<sup>134</sup> Uitterlinden s sodelavci v meta analizi ni odkril povezave med polimorfizmi Fok I in Bsm I in BMD.<sup>58</sup>

Ker raziskave vpliva polimorfizmov na BMD, ki je fenotipski kazalec razvoja osteoporoze, dajejo nasprotujoče si rezultate, smo se odločili, da ugotovimo, kako genetske spremembe v slovenski populaciji vplivajo na razvoj osteoporoze.

Da bi ugotovili klinični pomen polimorfizmov na izmerjene vrednosti kostne gostote: v ledvenem delu hrbtenice (BMD-ls), celokupne mineralne kostne gostote medenice (BMD-tot) in mineralne kostne gostote vratu stegenice ((BMD-fn), smo posamezni vrsti genotipa izračunali povprečno vrednost BMD na posameznem delu telesa. Z analizo ANOVA smo med seboj primerjali srednje vrednosti BMD posameznih genotipov. Če je bila verjetnost p ( $p \leq 0,05$ ) manjša ali enaka od izbrane stopnje tveganja  $\alpha = 5\%$ , smo sklepali, da se vrednosti BMD, pri dani stopnji tveganja, značilno razlikujejo med posameznimi genotipi. Če pa je bila verjetnost p večja od  $\alpha = 0,05$ , smo sklepali, da je razlika neznačilna.

Rezultate preiskave kliničnega pomena polimorfizmov smo analizirali glede na štiri preiskovalne skupine: preiskovanke v premenopavzi, zdrave preiskovanke v pomenopavzi, bolne preiskovanke v pomenopavzi in moški.

#### 4.2.2.1. OCENA KLINIČNEGA POMENA POLIMORFIZMA Bsm I

V naši raziskavi (Preglednica XXIII) smo odkrili, da vrednost BMD pada v smeri BMD-ls, BMD-tot in BMD-fn, pri vseh genotipih polimorfizma Bsm I pri ženskah v premenopavzi. Ko smo primerjali vrednosti BMD med posameznimi genotipskimi podskupinami, smo ugotovili, da so vrednosti p višje od 0,66, zato je povezanost BMD s polimorfizmom Bsm I neznačilna.

Narejenih je bilo mnogo raziskav polimorfizmov v 3' UTR regiji gena VDR, ki so si zelo nasprotujoče in niso dale zanesljivih zaključkov.<sup>69,71,98</sup> Zdravi otroci imajo značilno povezavo med genotipom FF in višjim BMD, kot pri ff in Ff genotipu.<sup>135</sup> Garnero s sodelavci je prišel do zaključkov, da polimorfizem Bsm I ni povezan z BMD pri populaciji Francozinj v premenopavzi.<sup>79</sup> Morrison s sodelavci je ugotovil povezavo med BMD in polimorfizmi v 3' regulatorni regiji gena za VDR, ki vpliva na regulacijo izražanja, preko stabilnosti mRNA.<sup>45,63</sup> Meta analiza Uitterlinden A. G. in njegovih sodelavcev je potrdila, da polimorfizem Bsm I ni povezan z BMD ali povečano verjetnostjo za zlome.<sup>58</sup> Eckstein M. in sodelavci niso dokazali povezave Bsm I polimorfizma z BMD pri Izraelcih.<sup>66</sup> Zhao J. in sodelavci so odkrili, da je Bsm I polimorfizem povezan z BMD pri mladih Kitajkah.<sup>67</sup> Ivanova J je pri naključno izbranih Bolgarkah odkrila povezanost polimorfizma Bsm I z večjo rizičnostjo za nižji BMD.<sup>101</sup> Ferrari s sodelavci je pri raziskavi belih Evropejk nakazal možnost, da je genotip bb povezan z nizko BMD-ls pri ženskah pred puberteto.<sup>65</sup> Zarrabeitia s sodelavci ni našel povezanosti med polimorfizmom Bsm I in BMD pri mladih Špankah,<sup>128</sup> do enakih zaključkov na BSM-ls, je prišel Baroncelli pri mladih Italijankah.<sup>130</sup>

Neskaldnost korelacije med BMD in polimorfizmi VDR v različnih raziskavah, bi lahko razložila raziskava Ferrarija s sodelavci, ki so raziskovali medsebojni vpliv vnosa kalcija glede na BMD in genotip v času odraščanja. Značilno nižja vrednost BMD-ls in BMD-fn je bila pri BB genotipu glede na Bb in bb pred puberteto. Ista značilnost pa ne velja za starejše. Povečan vnos kalcija ima večji vpliv na značilno višji BMD pri genotipu BB. V nasprotnem primeru, torej pri znižanem vnosu kalcija v organizem, je vrednost BMD pri genotipu bb višja, kot pri genotipu Bb in BB. BMD je značilno povezan z Bsm I polimorfizmom samo pred puberteto, torej BB genotip ima nižji BMD. Pri močno zmanjšanem vnosu kalcija s hrano ima genotip bb spontano višji BMD.<sup>72</sup>



Močan vpliv okolja na BMD je potrdila tudi raziskava Lianga in sodelavcev, ki so dokazali, da poleg količine vnosa kalcija na BMD (Španci, Kavkazijci in Azijci), vpliva tudi pripadnost etnični skupnosti.<sup>73</sup>

Kompleksnost interakcij med polimorfizmi gena za VDR in vplivi okolja, bi lahko podali odgovor na različne zaključke povezanosti BMD in polimorfizmi gena VDR.

**V premenopavzi pri slovenskih ženskah, polimorfizem Bsm I ne izkazuje pomembnejšega vpliva na BMD.**

Iz preglednice XXIV je razvidno, da vrednost BMD za polimorfizem Bsm I pada v smeri BMD-ls, BMD-tot in BMD-fn, pri vseh genotipih zdravih žensk v pomenopavzi. Primerjali smo vrednosti BMD med posameznimi genotipskimi podskupinami in ugotovili, da so vrednosti  $p$  od 0,307, zato je povezanost BMD s polimorfizmom Bsm I neznačilna in ne potrjuje dosedanje raziskave na slovenski populaciji žensk v pomenopavzi, ki so pokazale značilno povezavo genotipa BB z nizko BMD.<sup>126</sup>

Mnogi raziskovalci so z raziskavami prišli do nasprotujočih zaključkov. Nguyen s sodelavci je potrdil, da polimorfizmi VDR vplivajo na povečano verjetnost za zlome, neodvisno od BMD pri starejših belkah.<sup>104</sup> Perez A. s sodelavci je dokazal, da je genotip bb gena VDR povezan z nizko vrednostjo BMD-ls pri zdravih Argentinkah v pomenopavzi glede na genotip Bb.<sup>80</sup> Dong J. s sodelavci je prišel do zaključka, da je BMD-ls povezana z Bsm I polimorfizmom za genotip Bb, ki ima značilno nižji BMD-ls kot posamezniki z genotipom bb pri pomenopavznih Kitajskih kmečkih ženskah in je zaključil, da dejavniki okolja vplivajo na korelacijo med BMD in VDR polimorfizmi.<sup>81</sup> Mitra S. s sodelavci je raziskal, da genotip bb vodi v več kot 10 % višji BMD na hrbtenici in kolku, kot pri genotipu BB pri populaciji Indijk v pomenopavzi.<sup>82</sup> Vidal s sodelavci je prišel do zaključkov, da imajo ženske na Malti v pomenopavzi z genotipom bb višji BMD-ls in BMD-fn.<sup>113</sup> Zajíčková ni potrdila povezave Bsm I polimorfizma z BMD pri Čehinjah v pomenopavzi.<sup>78</sup> Tudi Thakkestian v meta analizi ni našel nobene povezave.<sup>112</sup> Prav tako Jaramillo-Rangel s sodelavci ni našel povezave med polimorfizmom Bsm I in BMD pri zdravih Mexikankah v pomenopavzi.<sup>121</sup> in Holmberg-Marttila pri Finkah.<sup>128</sup>

**V pomenopavzi pri zdravih Slovenkah, polimorfizem Bsm I ne izkazuje pomembnejšega vpliva na BMD.**

V naši raziskavi rezultati niso pokazali statistično značilne povezave polimorfizma Bsm I z BMD pri bolnih preiskovankah v pomenopavzi. Primerjali smo vrednosti BMD med posameznimi genetskimi podskupinami in smo ugotovili, da so vrednosti  $p$  višje od 0,056. Ugotovili smo tudi mejno značilnost polimorfizma Bsm I z BMD-fn ( $p=0,056$ ). (Preglednica XXV)

Tudi mnogi drugi raziskovalci niso dali enotnega zaključka. Pérez A s sodelavci je potrdil, da imajo Argentine z osteoporozo v pomenopavzi z genotipom bb nižjo BMD-fn glede na genotip BB.<sup>80</sup> Seremak-Mrozikiewicz in Lister s sodelavci sta prišla do enakih zaključkov, da pri ženskah v pomenopavzi z nizkim BMD prevladuje genotip bb.<sup>108,114</sup> Nasprotno, je Quesada pri Špankah zaključil, da Bsm I polimorfizem ni povezan z BMD pri bolnih Špankah v pomenopavzi.<sup>111</sup> Langdahl s sodelavci je pri Dankah obolelih za osteoporozo, v pomenopavzi ugotovil, da je bb genotip povezan z višjo BMD-tot in ugotovil, da je genotip BB Bsm I polimorfizma povezan z nizko BMD medenice in osteoporoznimi zlomi.<sup>125</sup>

**Pri preiskovankah obolelih z osteoporozo v pomenopavzi v slovenski populaciji nismo našli povezave med polimorfizmom Bsm I in BMD. Nakazana pa je možnost vpliva na BMD-fn ( $p=0,056$ ). Za potrditev bi bile potrebne nadaljnje raziskave na večji skupini preiskovank.**

Iz preglednice XXVI je razvidno, da vrednost BMD za polimorfizem Bsm I pada v smeri BMD-ls, BMD-tot in BMD-fn, pri vseh genotipih v skupini preiskovanih moških. Vrednosti p so višje od 0,144, zato je povezanost BMD s polimorfizmom Bsm I neznačilna.

Braga s sodelavci pri raziskavi moških v Italiji ni našel povezave med polimorfizmom BsmI in BMD.<sup>119</sup> Langdahl s sodelavci je pri Dancih obolelih za osteoporozo, v pomenopavzi ugotovil, da je bb genotip povezan z višjo BMD-tot in ugotovil, da je B alel Bsm I polimorfizma povezan z nizko BMD medenice in osteoporoznimi zlomi.<sup>125</sup> Lorentzon s sodelavci je pri raziskavi zdravih moških belih Švedih zaključil, da Bsm I polimorfizem ni povezan z BMD.<sup>127</sup> Baroncelli je pri mladih Italijanih prišel do zaključkov, da polimorfizem Bsm I ni povezan z BMD-ls.<sup>130</sup> Ferrari s sodelavci je pri moških Švicarjih v premenopavzi prišel do zaključkov, da imajo posamezniki z genotipom BB in hkratno prisotnostjo alela f značilno nižjo BMD.<sup>133</sup>

**Pri populaciji moških v Sloveniji nismo našli povezave med Bsm I in BMD. BMD pri moških se mejno značilno spreminja s starostjo ( $p=0,051$ ).**

**Polimorfizem Bsm I pri ženskah in moških ni bil povezan z vrednostmi BMD na področju ledvenih vretenc, vratu stegenice in na medenici, zato verjetno ne vpliva na razvoj osteoporoze.**

#### 4.2.2.2. OCENA KLINIČNEGA POMENA POLIMORFIZMA Fok I

V naši raziskavi se je izkazalo, da vrednost BMD pada v smeri BMD-ls, BMD-tot in BMD-fn, pri vseh genotipih polimorfizma Fok I. Ko smo primerjali vrednosti BMD med posameznimi genetskimi podskupinami, smo ugotovili, da so vrednosti p višje od 0,239, zato je povezanost BMD s polimorfizmom Bsm I statistično neznačilna. (Preglednica XXIII)

Različne raziskave, ki so proučevale povezanost polimorfizma Fok I z BMD niso dale enotnih zaključkov. Arai s sodelavci je povezal Fok I polimorfizem z odsotnostjo prvih treh AK, s povečano interakcijo s transkripcijskim faktorjem IIB in povezavo z BMD. Mnoge raziskave niso našle enakega učinka kot Arai,<sup>85</sup> mnoge raziskave so to celo ovrgle. Eccleshall s sodelavci je zaključil, da Fok I polimorfizem verjetno ni povezan z BMD pri vseh etničnih skupinah.<sup>86</sup> Zmuda s sodelavci je potrdil, da pri starejših Afriških Američankah Fok I polimorfizem ni povezan z BMD.<sup>87</sup> Laaksonen s sodelavci je z raziskavo na Finskem ugotovil, da je Fok I polimorfizem povezan z BMD na podlakti.<sup>64</sup> Ferrari s sodelavci je v raziskavi Evropskih belk nakazal možnost, da je genotip ff povezan z nizko BMD-ls pri ženskah pred puberteto.<sup>65</sup> Meta analiza Uitterlinden A. G. in njegovih sodelavcev je potrdila, da polimorfizem Fok I ni povezan z BMD ali povečano verjetnostjo za zlome.<sup>58</sup> Do enakih zaključkov je prišel Morita s sodelavci pri Japonkah<sup>109</sup> in Duman pri zdravih Turkinjah v pomenopavzi.<sup>110</sup> Zhang s sodelavci je pri kitajskih deklicah ugotovil višji BMD pri genotipu FF glede na Ff, ki je statistično značilen za povezavo z nizko vrednostjo BMD podlaktnice.<sup>97</sup> Ivanova J je pri naključno izbranih Bolgarkah odkrila povezanost polimorfizma Fok I z večjo rizičnostjo za nižji BMD.<sup>101</sup> Do enakih zaključkov je prišel Katsumata pri raziskavi japonskih deklic.<sup>120</sup> Zarrabeitia s sodelavci ni našel povezanosti med polimorfizmom Bsm I in BMD pri mladih Špankah.<sup>128</sup>

**V premenopavzi pri slovenski populaciji žensk polimorfizem Fok I ne izkazuje pomembnejšega vpliva na BMD.**

Iz preglednice XXIV je razvidno, da vrednosti BMD za polimorfizem Fok I pada v smeri BMD-ls, BMD-tot in BMD-fn, pri vseh genotipih zdravih žensk v pomenopavzi. Vrednosti p so višje od 0,217, zato je povezanost BMD s polimorfizmom Fok I neznačilna in ne potrjuje povezave z BMD, kot nekatere druge raziskave.

Nguyen s sodelavci je potrdil, da polimorfizmi VDR vplivajo na povečano verjetnost za zlome, neodvisno od BMD pri starejših belkah.<sup>104</sup> Mitra S. s sodelavci je prišel do zaključkov, da genotip FF vodi v več kot 10 % višji BMD na hrbtenici in medenici, kot pri genotipu ff pri populaciji Indijk v pomenopavzi. V različnih etničnih skupinah prisotnost frekvenc posameznih genotipov variira, povezava posameznih genotipov z BMD pa nakazuje enake rezultate.<sup>82</sup> Bandrés s sodelavci je pri populaciji pomenopavznih Špank zaključil, da je genotip FF povezan z višjo BMD-ls in BMD-fn, ff pa z nižjo.<sup>106</sup> Vidal s sodelavci je prišel do zaključkov, da imajo ženske na Malti v pomenopavzi z genotipom bb višji BMD-ls in BMD-fn.<sup>113</sup> Do podobnih zaključkov je prišla Zajčková s sodelavci, ki je zaključila, da je Fok I polimorfizem povezan z BMD kolka in lumbalne hrbtenice pri češki populaciji žensk v pomenopavzi. ff genotip ima značilno nižji BMD kolka, za 9,4 %, glede na genotip Ff. Enak trend velja za BMD-ls, vendar ni specifično značilen.<sup>78,105</sup> Chen s sodelavci je prišel do zaključkov, da imajo ženske v Taiwanu z genotipom ff, 2,8 krat večjo verjetnost, z genotipom FF pa 0,8 krat večjo verjetnost, da bodo zbolele za osteoporozo glede na ženske z genotipom Ff.<sup>96</sup> Zhang s sodelavci ni našel povezanosti med BMD in polimorfizmom Fok I pri ženskah v pomenopavzi v Shanghaiju.<sup>102</sup> Do enakih zaključkov je prišel Morita s sodelavci pri Japonkah.<sup>109</sup> Zhang ni našel povezanosti med polimorfizmom Fok I in BMD pri ženskah v pomenopavzi.<sup>117</sup> prav tako Kim pri Korejkah.<sup>122</sup>

**Pri populaciji zdravih Slovenk v pomenopavzi nismo ugotovili povezave med polimorfizmom Fok I in BMD-fn, BMD-ls in BMD-tot.**

Rezultati naše raziskave v preglednici XXV, pri primerjavi posameznih genotipskih podskupin žensk obolelih z osteoporozo v pomenopavzi ponazarjajo, da so vrednosti p višje od 0,436, zato je povezanost BMD s polimorfizmom Fok I neznačilna in ne potrjuje povezave z BMD, kot nekatere druge raziskave.

Moffett SP s sodelavci je prišel do zaključkov, da je BMD koželjnice nižji pri genotipu FF glede na ff pri starejših osteoporoznih ameriških ženskah.<sup>99</sup> Lister s sodelavci je pri pomenopavznih ženskah v Mexiku prišel do zaključkov, da genotip FF nima zaščitne vloge pred obolenjem osteoporoze.<sup>114</sup> Duman s sodelavci ni našel povezave med polimorfizmom Fok I in BMD pri Turkinjah v pomenopavzi obolelih z osteoporozo,<sup>110</sup> Quesada je pri Špankah prišel do enakih zaključkov.<sup>111</sup> Lucotte s sodelavci je pri Francozinjah v pomenopavzi obolelih z osteoporozo prišel do zaključkov, da ff genotip sovпада z nižjo BMD-fn.<sup>129</sup> Gennari je pri osteoporoznih Italijankah v pomenopavzi povezal ff genotip z osteoporozo in nižjim BMD-ls in ne z BMD-fn.<sup>131</sup>

**V slovenski populaciji nismo našli povezave med polimorfizmom Fok I in BMD pri bolnih preiskovankah v pomenopavzi.**

Ko smo primerjali BMD vrednosti med posameznimi genskimi podskupinami pri slovenskih moških, smo ugotovili, da so vrednosti  $p$  BMD-ls (0,036) in BMD-fn (0,040) statistično značilne, vrednosti BMD-tot pa ne. Zato je polimorfizem Fok I povezan z BMD pri slovenskih moških in podpira druge raziskave z enakimi zaključki. (Preglednica XXVI) Zhang s sodelavci je pri kitajskih dečkih ugotovil višji BMD pri genotipu FF glede na Ff, ki je statistično značilen za povezavo z nizko vrednostjo BMD podlaktnice.<sup>97</sup> Yamada s sodelavci je pri Japonskih moških v pomenopavzi prišel do zaključkov, da je genotip Ff značilno povezan z nizko BMD-fn, pri ženskah v pomenopavzi ni našel nobene povezave.<sup>115</sup> Strandberg s sodelavci je prišel do zaključkov, da je genotip FF neodvisno povezan z BMD-ls in BMD-tot in zaključil, da je Fok I polimorfizem neodvisni napovedovalec BMD-ls in BMD-tot, vsekakor pa ne za BMD-fn.<sup>116</sup> Braga s sodelavci pri raziskavi moških v Italiji ni našel povezave med polimorfizmom FokI in BMD.<sup>119</sup> Kanan s sodelavci je pri zdravih moških Angležih našel značilno razliko med FF in ff v BMD-ls in nobene povezave z BMD-fn.<sup>124</sup>

**Pri slovenski populaciji moških je polimorfizem Fok I značilno povezan z BMD-ls ( $p=0,036$ ) in BMD-fn ( $p=0,040$ ). Moški z genotipom FF so imeli najnižje vrednosti BMD.**

**Polimorfizem Fok I v slovenski populaciji žensk nima kliničnega pomena, pri slovenskih moških verjetno vpliva na BMD-ls in BMD-fn in posledično na razvoj osteoporoze.**

#### 4.2.2.3. OCENA KLINIČNEGA POMENA POLIMORFIZMA Cdx 2

V naši raziskavi (Preglednica XXIII) se je izkazalo, da vrednost BMD pada v smeri BMD-ls, BMD-tot in BMD-fn, pri vseh genotipih polimorfizma Cdx 2 v skupini preiskovank v premenopavzi. S statistično analizo ANOVA smo analizirali povezanost preiskovanih SNP z BMD in ugotovili, da so vrednosti  $p$  pri BMD-ls večje od 0,05, zato je statističen vpliv polimorfizma Cdx 2 neznačilen. Nasprotno pa je polimorfizem Cdx 2 statistično značilen za BMD-tot ( $p = 0,011$ ) in BMD-fn ( $p = 0,011$ ), kar potrjuje raziskave, ki dokazujejo povezanost polimorfizma Cdx 2 z razvojem osteoporoze.

Meta analiza Uitterlinden A. G. in njegovih sodelavcev je nakazala verjetnost povezanosti polimorfizma Cdx 2 A alelom z zmanjšano nevarnostjo za zlome hrbtenice.<sup>58</sup> Morita s sodelavci je pri Japonkah v premenopavzi prišel do zaključkov, da imajo posameznice z genotipom GG nižji BMD. Niso pa našli povezave med polimorfizmom Cdx 2 in spremembo BMD.<sup>136</sup>

**V pomenopavzi je pri slovenskih ženskah Cdx 2 polimorfizem značilno povezan z BMD-tot ( $p= 0,011$ ) in BMD-fn ( $p=0,011$ ).**

Iz rezultatov naše raziskave v preglednici XXIV ugotovimo, da vrednost BMD za polimorfizem Cdx 2 pada v smeri BMD-ls, BMD-tot in BMD-fn, pri vseh genotipih zdravih žensk v pomenopavzi. Vrednosti  $p$  so višje od 0,05, zato je povezanost BMD s polimorfizmom Cdx 2 neznačilna in ne potrjuje povezave z BMD, kot nekatere druge raziskave.

Fang s sodelavci je v analizi nemških žensk in moških potrdil, da se alel A pri belcih pojavlja z nizko frekvenco in je povezan z zaščito pred zlomi.<sup>58</sup> Arai s sodelavci je potrdil, da imajo Japonke v pomenopavzi z genotipom GG za 12 % nižjo BMD, kot z genotipom AA.<sup>85</sup> Zhang s sodelavci ni našel povezanosti med BMD in polimorfizmom Cdx 2 pri ženskah v pomenopavzi v Shanghaiju.<sup>102</sup> Choi s sodelavci je prišel do zaključkov, da je Fok I polimorfizem značilno povezan z BMD-ls, ne pa z BMD-fn. Preizkovanke z alelom ff imajo za 13% nižji BMD-ls, kot tiste z FF genotipom. Višja prevalenca ff genotipa je bila pri

preizkovankah z osteoporozo pri Korejskih ženskah v pomenopavzi.<sup>123</sup> Macdonald s sodelavci je pri ženskah v pomenopavzi v Veliki Britaniji prišel do zaključkov, da Cdx 2 polimorfizem ne vpliva na BMD.<sup>137</sup>

**V pomenopavzi zdravih Slovencek polimorfizem Cdx 2 ni povezan z BMD.**

S statistično analizo ANOVA smo proučevali mineralno kostno gostoto bolnih žensk v pomenopavzi različnih genotipskih podskupin polimorfizma Cdx 2.

Iz preglednice XXV smo na osnovi dobljenih rezultatov ugotovili, da so vrednosti  $p$  pri vseh genotipih polimorfizma Cdx 2 višje od 0,05, zato je povezanost polimorfizma Cdx 2 z BMD neznačilna, kar ne potrjuje povezave polimorfizma Cdx 2 z BMD, kot nekatere druge raziskave.

Casado-Díaz A s sodelavci je pri raziskavi Španskih žensk obolelih z osteoporozo v pomenopavzi prišel do zaključkov, da je nižja vrednost BMD povezana s polimorfizmom Cdx 2.<sup>100</sup>

**V pomenopavzi preiskovank z osteoporozo v slovenski populaciji nismo našli povezave med polimorfizmom Cdx 2 in BMD.**

Pri raziskavi mineralne kostne gostote pri moških, ki smo jo proučevali s statističnim testom ANOVA na osnovi dobljenih rezultatov v Preglednici XXVI, smo ugotovili, da so vrednosti  $p$  pri vseh genotipih polimorfizma Cdx 2 višje od 0,05, zato je povezanost polimorfizma Cdx 2 z BMD neznačilna, kar ne potrjuje povezave polimorfizma Cdx 2 z BMD, kot nekatere druge raziskave.

Uitterlinden s sodelavci je v meta analizi moške populacije prišel do zaključkov, da je A alel verjetno povezan z zaščito pred zlomi.<sup>58</sup>

**Pri slovenski populaciji moških polimorfizem Cdx 2 ni povezan z BMD.**

**Polimorfizem Cdx 2 je samo v premenopavznem obdobju pri ženskah značilno povezan z BMD-tot in BMD-fn. Zato bi z nadaljnjimi raziskavami lahko bil ključni dejavnik zgodnje diagnostike in preventive pri razvoju osteoporoze.**

Preglednica XXIII: Povprečne vrednosti BMD za polimorfizme: Bsm I, Fok I, Cdx 2 ter vrednosti biokemijskih kazalcev: v sBALP, OC, CTx in Katepsin K za preiskovano skupino v premenopavzi.

	Biokemijski kazalec	E8-G+284A(Bsm I)				E2-C4T(FokI)				1e-G_1739A(Cdx 2)			
		AA(BB)	AG(Bb)	GG(bb)	p	CC (FF)	CT(Ff)	TT(ff)	p	GG	GA	AA	p
PREMENOPA VZA	N (%)	9(15,8)	27(47,4)	21(36,8)		20 (35,1)	25 (43,9)	12 (21,1)		43 (75,4)	11 (19,3)	3 (5,3)	
	BMD-ls (g/cm <sup>3</sup> )	1,028 ± 0,128	1,000 ± 0,112	1,005 ± 0,118	0,813	1,038 ± 0,145	0,979 ± 0,095	1,008 ± 0,091	0,239	1,017 ± 0,123	0,967 ± 0,092	0,989 ± 0,050	0,430
	BMD-tot (g/cm <sup>3</sup> )	0,929 ± 0,080	0,923 ± 0,106	0,918 ± 0,080	0,982	0,931 ± 0,111	0,905 ± 0,545	0,940 ± 0,055	0,488	0,940 ± 0,083	0,849 ± 0,102	0,913 ± 0,054	0,011
	BMD-fn (g/cm <sup>3</sup> )	0,799 ± 0,041	0,784 ± 0,092	0,771 ± 0,069	0,664	0,787 ± 0,091	0,771 ± 0,077	0,797 ± 0,050	0,608	0,798 ± 0,070	0,723 ± 0,086	0,763 ± 0,039	0,011
	N 57 (%)	9 (16)	27 (47)	21 (37)		20 (35)	25 (44)	12 (21)		43 (75)	11 (19)	3 (5)	
	sBALP	8,902 ± 3,175	8,902 ± 3,379	7,520 ± 2,477	0,430	8,003 ± 2,558	8,268 ± 3,178	8,330 ± 3,675	0,993	7,997 ± 3,110	8,303 ± 2,963	10,51 ± 1,496	0,195
	N 57 (%)	9 (16)	27 (47)	21 (37)		20 (35)	25 (44)	12 (21)		43 (75)	11 (19)	3 (5)	
	OC ng/mL	11,644 ± 2,441	10,519 ± 5,311	10,343 ± 4,535	0,363	11,145 ± 3,970	11,144 ± 5,417	8,708 ± 3,613	0,160	10,665 ± 4,820	9,882 ± 4,197	12,900 ± 3,869	0,412
	N 57,56,56 (%)	9 (16)	27 (48)	20 (36)		20 (36)	24 (43)	12 (21)		42 (75)	11 (20)	3 (5)	
	CTx ng/mL	3063,11 ± 1373,51	2708,7 ± 1547,74	2466,2 ± 1101,4	0,539	2368,6 ± 1352,70	3103,4 ± 1424,19	2347,6 ± 1115,90	0,097	2749,7 ± 1454,55	2720,2 ± 1055,96	1538,3 ± 572,50	0,239
	N 58,57,57 (%)	9 (17)	27 (47)	21 (36)		20 (35)	25 (44)	12 (21)		43 (76)	11 (19)	3 (5)	
	Katepsin K ng/mL	3,744 ± 5,759	12,967 ± 28,256	5,319 ± 6,684	0,509	1,122 ± 1,676	1,102 ± 1,469	0,813 ± 1,447	0,940	7,1556 ± 15,467	5,610 ± 4,784	42,033 ± 67,274	0,241

Preglednica XXIV: Povprečne vrednosti BMD za polimorfizme: Bsm I, Fok I, Cdx 2 ter vrednosti biokemijskih kazalcev: sBALP, OC, CTx in Katepsin K za preiskovano skupino zdravih v pomenopavzi.

ZDRAVE POMENOPAVZA	Biokemijski Kazalec	E8-G+284A (Bsm I)				E2-C4T (FokI)				1e-G_1739A (Cdx 2)			
		AA (BB)	AG (Bb)	GG (bb)	p	CC (FF)	CT (Ff)	TT (ff)	p	GG	GA	AA	p
	N (%)	40(18,1)	96(43,4)	85(38,5)		103(46,6)	93(42,1)	25(11,3)		166(75,1)	47(21,3)	8 (3,6)	
	BMD-ls (g/cm <sup>3</sup> )	0,971 ± 0,115	0,992 ± 0,152	0,961 ± 0,135	0,307	0,976± 0,144	0,988 ± 0,139	0,932 ± 0,112	0,217	0,977 ± 0,140	0,960± 0,109	1,053± 0,249	0,215
	BMD-tot (g/cm <sup>3</sup> )	0,926 ± 0,132	0,916 ± 0,138	0,906 ± 0,122	0,699	0,901 ± 0,128	0,925 ± 0,137	0,926 ± 0,114	0,382	0,913 ± 0,130	0,915± 0,120	0,930± 0,194	0,931
	BMD-fn (g/cm <sup>3</sup> )	0,776 ± 0,137	0,767 ± 0,122	0,756 ± 0,114	0,667	0,761 ± 0,119	0,764 ± 0,128	0,780 ± 0,109	0,779	0,764 ± 0,122	0,758± 0,108	0,795± 0,179	0,733
	N 43 (%)	5 (12)	17 (39)	21 (49)		16 (37)	21 (49)	6 (14)		33 (77)	9 (21)	1 (2)	
	sBALP	9,892 ± 2,967	12,072 ± 3,788	12,112 ± 4,298	0,514	11,040 ± 2,974	12,480 ± 4,671	11,722 ± 3,675	0,557	11,804 ± 3,311	12,483 ± 5,909	7,170	0,451
	N 68 (%)	8 (12)	28 (41)	32 (47)		31 (45)	29 (43)	8 (12)		49 (72)	17 (25)	2 (3)	
	pOC ng/mL	13,413 ± 6,265	15,339 ± 4,402	14,475 ± 6,132	0,649	14,842 ± 6,242	14,790 ± 4,691	13,875 ± 5,325	0,902	14,510 ± 5,140	15,071 ± 6,121	16,400± 10,607	0,851
	N 94 (%)	10 (10)	42 (45)	42 (45)		36 (38)	44 (47)	14 (15)		69 (73)	21 (22)	4 (4)	
	CTx ng/mL	3853,2 ± 2632,93	4122,1± 1665,35	3718,5 ± 1939,23	0,475	4122,1 ± 1665,35	3718,5 ± 1939,23	3853,2 ± 2632,93	0,782	3718,5 ± 1939,23	3853,2 ± 2632,93	4122,1± 1665,35	0,287
	N 41 (%)	5 (12)	16 (39)	20 (49)		16 (39)	19 (46)	6 (15)		32 (78)	8 (20)	1 (2)	
	Katepsin K ng/mL	5,560 ± 7,427	1,775 ± 1,693	5,045 ± 4,851	<b>0,076</b>	1,775 ± 1,693	5,045 ± 4,851	5,560 ± 7,427	0,557	5,045 ± 4,851	5,560 ± 7,427	1,775 ± 1,693	0,223

Preglednica XXV: Povprečne vrednosti BMD za polimorfizme: Bsm I, Fok I, Cdx 2 ter vrednosti biokemijskih kazalcev: sBALP, OC, CTx in Katepsin K za preiskovano skupino bolnih v pomenopavzi.

BOLNE POMENOPAVZA	Biokemijski kazalec	E8-G+284A (Bsm I)				E2-C4T (FokI)				1e-G_1739A (Cdx 2)			
		AA (BB)	AG (Bb)	GG (bb)	p	CC (FF)	CT (Ff)	TT (ff)	p	GG	GA	AA	p
	N = 230 (%)	25(10,9)	104(45,2)	101(43,9)		81(35,2)	108(47,0)	41(17,8)		150(65,2)	70(30,4)	9 (3,9)	
	BMD-ls (g/cm <sup>3</sup> )	0,721 ± 0,088	0,748 ± 0,080	0,741± 0,097	0,399	0,737 ± 0,090	0,746 ± 0,082	0,741 ± 0,105	0,787	0,980± (0,140)	0,960± (0,109)	1,053± (0,249)	0,215
	BMD-tot (g/cm <sup>3</sup> )	0,737 ± 0,088	0,767 ± 0,094	0,750± 0,106	0,286	0,768 ± 0,099	0,750 ± 0,104	0,750 ± 0,083	0,436	0,913 ± (0,130)	0,915± (0,120)	0,930± (0,194)	0,931
	BMD-fn (g/cm <sup>3</sup> )	0,608 ± 0,065	0,640 ± 0,087	0,615± 0,082	0,056	0,629 ± 0,086	0,625 ± 0,084	0,618 ± 0,079	0,792	0,764 ± (0,122)	0,758± (0,108)	0,795± (0,179)	0,733
	N 110 (%)	13 (12)	48 (44)	49 (44)		38 (35)	49 (44)	23 (21)		69 (63)	37 (34)	3 (3)	
	sBALP	12,501± 3,930	12,464± 6,415	12,758± 5,322	0,967	13,125 ± 5,982	12,183 ± 5,879	12,247± 4,891	0,725	12,707 ± 5,586	12,101 ± 5,676	16,130± 8,275	0,482
	N 67 (%)	6 (9)	34 (51)	27 (40)		21 (31)	32 (48)	14 (21)		44 (66)	21 (31)	2 (3)	
	pOC ng/mL	31,417± 14,458	29,412 ± 13,492	26,936 ± 15,617	0,707	24,319 ± 16,064	30,316 ± 14,481	30,893 ± 10,334	0,265	29,691 ± 14,440	26,862 ± 14,566	21,400 ± 13,152	0,594
	N 62 (%)	8	26	28		24	31	7		36	23	3	
	CTx ng/mL	4240,31± 2407,80	4504,15± 1966,941	4181,51± 2703,131	0,938	4091,5± 2679,98	4555,2± 2259,34	4100,1± 1550,33	0,747	1,350 ± 1,366	3706,9± 1794,94	4316,6± 2884,09	0,275
	N 12 (%)	1	7	4		5	6	1		6	6	0	
	Katepsin K ng/mL	0,000	2,157 ± 1,662	0,550 ± 0,592	0,417	1,76± 1,55	1,400 ± 1,705	0,10	0,662	1,35 ± 1,37	1,53 ± 1,85	/	0,849



Preglednica XXVI: Povprečne vrednosti BMD za polimorfizme: Bsm I, Fok I, Cdx 2 ter vrednosti biokemijskih kazalcev: OC in CTx, za preiskovano skupino moških.

	Biokemijski kazalec	E8-G+284A (Bsm I)				E2-C4T (FokI)				1e-G_1739A (Cdx 2)			
		AA (BB)	AG (Bb)	GG (bb)	p	CC (FF)	CT (Ff)	TT (ff)	p	GG	GA	AA	p
MOŠKI	N = 117 (%)	27(23,1)	58 (49,6)	32 (27,4)		42(35,9)	59(50,4)	16(13,7)		80(68,4)	32(27,4)	5 (4,3)	
	BMD-ls (g/cm <sup>3</sup> )	1,005 ± 0,136	1,067 ± 0,195	1,080 ± 0,166	0,223	1,007 ± 0,171	1,097 ± (0,169)	1,036 ± (0,188)	<b>0,036</b>	1,050 ± 0,168	1,080 ± 0,204	0,999 ± 0,109	0,943
	BMD-tot (g/cm <sup>3</sup> )	0,949 ± 0,083	1,044 ± 0,181	1,027 ± 0,160	0,158	1,017 ± 0,181	1,051 ± 0,156	0,944 ± (0,115)	0,167	1,031 ± 0,181	1,016 ± 0,127	0,950 ± 0,073	0,748
	BMD-fn (g/cm <sup>3</sup> )	0,739 ± 0,095	0,833 ± 0,171	0,813 ± 0,154	0,144	0,794 ± 0,151	0,851 ± 0,168	0,721 ± 0,096	<b>0,040</b>	0,809 ± 0,169	0,822 ± 0,139	0,819 ± 0,067	0,549
	N 25 (%)	5 (20)	13 (52)	7 (28)		12 (48)	11 (44)	2 (8)		17 (68)	6 (24)	2 (8)	
	pOC ng/mL	8,080 ± 2,754	9,100 ± 4,930	11,429 ± 6,896	0,510	8,358 ± 5,071	9,482 ± 3,522	17,050 ± 10,253	<b>0,084</b>	9,618 ± 5,591	10,883 ± 4,204	4,950 ± 0,354	0,387
	N 20 (%)	4 (20)	10 (50)	6 (30)		9 (45)	9 (45)	2 (10)		15 (75)	3 (15)	2 (5)	
	CTx ng/mL	1784,15 ± 1224,17	1872,30 ± 837,01	2369,12 ± 1447,16	0,635	1602,1 ± 969,35	2271,3 ± 1169,07	2606,5 ± 1072,68	0,319	2094,5 ± 1141,14	1833,3 ± 907,09	1577,8 ± 1410,25	0,820

### 4.2.3. OCENA VPLIVA PROUČEVANIH GENSKIH SPREMEMB NA BIOKEMIJSKE KAZALCE

Spremembe v kostni masi so relativno počasne, zato lahko z merjenjem mineralne kostne gostote zaznamo spremembo BMD šele po enem letu. Zato je določanje in spremljanje biokemičnih kazalcev kostne remodelacije bistvenega pomena za spremljanje poteka bolezni in uspešnosti terapije, za oceno intenzivnosti kostne remodelacije in za oceno ravnotežja procesov tvorbe in resorpcije kosti. Biokemični kazalci omogočajo ugotavljanje sprememb presnove veliko prej kot vrednosti BMD in s tem tudi hitrejša in učinkovitejša ukrepanja.

Mnoge raziskave so pokazale povezanost biokemijskih kazalcev za napoved razvoja osteoporoze,<sup>140</sup> vendar niso pokazale zanesljivega biokemijskega kazalca za zgodnjo napoved nizke BMD in zlomov v pomenopavzi.<sup>141,142</sup>

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti povezanost polimorfizmov gena VDR z biokemijskimi kazalci tvorbe kosti: kostna specifična alkalna fosfataza v serumu (sBALP), osteokalcin (pOC) in biokemijskimi kazalci razgradnje kosti: C-terminalni telopeptid (CTX), katepsin K.

V ta namen smo biokemijske kazalce, ki so bili določeni z rutinskimi metodami v diagnostičnih laboratorijih analizirali glede na proučevane polimorfizme gena VDR s statističnimi metodami ANOVA in v primeru neenakosti in normalnosti varianc s testom Kruskal – Wallis. Če je bila verjetnost  $p$  ( $p \leq 0,05$ ) manjša ali enaka od izbrane stopnje tveganja  $\alpha = 5\%$ , smo sklepali, da se vrednosti BMD, pri dani stopnji tveganja, značilno razlikujejo med posameznimi genotipi. Če pa je bila verjetnost  $p$  večja od  $\alpha = 0,05$ , smo sklepali, da je razlika neznačilna.

Vpliv genetskih sprememb na biokemijske kazalce smo analizirali glede na štiri preiskovalne skupine: preiskovanke v premenopavzi, zdrave preiskovanke v pomenopavzi, bolne preiskovanke v pomenopavzi in moški.

#### 4.2.3.1. POVEZANOST POLIMORFIZMOV VDR Z BIOKEMIJSKI KAZALCI TVORBE KOSTI

Da bi ugotovili vpliv polimorfizmov gena VDR na kostno tvorbo, smo ocenjevali koncentracijo OC v plazmi in BALP v serumu.

BALP je tetramerni produkt zrelih osteoblastov, koncentracija kostno specifične alkalne fosfataze v serumu kaže na celično aktivnost osteoblastov. Funkcija BALP še ni popolnoma razjasnjena, njeno vlogo povezujejo pri tvorbi osteoida in mineralizaciji.

Porast celotne ali kostno specifične ALP v serumu je kazalec z bolj predvidljivimi rezultati za mnoge bolezni, kot osteokalcin. Višje vrednosti BALP napovedujejo večjo verjetnost za zlome.<sup>34,35</sup>

Osteokalcin je  $\gamma$  peptid, ki ga sintetizirajo osteoblasti. Njegova natančna vloga še ni znana. Znano pa je, da ima visoko afiniteto do hidroksipatita, ki je struktura kalcijevega fosfata, ki se veže na DNA.<sup>155</sup> Koncentracija OC v serumu izraža njegovo sintezo v osteoblastih v fazi mineralizacije in je visoko specifičen biokemični kazalec. Prisotnost premalo karboksiliranega OC napoveduje rizičnost za zlome kolka in je v negativni zvezi z BMD.

Porast S-OC se pojavi pri visokem razmerju med kostno izgradnjo in razgradnjo in nakazuje pričakovane spremembe pri tvorbi kosti zaradi kirurških ali terapevtskih posegov.<sup>35</sup>

Rezultati naše raziskave so predstavljeni v preglednicah: XXIII, XXIV, XV in XXVI, iz katerih je razvidno da je polimorfizem Fok I mejno značilen za pOC ( $p = 0,084$ ) v moški

skupini preiskovancev, ki imajo bistveno povišano koncentracijo pOC pri genotipu TT(ff). Zato preiskovanci z genotipom TT izkazujejo pospešeno kostno remodelacijo in ob najnižjih vrednostih BMD bi lahko predpostavljali, da so moški z genotipom TT osebe z večjim tveganjem za razvoj osteoporoze. Vendar naš rezultat nima vrednosti, ker imata polimorfizem ff le dva preiskovanca (Preglednica XXVI).

V vseh ostalih skupinah preiskovank in preiskovancev so bile vrednosti p višje od 0,05, zato nismo našli statistično značilne povezave med preiskovanimi polimorfizmi gena VDR in biokemijskimi kazalci izgradnje kosti. Z našimi rezultati smo podprli že znane raziskave, ki niso potrdile povezave polimorfizmov Bsm I in Fok I z biokemijskimi kazalci izgradnje kosti. Raziskav na področju povezanosti polimorfizma Cdx 2 z biokemijskimi kazalci žal nismo zasledili.

Baltzer s sodelavci pri heterogeni populaciji Nemcev v premenopavzi ni našel nobene povezave genotipa BB s koncentracijo kostne alkalne fosfataze.<sup>132</sup> Prav tako Zmuda s sodelavci ni našel povezave s Fok I polimorfizmom in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije pri zdravih preiskovankah v pomenopavzi.<sup>87</sup> Kim pri Korejkah ni našel povezave med biokem. kazalcem kostno spec. ALP in BMD-ls in proksimalni stegenici.<sup>122</sup> Nasprotno pa je Lofman O s sodelavci je našel povezavo med OC, BALP in BMD.<sup>140</sup>

Tudi raziskave biokemijskih kazalcev ALP in OC, bolnih in zdravih Čehinj v pomenopavzi, niso potrdile povezanosti z Bsm I in Fok I polimorfizmom. Povezanost je nakazana le z Bsm I.<sup>78</sup> Duman ni potrdil povezave med osteokalcinom in Fok I polimorfizmom pri bolnih pomenopavznih ženskah.<sup>110</sup>

Remes s sodelavci, pri moških Fincih ni našel povezave med osteokalcinom v serumu in BMD katerega koli telesa.<sup>103</sup> Braga s sodelavci pri raziskavi moških v Italiji ni našel povezave med polimorfizmi Fok I in BsmI in vrednostjo kostne ALP in estradiola.<sup>119</sup>

Višja koncentracija OC je v nekaterih raziskavah pokazala povezavo z genotipom BB v drugih to ni bilo potrjeno.<sup>133</sup>

**V naši skupini preiskovancev polimorfizmi Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR ne vplivajo na biokemijska kazalca izgradnje kosti: BALP v serumu in osteokalcina v plazmi, zato smo zaključili, da genetski vpliv VDR na kostno izgradnjo ni klinično pomemben.**

#### **4.2.3.2. POVEZANOST POLIMORFIZMOV VDR Z BIOKEMIJSKI KAZALCI RAZGRADNJE KOSTI**

Vpliv polimorfizmov gena VDR na razgradnjo kosti smo ocenjevali na osnovi koncentracije biokemijskih kazalcev razgradnje kosti: C-terminalni telopeptid (CTx), katepsin K.

V procesu resorpcije se z molekule kolagena I odcepi C-terminalni telopeptid. Vrednosti CTx in deoksipiridinolina (DPY) v urinu ter S-CTx napovedujejo verjetnost zlomov pri starejših ženskah. S-CTx nakazuje razlike v kostnem statusu med dekleti v adolescenci in drugimi starostnimi skupinami. Starejše ženske imajo za 23% višje vrednosti CTx glede na ženske v premenopavzi. Hkrati zvišane vrednosti S-CTx in znižanje koncentracije osteokalcina (S-OC) v serumu so povezane z revmatoidnim artritisom.<sup>154</sup>

Katepsin K je cisteinska proteaza in ima pomembno vlogo v kostnem matriksu pri poteku resorpcije kostnega tkiva. Cepi helikalno in telopeptidno regijo kolagena tipa I. Je novejši biokemijski kazalec, ki obeta možnosti razvoja novih terapevtskih učinkovin za inhibicijo resorpcije kostnega tkiva.<sup>155</sup>

Statistični rezultati proučevanja vpliva polimorfizmov Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR na biokemijske kazalce razgradnje kosti: C-terminalni telopeptid (CTx) in katepsin K v štirih skupinah preiskovank in preiskovancev v slovenski populaciji, so predstavljeni v preglednicah: XXIII, XXIV, XXV in XXVI.

Povezanost polimorfizma Fok I je mejno značilna s koncentracijo CTx v preiskovani skupini žensk v premenopavzi ( $p=0,097$ ), ki obsega 25 preiskovank, ki imajo bistveno zvišano koncentracijo CTx-a v urinu in imajo genotip CT oz. polimorfizem Ff (Preglednica XXIII). Ker je višja koncentracija CTx v urinu povezana z intenzivno razgradnjo kosti, bi z nadaljnjimi preiskavami na večji skupini preiskovank lahko pripeljale do jasnejših rezultatov.

Polimorfizem Bsm I pri zdravih preiskovankah v pomenopavzi (17) s haplotipom AG (ff), je mejno značilen ( $p=0,076$ ) za koncentracijo katepsina K (Preglednica XXIV). Preiskovanke imajo bistveno znižano koncentracijo katepsina K, ki se v večjih količinah izloča pri razgradnji kosti. Zato bi lahko imeli heterozigoti polimorfizma Bsm I manjšo verjetnost za obolenost z osteoporozo, kar bi morda razjasnile nadaljnje raziskave.

V naši raziskavi so imele vse preiskovane skupine preiskovancev polimorfizma Cdx 2 vrednosti  $p$  višje od 0,05, zato pri nobeni skupini preiskovank in preiskovancev nismo našli statistično značilne povezave med polimorfizmom Cdx 2 z biokemijskimi kazalci razgradnje kosti. S podobno raziskavo pri Slovenkah je Prezelj s sodelavci na manjši skupini (45) ugotovil, da koncentracija katepsina K ni v korelaciji z drugimi biokemijskimi kazalci in je morda povezan z izgubo kostne gostote.<sup>146</sup>

Druge raziskave so pokazale, da je koncentracija CTx v serumu obratno sorazmerna z BMD-ls in BMD-fn.<sup>140</sup> Tudi koncentracija U-NTX je značilno povezana z izgubo kostne mase in nižjim BMD-ls, tri leta po nastopu menopavze, kar potrjuje, da je presnova kolagena pri patogenezi osteoporoze pomemben dejavnik.<sup>140</sup> Trento s sodelavci je na populaciji Italijank in Italijanov našel povečano koncentracijo CTx v serumu pri preiskovancih z nizkim BMD-ls in BMD-fn v pomenopavzi.<sup>140</sup>

Kalai s sodelavci je pri ženskah v pomenopavzi dokazal, da je večja koncentracija CTx v serumu povezana z nižjo BMD.<sup>144</sup> Meier s sodelavci je pri pacientkah v pomenopavzi obolelih z osteoporozo prišel do zaključkov, da koncentracija katepsina K izraža aktivnost osteoklastov ( $p=0,01$ ).<sup>145</sup>

Tudi raziskave moških so pokazale, da je koncentracija CTx povezana z BMD pri starejših moških.<sup>143</sup>

Če bi nam uspelo dokazati povezanost polimorfizmov na genu za VDR z biokemijskimi kazalci, bi nova dognanja lahko uporabili za zgodnje odkrivanje oseb s povečanim tveganjem za razvoj osteoporoze. Omogočili bi uvedbo presejalnih testov in preventivnih ukrepov (vnos kalcija, fizična aktivnost, način življenja, izogibanje kajenju in alkoholu...) že v mladostnem obdobju, ko poteka intenzivna izgradnja kostnine. S tem bi vsak posameznik lahko zavestno prispeval k doseganju čim višje vrednosti BMD ter zmanjšal tveganje obolevnosti za osteoporozo. Žal nam tega na slovenski populaciji ni uspelo dokazati.

**Polimorfizmi gena VDR: Bsm I, Fok I in Cdx 2 niso povezani s koncentracijo biokemijskih kazalcev razgradnje kosti v serumu: CTx in katepsin K.**

### 4.3.1. RAZŠIRJENOST HAPLOTIPOV POLIMORFIZMOV GENA VDR V SLOVENSKI POPULACIJI

SNP predstavlja variacijo v genskem zapisu, ki nastane zaradi zamenjave enega nukleotida. SNP-i so pogostejši pri posameznih boleznih. Ta variabilnost lahko vpliva na fenotipske razlike med ljudmi. Medsebojne povezave alelov bližnjih polimorfizmov, ki tvorijo kromosomski haplotip, ki je sestavljen iz bolezenskega in markerskega alela, lahko prispevajo več manjših učinkov posameznih alelov in s tem vpliv na razvoj osteoporoze in variacij fenotipa.<sup>45</sup>

Zato nas je zanimalo, če kateri od haplotipov proučevanih polimorfizmov gena VDR vpliva na BMD in biokemijske kazalce, kar bi potrdilo vpliv na razvoj osteoporoze.

Da bi ugotovili povezanost haplotipov z BMD-fn, BMD-tot, BMD-ls, in biokemijskimi kazalci: pOC, BALP, CTx in katepsin K smo uporabili statistične analize. Za analitiko povezanosti haplotipov z BMD-fn, BMD-tot, BMD-ls smo uporabili parametrično metodo ANOVA. Povezanost haplotipov in biokemijskih kazalcev pa smo proučevali z neparametričnim statističnim testom Kruskal – Wallis. Vrednosti p, ki so bile nižje od 0,05 smo ovrednotili za značilno povezanost med primerjanimi parametri.

Raziskave razširjenosti genotipov in njihovih povezav z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije, bi lahko vodile do pomembnih zaključkov in povezav z obolenjem osteoporoze in posledično do prepoznavanja ogroženosti posameznika ali populacije za posamezno obolenje in oblikovanje medicinskega managementa.

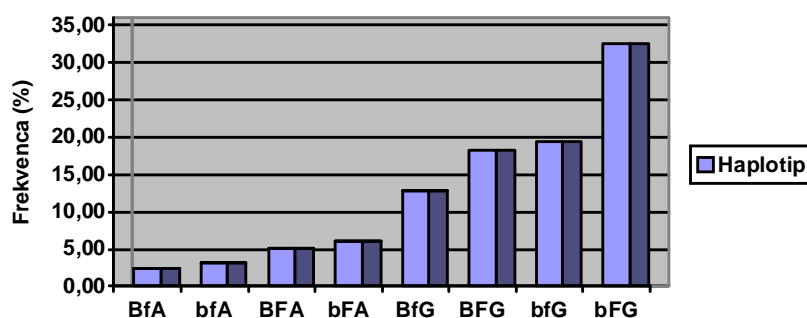
Zato nas je zanimalo, katere kombinacije alelov posameznih polimorfizmov v genu VDR se v slovenski populaciji pojavljajo najpogosteje in kakšni so njihovi vplivi na BMD in biokemijske kazalce kostne remodelacije.

Da bi to ugotovili, smo določili haplotipe in rekonstrukcijo razmerja le teh v štirih skupinah proučevane populacije Slovenk in Slovencev s pomočjo programske opreme PHASE na internetnem naslovu: <http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>.

Izračunali smo najbolj pogoste haplotipe in ugotovili, kateri je najverjetnejši pri posamezniku. V našo raziskavo smo vključili haplotipe, ki se pojavljajo v slovenski populaciji s frekvenco, ki je večja od 0,05.

*Preglednica XXVI: Najpogostejši haplotipi polimorfizmov Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR, ki so zastopani v slovenski populaciji.*

HAPLOTIP	ŠTEVILO	FREKVENCA	STANDARDNA NAPAKA
BFG (ACG)	172	0,182641	0,005764
BFA (ACA)	126	0,051774	0,003662
BfG (ATG)	226	0,129002	0,004919
BfA (ATA)	21	0,023656	0,002958
bFG (GCG)	508	0,325805	0,005716
bFA (GCA)	69	0,061229	0,003656
bfG (GTG)	265	0,194228	0,005023
bfA (GTA)	21	0,031664	0,003210



Slika 29: Zastopanost najpogostejših haplotipov Bsm I, Fok I in Cdx 2 gena VDR v slovenski populaciji.

Iz preglednice XXVII je razvidno, da so najpogostejši haplotipi, katerih frekvenca je večja od 0,05 v slovenski populaciji: bFG, bfG, BFG, BfG, bFA in BFA. Njihova razširjenost je: bFG : bfG : BFG : BfG : bFA : BFA = 0,326 : 0,194 : 0,183 : 0,129 : 0,061 : 0,052.

Na osnovi rezultatov, ki jih predstavlja slika 29 je jasno razvidno, da se v slovenski populaciji haplotip bFA bistveno pogosteje pojavlja, kot haplotipi bfG, BFG, BfG, bFA in BFA, glede na proučevane polimorfizme gena VDR.

#### 4.3.2. OCENA SKUPNIH VPLIVOV POLIMORFIZMOV GENA VDR NA BMD

Rezultati so predstavljeni v tabelah od XXVIII do XXXIII.

**Haplotip BFA** je statistično značilno povezan z BMD-fn ( $p=0,001$ ) (Preglednica XXVIII). 7 bolnih preiskovank, ki so imele haplotip BFA, so imele bistveno višjo vrednost BMD na vratu stegenice, kot 222 bolnih preiskovank z odsotnostjo haplotipa BFA. Zato je haplotip BFA lahko eden od genetskih dejavnikov, ki z majhnim učinkom prispeva v korelaciji z drugimi dejavniki tveganja, kot zaščitni dejavnik pred razvojem osteoporoze, kar bi morale potrditi nadaljne raziskave na večjih populacijah.

V vseh skupinah slovenske populacije, ki smo jih proučevali ima haplotip BFA vrednosti  $p$  višje od 0,05 za BMD- tot, BMD-ls in pOC, zato ni statistično značilen (Tabela 39).

Rezultati kažejo mejno značilnost pri ženskah v premenopavzi s CTx ( $p=0,070$ ), Katepsinom K ( $p=0,099$ ) in pri sBALPm ( $p=0,072$ ) (Tabela 39), vendar je vrednotenje teh rezultatov nesmiselno, ker sta v skupini preiskovank le dve preiskovanki heterozigota, prav tako je pri zdravih ženskah v pomenopavzi nakazana mejna značilnost s Katepsinom K in je v tej skupini le ena preiskovanka heterozigot.

**Haplotip BFA vpliva na BMD-fn ( $p=0,001$ ) in je povezan z razvojem osteoporoze v populaciji osteoporoznih Slovencek.**

**Haplotip bFA** je pri statistični analizi preiskovank in preiskovancev vseh preiskovanih skupin, statistično neznačilen ( $p>0,05$ ) za BMD, pOC, sBALP, CTx in Katepsin K. Mejno je značilen za koncentracijo biokemijskega kazalca kostne izgradnje: pOC ( $p=0,090$ ) in sBALP ( $p=0,079$ ) pri bolnih ženskah v pomenopavzi (Preglednica XXIX). Nakazuje mnogo višjo koncentracijo sBALP pri homozigotih, kar ne daje možnosti za povzemanje zaključkov, ker je v našem primeru s to kombinacijo le ena preiskovanka. Mejno značilen je tudi za

biokemijski kazalec pOC, pri katerih odsotnost haplotipa bFA nakazuje višje koncentracije pOC, kar bi lahko vodilo k zaključku, povezave haplotipa bFA z zmanjšano izgradnjo kosti, a žal nimamo primera homozigotnosti, povezava pa je žal le nakazana.

**Haplotip bFA ni povezan z razvojem osteoporoze v slovenski populaciji.**

Haplotip BfG ima vrednosti  $p$  višje od 0,05 v vseh preiskovanih skupinah za BMD, pOC, sBALP, CTx in katepsin K, zato zanje ni statistično značilen, kaže pa mejno značilnost v skupini preiskovanih moških za BMD-fn ( $p=0,089$ ) (Preglednica XXX). Vendar žal ne moremo povzeti zaključkov, ker je imelo znižane vrednosti BMD na vratu stegenice le 10 moških v heterozigotni kombinaciji, ostali moški pa so imeli odsotnost haplotipa BfG.

**Haplotip BfG ni povezan z razvojem osteoporoze v slovenski populaciji.**

Haplotip BFG v skupini zdravih preiskovank v pomenopavzi je statistično značilen za koncentracijo katepsina K ( $p=0,018$ ) (Preglednica XXXI). V preiskovani skupini je imelo 10 heterozigotnih preiskovancev znižane koncentracije katepsina K, homozigotov žal ni bilo, zato so podatki premalo obsežni in zaključki niso mogoči brez nadaljnjih raziskav večjih skupin preiskovancev. Haplotip BFA je za vse ostale skupine preiskovank in preiskovancev statistično neznačilen glede na BMD, CTx, sBALP in pOC.

**Haplotip BFG ni povezan z razvojem osteoporoze v slovenski populaciji.**

Haplotip bfG je v skupini moških statistično značilen za pOC ( $p=0,005$ ), ki je biokemijski kazalec izgradnje kosti. 7 preiskovancev s heterozigotno kombinacijo ima višje koncentracije pOC, kot 17 preiskovancev z odsotnostjo haplotipa bfG. Žal pa imamo v preiskovani skupini le enega homozihota haplotipa bfG, ki ima še višje koncentracije pOC (Preglednica XXXII). Haplotip bfG vpliva na višje koncentracije pOC, ki je produkt aktivnih osteoblastov, zato zavira razvoj osteoporoze. Haplotip bfG je v skupini bolnih preiskovank v pomenopavzi mejno značilen za biokemijska kazalca kostne resorpcije: CTx ( $p=0,091$ ) in katepsin K ( $p=0,073$ ), kar nakazuje verjetnost vpliva na razvoj osteoporoze. Za vse preiskovane skupine je haplotip bfG statistično neznačilen za BMD in sBALP.

**Haplotip bfG je pri slovenski populaciji moških lahko genetski dejavnik, ki zavira razvoj osteoporoze. Pri bolnih slovenskih ženskah haplotip bfG nakazuje rizičnost za razvoj osteoporoze.**

Haplotip BFG je statistično značilno povezan z pOC ( $p=0,039$ ) pri preiskovankah v premenopavzi. Preiskovanke, ki so v homozigotni kombinaciji imajo bistveno višje koncentracije pOC in torej intenzivnejšo izgradnjo kostnine, zato je haplotip BFG genetski dejavnik, ki napoveduje manjšo nevarnost za razvoj osteoporoze. Visoka aktivnost kostne remodelacije vodi v osteoporozo, zato so smiselne nadaljnje raziskave. Haplotip BFG je mejno značilen za pOC ( $p=0,053$ ) in CTx ( $p=0,072$ ) pri bolnih preiskovankah v pomenopavzi (Preglednica XXXIII).

**V slovenski populaciji je haplotip BFG genetski dejavnik, ki vpliva na izgradnjo kosti in zmanjšuje verjetnost razvoja osteoporoze.**

**Haplotip BFA je povezan z BMD-fn ( $p=0,001$ ), haplotipa bfG ( $p=0,005$ ), in BFG ( $p=0,039$ ), pa s koncentracijo pOC, zato so haplotipi BFA in bfG in BFG verjetno povezani z razvojem osteoporoze v slovenski populaciji in bi lahko imeli pomemben klinični pomen pri preventivi in spremljanju razvoja osteoporoze.**

Preglednica XXVIII: Povezanost haplotipa **BFA** z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije.

0-odsotnost haplotipa, 1- ena kopija, 2-dve kopiji

Statistična analiza : ANOVA test (p) ali kruskal-Wallis test (p<sup>\*</sup>)

Statistično značilna razlika pri p ≤ 0,05

HAPLOTIP BFA (ACA)	ŽENSKES V PREMENOPAVZI			ZDRAVE ŽENSKES V POMENOPAVZI			BOLNE ŽENSKES V POMENOPAVZI			MOŠKI			
	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	
BMD-fn	0	55	0,783 ± 0,078	0,559	210	0,764 ± 0,120	0,972	222	0,621 ± 0,080	<b>0,001</b>	83	0,817 ± 0,161	0,726
	1	2	0,750 ± 0,044		10	0,772 ± 0,161		7	0,729 ± 0,079		6	0,766 ± 0,137	
	2	0	/		1	0,778		0	/		1	0,771	
BMD-tot	0	54	0,920 ± 0,093	0,781	209	0,914 ± 0,129	0,961	221	0,753 ± 0,097	0,183	83	1,032 ± 0,169	0,406
	1	2	0,939 ± 0,041		10	0,909 ± 0,176		7	0,803 ± 0,086		6	0,954 ± 0,073	
	2	0	/		1	0,880		0	/		1	0,898	
BMD-ls	0	55	1,006 ± 0,117	0,762	209	0,973 ± 0,135	0,106	221	0,742 ± 0,089	0,908	106	1,062 ± 0,179	0,441
	1	2	1,981 ± 0,068		10	1,053 ± 0,211		7	0,738 ± 0,091		8	1,018 ± 0,149	
	2	0	/		1	0,814		0	/		2	0,922 ± 0,076	
pOC	0	55	10,569 ± 4,654	0,398*	65	14,715 ± 5,492	0,947*	64	28,557 ± 14,356	0,569*	22	9,945 ± 5,325	0,581*
	1	2	12,350 ± 5,303		3	14,500 ± 5,456		3	28,557 ± 14,356		2	7,600 ± 3,394	
	2	0	/		0	/		0	28,557 ± 14,356		1	4,700	
sBALP	0	55	8,073 ± 3,029	<b>0,072*</b>	42	11,950 ± 3,930	0,236*	105	12,595 ± 5,665	0,189*	/	/	/
	1	2	11,350 ± 0,495		1	7,170		4	28,557 ± 14,356				
	2	0	/		0	/		0	28,557 ± 14,356				
S-CTx	0	54	2733,17±1361,30	<b>0,070*</b>	89	3963,12±1883,00	0,283*	61	4324,40±2347,160	0,601*	18	2051,04±1085,93	0,201*
	1	2	1218,50 ± 204,35		5	3024,54±2095,08		1	4324,40±2347,160		1	2575,00	
	2	0	/		0	/		0	4324,40±2347,160		1	580,60	
Katepsin K	0	55	6,751 ± 13,825	<b>0,099*</b>	40	3,880 ± 4,582	0,800*	0	/	/	0	/	/
	1	2	62,100 ± 81,459		1	1,900		0			0		
	2	0	/		0	/							



Preglednica XXIX: Povezanost haplotipa **bFA** z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije.

0-odsotnost haplotipa, 1- ena kopija , 2-dve kopiji

Statistična analiza : ANOVA test (p) ali kruskal-Wallis test (p<sup>\*</sup>)

Statistično značilna razlika pri p ≤ 0,05

HAPLOTIP bFA (GCA)	ŽENSKE V PREMENOPAVZI			ZDRAVE ŽENSKE V POMENOPAVZI			BOLNE ŽENSKE V POMENOPAVZI			MOŠKI			
	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	
BMD-fn	0	51	0,788 ± 0,075	0,120	190	0,766 ± 0,124	0,453	187	0,621 ± 0,081	0,401	80	0,811 ± 0,166	0,786
	1	5	0,714 ± 0,090		30	0,757 ± 0,102		39	0,637 ± 0,089		10	0,826 ± 0,091	
	2	1	0,790		1	0,619		3	0,652 ± 0,104		0	/	
BMD-tot	0	50	0,928 ± 0,090	0,284	189	0,914 ± 0,132	0,562	186	0,750 ± 0,096	0,103	80	1,027 ± 0,169	0,755
	1	5	0,865 ± 0,108		30	0,919 ± 0,124		39	0,774 ± 0,099		10	1,010 ± 0,130	
	2	1	0,860		1	0,776		3	0,835 ± 0,135		0	/	
BMD-ls	0	51	1,007 ± 0,117	0,939	189	0,977 ± 0,144	0,918	186	0,747 ± 0,091	0,265	105	1,063 ± 0,180	0,237
	1	5	0,988 ± 0,126		30	0,971 ± 0,112		39	0,620 ± 0,079		11	0,997 ± 0,122	
	2	1	1,004		1	0,927		3	0,626 ± 0,051		0	/	
pOC	0	51	10,471 ± 4,708	0,436 <sup>*</sup>	57	14,495 ± 5,043	0,230 <sup>*</sup>	56	29,875 ± 13,723	0,090 <sup>*</sup>	22	9,273 ± 5,084	0,483 <sup>*</sup>
	1	5	11,600 ± 4,418		10	14,990 ± 7,286		11	21,846 ± 16,286		3	11,567 ± 6,519	
	2	1	14,000		1	23,900		0	/		0	/	
sBALP	0	51	8,082 ± 3,074	0,534 <sup>*</sup>	38	11,746 ± 3,528	0,733 <sup>*</sup>	89	12,557 ± 5,712	0,079 <sup>*</sup>	0	/	/
	1	5	9,144 ± 3,092		5	12,538 ± 6,932		19	12,113 ± 4,907		0	/	
	2	1	8,830		0	/		1	25,140		0	/	
S-CTx	0	50	2779,04 ± 1400,21	0,203 <sup>*</sup>	81	3857,15 ± 1776,84	0,223 <sup>*</sup>	48	4430,06 ± 2407,50	0,669 <sup>*</sup>	18	2023,46 ± 1104,10	0,815 <sup>*</sup>
	1	5	1779,60 ± 674,32		12	4502,50 ± 2528,77		12	3801,00 ± 2015,92		2	1826,00 ± 1282,69	
	2	1	2178,00		1	1381,00		2	4929,00 ± 3792,92		0	/	
Katepsin K	0	51	6,704 ± 14,292	0,083 <sup>*</sup>	37	3,6027 ± 4,502	0,404 <sup>*</sup>	9	1,156 ± 1,385	0,289 <sup>*</sup>	0	/	/
	1	5	30,340 ± 50,164		4	5,950 ± 4,943		3	2,300 ± 2,022		0	/	
	2	1	1,900		0	/		0	/		0	/	

Preglednica XXX: Povezanost haplotipa **BfG** z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije.

0-odsotnost haplotipa, 1- ena kopija , 2-dve kopiji

Statistična analiza : ANOVA test (p) ali kruskal-Wallis test (p<sup>\*</sup>)

Statistično značilna razlika pri  $p \leq 0,05$

HAPLOTIP BfG (ATG)	ŽENSKES V PREMENOPAVZI		ZDRAVE ŽENSKES V POMENOPAVZI			BOLNE ŽENSKES V POMENOPAVZI		MOŠKI					
	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	
BMD-fn	0	45	0,772 ± 0,826	0,109	186	0,761 ± 0,122	0,349	195	0,626 ± 0,082	0,717	80	0,823 ± 0,163	0,089
	1	12	0,819 ± 0,037		35	0,782 ± 0,120		34	0,610 ± 0,082		10	0,732 ± 0,083	
	2	0	/		0	/		0	/		0	/	
BMD-tot	0	44	0,913 ± 0,099	0,225	185	0,910 ± 0,133	0,305	194	0,758 ± 0,099	0,776	80	1,032 ± 0,171	0,229
	1	12	0,950 ± 0,053		35	0,935 ± 0,116		34	0,736 ± 0,083		10	0,966 ± 0,085	
	2	0	/		0	/		0	/		0	/	
BMD-ls	0	45	1,009 ± 0,118	0,626	186	0,980 ± 0,145	0,300	195	0,744 ± 0,087	0,123	98	1,063 ± 0,173	0,361
	1	12	0,991 ± 0,106		34	0,953 ± 0,103		33	0,728 ± 0,101		18	1,021 ± 0,192	
	2	0	/		0	/		0	/		0	/	
pOC	0	57	10,796 ± 4,874	0,674 <sup>*</sup>	61	14,826 ± 5,378	0,595 <sup>*</sup>	56	27,884 ± 14,933	0,391 <sup>*</sup>	22	9,682 ± 5,667	0,734
	1	12	10,017 ± 2,826		7	13,657 ± 6,405		11	31,982 ± 10,874		3	8,567 ± 2,312	
	2	0	/		0	/		0	/		0	/	
sBALP	0	45	8,095 ± 3,036	0,891 <sup>*</sup>	38	11,958 ± 4,044	0,589 <sup>*</sup>	91	12,662 ± 5,799	0,782 <sup>*</sup>	0	/	/
	1	12	8,536 ± 3,850		5	10,926 ± 3,386		18	12,255 ± 5,070		0	/	
	2	0	/		0	/		0	/		0	/	
CTx	0	44	2693,48±1412,40	0,984 <sup>*</sup>	83	3907,45±1864,94	0,936 <sup>*</sup>	56	4238,53±2401,29	0,383 <sup>*</sup>	17	1971,66±1111,26	0,763
	1	12	2626,25±1238,05		11	3956,49±2202,94		6	5125,83±1711,86		3	2185,33±1132,33	
	2	0	/		0	/		0	/		0	/	
Katepsin K	0	45	9,598 ± 22,518	0,645 <sup>*</sup>	36	3,669 ± 4,064	0,952 <sup>*</sup>	0	/	/	0	/	/
	1	12	5,300 ± 5,902		5	5,000 ± 7,698		0	/		0	/	
	2	0	/		0	/		0	/		0	/	

Preglednica XXXI: Povezanost haplotipa **BFG** z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije.

0-odsotnost haplotipa, 1- ena kopija , 2-dve kopiji

Statistična analiza : ANOVA test (p) ali kruskal-Wallis test (p<sup>\*</sup>)

Statistično značilna razlika pri  $p \leq 0,05$

HAPLOTIP BFG (ACG)	ŽENSKES V PREMENOPAVZI			ZDRAVE ŽENSKES V POMENOPAVZI			BOLNE ŽENSKES V POMENOPAVZI			MOŠKI		
	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p
BMD-fn 0	34	0,785 ± 0,062	0,758	121	0,767 ± 0,122	0,756	141	0,620 ± 0,084	0,376	33	0,789 ± 0,144	0,277
	1	0,778 ± 0,097		100	0,761 ± 0,121		88	0,630 ± 0,079		57	0,827 ± 0,166	
	2	/		0	/		0	/		0	/	
BMD-tot 0	33	0,933 ± 0,073	0,411	120	0,914 ± 0,1329	0,974	141	0,751 ± 0,101	0,462	33	1,002 ± 0,145	0,316
	1	0,904 ± 0,113		100	0,913 ± 0,133		87	0,761 ± 0,052		57	1,038 ± 0,175	
	2	/		0	/		0	/		0	/	
BMD-ls 0	34	1,016 ± 0,117	0,425	120	0,968 ± 0,142	0,344	141	0,738 ± 0,096	0,578	48	1,058 ± 0,174	0,959
	1	0,991 ± 0,113		100	0,986 ± 0,137		87	0,748 ± 0,076		68	1,055 ± 0,179	
	2	/		0	/		0	/		0	/	
pOC 0	34	10,347 ± 4,220	0,631 <sup>*</sup>	42	14,400 ± 5,808	0,560 <sup>*</sup>	41	27,412 ± 14,651	0,417 <sup>*</sup>	10	9,970 ± 6,243	0,747 <sup>*</sup>
	1	11,052 ± 5,262		26	15,200 ± 4,886		26	30,362 ± 13,969		25	9,267 ± 4,535	
	2	/		0	/		0	/		0	/	
sBALP 0	34	8,055 ± 3,104	0,620 <sup>*</sup>	29	11,753 ± 4,020	0,841 <sup>*</sup>	68	12,743 ± 5,210	0,728 <sup>*</sup>	0	/	/
	1	8,385 ± 2,992		14	12,016 ± 3,947		41	12,351 ± 6,410		0	/	
	2	/		0	/		0	/		0	/	
CTx 0	33	2456,97±1253,8	0,164 <sup>*</sup>	57	3755,36±1921,8	0,319 <sup>*</sup>	36	4071,80±2559,8	0,323 <sup>*</sup>	9	2135,37±1298,67	0,637 <sup>*</sup>
	1	2997,74±1484,2		37	4156,34±1850,8		26	4674,15±2012,4		11	1896,00±930,6	
	2	/		0	/		0	/		0	/	
Katepsin K 0	34	8,274 ± 20,539	0,845 <sup>*</sup>	28	4,825 ± 1,867	0,018 <sup>*</sup>	5	1,060 ± 1,250	0,498 <sup>*</sup>	0	/	/
	1	9,313 ± 20,151		13	1,692 ± 4,535		7	1,714 ± 1,778		0	/	
	2	/		0	/		0	/		0	/	

Preglednica XXXII: Povezanost haplotipa **bfG** z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije.

0-odsotnost haplotipa, 1- ena kopija , 2-dve kopiji

Statistična analiza : ANOVA test (p) ali kruskal-Wallis test (p<sup>\*</sup>)

Statistično značilna razlika pri  $p \leq 0,05$

HAPLOTIP bfG (GTG)	ŽENSKE V PREMENOPAVZI			ZDRAVE ŽENSKE V POMENOPAVZI			BOLNE ŽENSKE V POMENOPAVZI			MOŠKI			
	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	
BMD-fn	0	27	0,776 ± 0,092	0,856	136	0,771±0,122	0,518	131	0,627 ± 0,086	0,856	54	0,811 ± 0,147	0,552
	1	25	0,788 ± 0,065		69	0,750±0,116		86	0,621 ± 0,077		33	0,824 ± 0,180	
	2	5	0,781 ± 0,050		16	0,768±0,143		12	0,616 ± 0,077		3	0,720 ± 0,113	
BMD-tot	0	27	0,909 ± 0,110	0,659	135	0,916±0,130	0,750	130	0,759 ± 0,097	0,648	54	1,030 ± 0,164	0,663
	1	25	0,931 ± 0,070		69	0,906±0,129		86	0,747 ± 0,096		33	1,025 ± 0,170	
	2	4	0,937 ± 0,093		16	0,932±0,144		12	0,766 ± 0,112		3	0,940 ± 0,162	
BMD-ls	0	27	0,992 ± 0,125	0,195	136	0,977±0,146	0,627	130	0,734 ± 0,088	0,306	72	1,045 ± 0,188	0,589
	1	25	1,003 ± 0,101		68	0,980±0,123		86	0,746 ± 0,090		39	1,080 ± 0,162	
	2	4	1,093 ± 0,115		16	0,944±0,156		12	0,775 ± 0,087		5	1,037 ± 0,102	
pOC	0	27	10,900 ± 4,021	0,672 <sup>*</sup>	42	14,450 ± 6,167	0,711 <sup>*</sup>	37	26,276±14,970	0,264 <sup>*</sup>	17	8,353± 4,399	0,005 <sup>*</sup>
	1	25	10,560 ± 5,556		22	15,427 ± 4,227		26	32,169±13,478		7	10,343± 3,780	
	2	5	9,540 ± 2,930		4	13,425 ± 3,397		4	26,175±12,096		1	24,300	
sBALP	0	27	8,267 ± 2,677	0,846 <sup>*</sup>	22	11,198 ± 4,513	0,565 <sup>*</sup>	61	12,863 ± 5,857	0,856 <sup>*</sup>	0	/	/
	1	25	8,208 ± 3,553		17	12,521 ± 3,335		42	12,228 ± 5,582		0	/	
	2	5	7,662 ± 2,510		4	12,458 ± 3,239		6	12,452 ± 4,899		0	/	
CTx	0	27	2566,85±1207,24	0,962 <sup>*</sup>	52	3711,64±2006,13	0,514 <sup>*</sup>	42	4226,24±2263,98	0,091 <sup>*</sup>	13	1811,56±978,01	0,359 <sup>*</sup>
	1	24	2764,67±1212,44		35	4186,31±1767,26		17	4999,94±2418,16		6	2193,17±1297,11	
	2	5	2960,60±1597,89		7	4044,86±1706,00		3	1870,50±1749,63		1	3365,00	
Katepsin K	0	27	7,868 ± 17,521	0,134 <sup>*</sup>	21	3,776 ± 4,726	0,467 <sup>*</sup>	9	1,911 ± 1,522	0,073 <sup>*</sup>	0	/	/
	1	25	7,868 ± 17,521		16	3,294 ± 3,602		3	0,033 ± 0,058		0	/	
	2	5	1,280 ± 1,522		2	6,275 ± 7,137		0	/		0	/	

Preglednica XXXIII: Povezanost haplotipa **bFG** z BMD in biokemijskimi kazalci kostne remodelacije.

Podatki z oznako / niso bili izračunani zaradi neustreznosti razporeditve haplotipov za statistično obdelavo.

0-odsotnost haplotipa, 1- ena kopija , 2-dve kopiji

Statistična analiza : ANOVA test (p) ali kruskal-Wallis test (p\*)

Statistično značilna razlika pri  $p \leq 0,05$

HAPLOTIP bFG (GCG)	ŽENSKÉ V PREMENOPAVZI			ZDRAVE ŽENSKÉ V POMENOPAVZI			BOLNE ŽENSKÉ V POMENOPAVZI			MOŠKI			
	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	ŠT.	VREDNOST	p	
BMD-fn 0	36	0,779 ± 0,074	0,697	122	0,769 ± 0,128	0,543	142	0,632 ± 0,084	0,343	57	0,806 ± 0,148	0,434	
	1	15		0,779 ± 0,086	65		0,750 ± 0,101	58		0,616 ± 0,071	25		0,843 ± 0,192
	2	6		0,808 ± 0,088	34		0,773 ± 0,135	29		0,602 ± 0,093	8		0,766 ± 0,117
BMD-tot 0	35	0,914 ± 0,094	0,441	122	0,927 ± 0,134	0,158	142	0,763 ± 0,095	0,348	57	1,008 ± 0,139	0,330	
	1	15		0,922 ± 0,071	64		0,889 ± 0,122	57		0,741 ± 0,093	25		1,067 ± 0,224
	2	6		0,961 ± 0,129	34		0,912 ± 0,128	29		0,741 ± 0,013	8		1,018 ± 0,109
BMD-ls 0	36	1,001 ± 0,101	0,957	121	0,980 ± 0,136	0,787	141	0,742 ± 0,081	0,815	78	1,055 ± 0,169	0,954	
	1	15		1,013 ± 0,134	65		0,966 ± 0,135	58		0,738 ± 0,102	28		1,064 ± 0,195
	2	6		1,017 ± 0,168	34		0,979 ± 0,161	29		0,750 ± 0,101	10		1,047 ± 0,194
pOC 0	36	10,919 ± 4,703	0,039*	36	14,822 ± 4,894	0,717*	43	28,137 ± 12,996	0,053*	14	10,371 ± 5,497	0,581*	
	1	15		8,913 ± 4,364	20		15,175 ± 6,158	15		34,720 ± 16,272	9		8,933 ± 5,050
	2	6		13,200 ± 3,904	12		13,575 ± 6,112	9		20,289 ± 14,182	2		6,550 ± 3,748
sBALP 0	36	8,657 ± 3,179	0,271*	22	12,019 ± 4,568	0,793*	68	12,295 ± 65,530	0,775*	0	/	/	
	1	15		7,213 ± 2,813	15		11,989 ± 3,325	30		13,040 ± 6,539	0		/
	2	6		7,813 ± 2,403	6		10,798 ± 3,322	11		13,239 ± 4,003	0		/
CTx 0	36	2814,19 ± 1433,08	0,696*	53	3912,19 ± 1931,25	0,576*	40	4038,11 ± 1982,16	0,072*	11	1902,33 ± 995,98	0,201*	
	1	14		2322,86 ± 1115,71	28		4128,04 ± 2039,99	11		5786,45 ± 2787,04	7		2465,86 ± 1201,62
	2	6		2699,50 ± 1561,04	13		3454,54 ± 1396,87	11		3903,38 ± 2764,27	2		943,85 ± 35,14
Katepsin K 0	36	9,036 ± 23,079	0,313*	20	4,935 ± 5,651	0,499*	7	1,314 ± 1,782	0,789*	0	/	/	
	1	15		10,067 ± 13,554	15		2,753 ± 2,827	3		2,000 ± 1,735	0		/
	2	6		3,233 ± 5,083	6		2,850 ± 3,361	2		1,050 ± 0,212	0		/

*Preglednica XXXIV: Pregled povezanosti polimorfizmov Bsm I, Fok I, Cdx 2 in haplotipov BFA, bFA, BfG, BFG, bfG, bFG gena VDR v posameznih preiskovanih skupinah glede na BMD in biokemijske kazalce.*

*Rdeča – statistično značilni rezultati, povdarjena črna – mejno statistično značilni rezultati*

		Premenopavza	Pomenopavza zdrave	Pomenopavza osteoporoza	Pomenopavza skupaj	Moški
BMD-fn (p)	Bsm I	0,664	0,667	<b>0,055</b>	0,239	0,144
	Fok I	0,608	0,779	0,792	0,355	<b>0,040</b>
	Cdx 2	<b>0,011</b>	0,733	<b>0,041</b>	0,145	0,943
	BFA	0,559	0,972	<b>0,001</b>	<b>0,081</b>	0,726
	bFA	0,120	0,453	0,401	0,752	0,786
	BfG	0,109	0,349	0,717	0,856	<b>0,089</b>
	BFG	0,758	0,756	0,367	0,747	0,277
	bfG	0,856	0,518	0,856	0,256	0,552
BMD-tot (p)	Bsm I	0,982	0,699	0,156	0,405	0,158
	Fok I	0,488	0,382	0,436	0,419	0,167
	Cdx 2	<b>0,011</b>	0,931	0,171	0,394	0,748
	BFA	0,781	0,961	0,183	0,556	0,406
	bFA	0,284	0,562	0,103	0,924	0,755
	BfG	0,225	0,305	0,776	0,887	0,229
	BFG	0,411	0,974	0,462	0,737	0,316
	bfG	0,659	0,750	0,648	0,193	0,663
BMD-ls (p)	Bsm I	0,813	0,307	0,590	0,255	0,223
	Fok I	0,239	0,217	0,787	<b>0,044</b>	<b>0,036</b>
	Cdx 2	0,430	0,330	0,184	<b>0,019</b>	0,549
	BFA	0,762	0,106	0,908	0,333	0,441
	bFA	0,939	0,918	0,265	0,166	0,237
	BfG	0,626	0,300	0,123	0,381	0,361
	BFG	0,425	0,344	0,578	0,176	0,959
	bfG	0,195	0,627	0,306	0,733	0,589
pOC (p)	Bsm I	0,363	0,649	0,707	0,234	0,510
	Fok I	0,160	0,902	0,265	<b>0,034</b>	<b>0,084</b>
	Cdx 2	0,412	0,851	0,594	0,952	0,387
	BFA	0,398	0,947	0,569	0,921	0,581
	bFA	0,436	0,230	<b>0,090</b>	0,200	0,483
	BfG	0,674	0,595	0,391	0,246	0,734
	BFG	0,631	0,560	0,417	0,273	0,747
	bfG	0,672	0,711	0,264	<b>0,046</b>	<b>0,005</b>
sBALP (p)	Bsm I	0,430	0,514	0,967	0,854	/
	Fok I	0,993	0,557	0,725	0,948	/
	Cdx 2	0,195	0,451	0,482	0,818	/
	BFA	<b>0,072</b>	0,236	0,189	<b>0,099</b>	/
	bFA	0,534	0,733	<b>0,079</b>	<b>0,049</b>	/
	BfG	0,984	0,936	0,383	0,682	0,763
	BFG	0,620	0,841	0,728	0,838	/
	bfG	0,846	0,565	0,856	0,992	/
CTx (p)	Bsm I	0,539	0,475	0,938	0,669	0,635
	Fok I	<b>0,097</b>	0,782	0,747	0,939	0,316
	Cdx 2	0,239	0,287	0,275	0,346	0,820
	BFA	<b>0,070</b>	0,283	0,601	0,214	0,201
	bFA	0,203	0,223	0,669	0,948	0,815
	BfG	0,984	0,936	0,383	0,542	0,763
	BFG	0,164	0,319	0,323	0,149	0,637
	bfG	0,962	0,514	<b>0,091</b>	0,208	0,359
Katepsin K (p)	Bsm I	0,509	<b>0,076</b>	0,417	0,284	/
	Fok I	0,940	0,557	0,662	0,344	/
	Cdx 2	0,241	0,223	0,849	0,721	/
	BFA	<b>0,099</b>	0,800	/	0,948	/
	bFA	0,083	0,404	0,289	0,378	/
	BfG	0,645	0,952	/	0,831	/
	BFG	0,845	<b>0,018</b>	0,498	<b>0,035</b>	/
	bfG	0,134	0,467	0,789	0,296	/
	bFG	0,313	0,499	0,789	0,822	/

Ob zaključku smo želeli povzeti vse rezultate. Pripravili smo pregledno tabelo in združili vrednosti p iz posameznih statističnih analiz. Iz preglednice XXXIV je razvidno, da posamezni polimorfizmi bolj izkazujejo vplive na vrednosti BMD, predvsem na BMD v predelu stegenice. Pri tem izstopa polimorfizem Cdx 2. Nasprotno pa haplotipi v glavlini izkazujejo vpliv na biokemične kazalce. Najmočnejši se kaže na koncentracijo pOC (bfG in bFG) ter katepsin K (BFG).

## SKLEPI

Namen našega dela je bil ugotoviti povezanost razvoja osteoporoze s polimorfizmi: *BsmI* (E8-G+284A, rs 1544410), *FokI* (E2-C4T, rs 10735810) in *Cdx2* (1e-G-1739A, rs 11568820), BMD in biokemijskimi kazalci tvorbe kosti: kostna specifična alkalna fosfataza (BALP), osteokalcin (OC) in biokemijskimi kazalci razgradnje kosti: C-terminalni telopeptid (CTX), katepsin K. posebej nas je zanimala katera kombinacija alelov polimorfizmov *Bsm I*, *Fok I* in *Cdx 2* vplivajo na BMD in biokemijske kazalce.

V raziskavo smo vključili 508 preiskovank in 117 preiskovancev, skupaj 625 preiskovancev v slovenski populaciji.

V naši raziskavi smo ugotovili:

- Frekvence genotipov polimorfizmov *Bsm I*, *Fok I* in *Cdx 2* v slovenski populaciji so: BB:Bb:bb = 0,16:0,46:0,38; FF:Ff:ff = 0,39:0,45:0,15 in GG:GA:AA = 0,70:0,26:0,04.
- Moški imajo statistično značilno razliko razširjenosti genotipov polimorfizma *Bsm I* glede na ženske v preiskovani skupini Slovenk in Slovencev. Slovenke imamo nižjo zastopanost genotipa BB, nasprotno pa je genotip bb manj zastopan pri Slovencih.
- Razširjenost genotipov polimorfizma *Fok I* je značilno različna med zdravimi in osteoporoznimi ženskami v pomenopavzi. Zastopanost genotipa FF in BB je večja med zdravimi glede na ženske v pomenopavzi, ki so obbolele z osteoporozo.
- Polimorfizem *Bsm I* ne vpliva na BMD na področju ledvenih vretenc, kolka in medenice v slovenski populaciji, zato verjetno ne vpliva na razvoj osteoporoze.
- Polimorfizem *Fok I* je značilno povezan z BMD-ls ( $p=0,036$ ) in BMD-fn ( $p=0,040$ ) pri slovenski populaciji moških, pri ženskah pa povezanosti nismo dokazali.
- Polimorfizem *Cdx 2* je samo v premenopavznem obdobju pri ženskah značilno povezan z BMD-tot in BMD-fn. Zato bi z nadaljnjimi raziskavami lahko bil ključni dejavnik zgodnje diagnostike in preventive pri razvoju osteoporoze.
- Polimorfizmi *Bsm I*, *Fok I* in *Cdx 2* gena VDR posamezno ne vplivajo na biokemične kazalce izgradnje kosti, prav tako ne na biokemijske kazalce razgradnje kosti, zato smo zaključili, da genetski vpliv VDR na kostno remodelacijo ni klinično pomemben.
- Najpogostejši haplotipi in njihove frekvence za polimorfizme *Bsm I*, *Fok I* in *Cdx 2* v slovenski populaciji so: bFG : bfG : BFG : BfG : bFA : BFA = 0,326 : 0,194 : 0,183 : 0,129 : 0,061 : 0,052.
- V slovenski populaciji se haplotip bFA bistveno pogosteje pojavlja, kot haplotipi bfG, BFG, BfG, bFA in BFA, glede na proučevane polimorfizme gena VDR.
- Haplotip BFA je povezan z BMD-fn ( $p=0,001$ ), haplotipa bfG ( $p=0,005$ ), in bFG ( $p=0,039$ ), pa s koncentraciji pOC, zato so haplotipi BFA in bfG in bFG verjetno povezani z razvojem osteoporoze v slovenski populaciji in imajo pomemben klinični pomen pri preventivi in spremljanju razvoja osteoporoze.

Naše raziskave so potrdile povezanost medgenskih interakcij v genu VDR z BMD in biokemijskimi kazalci, tako kot nekatere druge študije. Zato lahko zaključimo, da je gen za VDR receptor povezan z razvojem osteoporoze pri slovenski populaciji žensk in moških, vendar ne daje enoznačnega odgovora. Vse to pa podpira študije, ki utemeljujejo, da je osteoporoza poligenska in večfaktorska bolezen in da so raziskave na mnogih populacijah nujne, da bi lahko povezali vse dejavnike razvoja osteoporoze in razumeli korelacije okolje-fenotip-genotip.



## LITERATURA

1. Prelević GM Postmenopausal osteoporosis-definition, pathogenesis, prevention and therapy, Serbian 1991,119(5-6):155-61.
2. Bonnick SL: Osteoporosis in men and women, University of North Texas Denton 2006, 8(1):28-39.
3. Ralston SH, Galwey N, MacKay I, Albagha OME, Cardon L, Compston JE, Cooper C, Duncan E, Keen R, Langdahl B, McLellan A, Riordan J, Pols HA, Reid DM, Uitterlinden AG, Wass J, Bennett ST: Loci for regulation of bone mineral density in men and women identified by genome wide linkage scan: the FAMOS study, Human Molecular Genetics 2005, 14 (7).
4. Simonič J: Osteoporoza ogroža tudi moške, Finance: 13.2. 2003.
5. Žorž G:Prevalenca osteoporoze v Sloveniji, ISIS, marec 1994: 34-37.
6. World Health Organisation. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Tech Report Series 1994, 843:1-129.
7. Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA, Melton LJ 3rd, Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes; J Clin Invest. 1982 Oct;70(4):716-23.
8. Berger C, Langsetmo L, Joseph L, Hanley DA, Davison KS, Josse R, Kreiger N, Tenenhouse A, Goltzman D, Change in bone mineral density as a function of age in women and men and association with the use of antiresorptive agents; Canadian Multicentre Osteoporosis Study Research Group 2008;17: 178(13):1660-8.
9. Metcalfe D, The pathophysiology of osteoporotic hip fracture; University of Warwick Coventry 2008; 11(1):51-57
10. Karlsson C, Obrant KJ, Karlsson M. Pregnancy and lactation confer reversible bone loss in humans. Osteoporos Int. 12:828-834; 2001.
11. Hochberg MC, Racial differences in bone strength, Transactions of the American clinical and climatological association, 2007, 118.
12. Keramat A, Mithal A, Risk factors for osteoporosis in urban Asian Indian women presenting for a preventive health checkup. 2nd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, Geneva 2005, June: 25-29.
13. Feskanich D, Weber P, Willett WC, Rockett H, Booth SL, Colditz GA. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. Am J Clin Nutr, 1999, 69:74-79.
14. Riess H, Loew A, Himmelreich G, Secondary osteoporosis induced by anticoagulants?, Medizinische Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Fakultät, Humboldt-Universität, Berlin, 2001,30(7):451-5.
15. Woo JT, Yonezawa T, Cha BY, Teruya T, Nagai K, Pharmacological Topics of Bone Metabolism: Antiresorptive Microbial Compounds That Inhibit Osteoclast Differentiation, Function, and Survival, J Pharmacol Sci, 2008, 106, 547 – 554.
16. Van der Eerden AW, den Heijer M, Oyen WJ, Hermus AR, Cushing's syndrome and bone mineral density: lowest Z scores in young patients; Department of Endocrinology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands 2007, 65(4):137-41.
17. Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. Lancet 2002, 359:1841-1850.

18. Balasch J, Sex steroids and bone: current perspectives; Institut ClòÀnic of Gynecology and Obstetrics 2003, 9 (3): 207-222.
19. Wolfert A, Mehler PS, Osteoporosis: prevention and treatment in anorexia nervosa, Eat Weight Disord. 2002 Jun, 7(2):72-81.
20. Bezza A, Ouzzif Z, Najji H, Achemlal L, Mounach A, Nouijai M, Bourazza A, Mossadeq R, El Maghraoui A, Prevalence and risk factors of osteoporosis in patients with Parkinson's disease, Rheumatol Int., 2008 Jul 1.
21. Scillitani A, Battista C, Chiodini I, Carnevale V, Fusilli S, Ciccarelli E, Terzolo M, Oppizzi G, Arosio M, Gasperi M, Arnaldi G, Colao A, Baldelli R, Ghiggi MR, Gaia D, Di Somma C, Trischitta V, Liuzzi A, Bone mineral density in acromegaly: the effect of gender, disease activity and gonadal status; Clin Endocrinol (Oxf). 2003 Jun;58(6):725-31.
22. Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA, Principles of Physiology, Fourth Edition
23. Chiappetta N, Gruber B, The role of mast cells in osteoporosis; Semin Arthritis Rheum. 2006 Aug, 36(1):32-6.
24. Berger C, Langsetmo L, Joseph L, Hanley DA, Davison KS, Josse R, Kreiger N, Tenenhouse A, Goltzman D, Change in bone mineral density as a function of age in women and men and association with the use of antiresorptive agents; Canadian Multicentre Osteoporosis Study Research Group 2008, 17: 178(13):1660-1668.
25. Kola I, Hertzog PJ, Animal models in the study of the biological function of genes on human chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down syndrome, Hum. Mol. Genet. 1997, 6:1723-1727.
26. <http://academic.brooklyn.cuny.edu/phyped/yingling/anatomy/osteoporosis.htm>, 15.5.2009.
27. Downey PA, Siegel MI, Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis; Phys Ther. 2006 Jan, 86(1):77-91.
28. Bonewald LF, Osteocyte biology: Its implications for osteoporosis; J Musculoskel Neuron Interact 2004; 4(1):101-104.
29. Massey LK. Effect of dietary salt intake on circadian calcium metabolism, bone turnover, and calcium oxalate kidney stone risk in postmenopausal women. Nutrition Research 2005; 25:891-903.
30. Hannan MT, Tucker KL, Dawson-Hughes B, Cupples LA, Felson DT, Kiel DP. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: the Framingham osteoporosis study. J Bone Min Res. 2000, 15:2504-2512.
31. Lerner UH, Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis; J Dent Res 2006; 85(7):584-595.
32. Borovecki F, Pecina-Slaus N, Vukicevic S, Biological mechanisms of bone and cartilage remodelling—genomic perspective 2007, International Orthopaedics (SICOT); 31:799–805.
33. Karsenty G, The genetic transformation of bone biology; Genes & Dev. 1999, 13: 3037-3051.
34. McCormick RK, Osteoporosis: Integrating Biomarkers and Other Diagnostic Correlates into the Management of Bone Fragility 2007, Alternative Medicine Review, 12 (2).
35. Eastell R, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek L, Biochemical and Clinical Perspectives 2001.
36. Vokes TJ, Gillen DL, Pham AT, B.A., Lovett JM, Risk factors for prevalent vertebral fractures in black and white female densitometry patients, J Clin Densitom. 2007, 10(1): 1–9.

37. Dayal M, Barnhart KT, Noncontraceptive benefits and therapeutic uses of the oral contraceptive pill, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA, 2001, 19(4):295-303
38. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP, Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93 (12): 4649-4655
39. Lane NE. An update on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.*, 2001, 27:235-253.
40. Huybers S, Naber Th, Bindels RJ, Hoenderop JG. Prednisolone-induced Ca<sup>2+</sup> malabsorption is caused by diminished expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV6. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 292:92-97.
41. Riess H, Loew A, Himmelreich G, Secondary osteoporosis induced by anticoagulants?, *Medizinische Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Fakultät, Humboldt-Universität, Berlin*, 2001;30(7):451-5.
42. Woo JT, Yonezawa T, Cha BY, Teruya T, Nagai K, Pharmacological Topics of Bone Metabolism: Antiresorptive Microbial Compounds That Inhibit Osteoclast Differentiation, Function, and Survival, *J Pharmacol Sci.* 2008, 106: 547 – 554.
43. Okabe R., Nakatsuka K., Inaba M., Miki M., Naka H. Clinical Evaluation of the Elecsys b-CrossLaps Serum Assay, a New Assay for Degradation Products of Type I Collagen C-Telopeptides. 2001. *Clinical Chemistry* 47(8): 1410–1414.
44. Ralston SH, Genetic Control of Susceptibility to Osteoporosis; 2002, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(6):2460-2466.
45. Mueller RF, Young ID, Emery's Elements of Medical Genetics, 10th & 11th edition (Harcourt Publishers Limited, 1998, 2001).
46. Shen H, Recker RR, Deng HW: Molecular and Genetic Mechanisms of Osteoporosis: Implication for Treatment, *Current Molecular Medicine* 2003, 3:737-757.
47. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JBJ, Pols HAP, van Leeuwen JPTM, Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms, *Gene* 2004, 338:143-156.
48. Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroum T, Genetics of Osteoporosis, *Endocrine Reviews* 2002, 23(3):303-326.
49. Lau HHL, Ng MYM, Cheung WMW, Paterson AD, Sham PC, Luk KDK, Chan V, KungAWC: Assessment of linkage and association of 13 genetic loci with bone mineral density; *J Bone Miner Metab* 2006, 24:226-234.
50. Fang Y, Meurs JBJ, Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, Hofman A, Leeuwen PT, Jehan F, Pols HAP, Uitterlinden AG: Promoter and 3'-Untranslated-Region Haplotypes in the Vitamin D Receptor Gene Predispose to osteoporotic Fracture: The Rotterdam Study; *The American Society of Human Genetics* 2005, 77:807-823.
51. Miyamoto K, Kesterson RA†, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW, Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter, *Molecular Endocrinology* 1997, 11:1165-1179.
52. Norman AW, A vitamin D nutritional cornucopia: new insights concerning the serum 25-hydroxyvitamin D status of the US population, *Am J Clin Nutr.* 2008 Dec, 88(6):1519-27.
53. Ralston SH, Genetic markers of bone metabolism and bone disease; *Scand J Lab Invest* 1997; 57 (227): 114-121.

54. Gunther T, Chen ZF, Kim J, Primel M, Rueger JM, Amling M, Mosley JM, Martin TJ, Anderson DJ, Karsenty G. Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone; *Nature* 2000, 406:199-203.
55. Macdonald HM, McGuigan FE, Stewart A, Black AJ, Fraser WD, Ralson S, Reid DM: Large-Scale Population-Based Study Shows No Evidence of Association Between Common Polymorphism of the VDR Gene and BMD in British Women; *Journal of Bone and Mineral Research* 2006, 1(1).
56. Uitterlinden AG, Fang Y, Bergink AP, van Meurs JB, van Leeuwen HP, Pols HA, The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in bone biology, *Mol Cell Endocrinol* 2002, 197:15-21.
57. Vozelj M, Temelji imunologije, DZS, d.d. 2000, 5:91-120.
58. Stewart TL, Ralston SH, Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis, 2000, *Journal of Endocrinology*, 166, 235–245.
59. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reeve J, The Association between Common Vitamin D Receptor Gene Variations and Osteoporosis: A Participant-Level Meta-Analysis, 2006, *Annals of Internal Medicine*, 145 (4), 255-265.
60. Fang Y, van Meurs JB, Bergink AP, Hofman A, van Duijn CM, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG, Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly, *J Bone Miner Res.* 2003, 18(9):1632-1641.
61. Šircelj M: Razvoj hkratne analize BsmI in FokI polimorfizmov v genu za receptor vitamina D, UNI FFA 2004.
62. Boyer R, *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques*, *Biochemistry – Laboratory manuals*, I. 2006, 309-327.
63. <http://www2.mtroyal.ab.ca/~tnickle/3311/supplement/PCR.jpg>, 15.5.2009.
64. Di Bon T, Vpliv sprememb genov za receptor vitamina D in za alfa 1 verigo kolagena I na mineralno kostno gostoto, *Diplomska naloga*, UNI FFA Ljubljana 2003.
63. Morrison NA, Qi JC, Tokita A et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:284–287 (Corrections) *Nature* 1997, 387:106.
64. Laaksonen MM, Kärkkäinen MU, Outila TA, Rita HJ, Lamberg-Allardt CJ, Vitamin D receptor gene start codon polymorphism (FokI) is associated with forearm bone mineral density and calcaneal ultrasound in Finnish adolescent boys but not in girls, *J Bone Miner Metab.* 2004, 22(5):479-85.
65. Ferrari S, Rizzoli R, Manen D, Slosman D, Bonjour JP, Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density: interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms, *J Bone Miner Res.* 1998 Jun;13(6):925-30.
66. Eckstein M, Vered I, Ish-Shalom S, Shlomo AB, Shtriker A, Koren-Morag N, Friedman E., Vitamin D and calcium-sensing receptor genotypes in men and premenopausal women with low bone mineral density, *Isr Med Assoc J.* 2002 May;4(5):340-344.
67. Zhao J, Zhou X, Meng X, Liu G, Xing X, Liu H, Xu L., Polymorphisms of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteocalcin in Chinese, *Chin Med J (Engl).* 1997 May, 110(5):366-71.
68. Lu LJ, Nayeem F, Anderson KE, Grady JJ, Nagamani M., Lean Body Mass, Not Estrogen or Progesterone, Predicts Peak Bone Mineral Density in Premenopausal Women, *J Nutr.* 2008 Dec, 23.
69. Chen WJ, Qiu Y, Zhu F, Zhu ZZ, Sun X, Liu Z, Chen ZJ, Vitamin D receptor gene polymorphisms: no association with low bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis girls; *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2008 Aug 1;46(15):1183-6.

70. Dvornyk V, Liu PY, Long JR, Zhang YY, Lei SF, Recker RR, Deng HW, Contribution of genotype and ethnicity to bone mineral density variation in Caucasians and Chinese: a test for five candidate genes for bone mass, *Chin Med J (Engl)*. 2005 Aug 5;118(15):1235-1244.
71. Gourlay ML, Brown SA, Clinical Considerations in Premenopausal Osteoporosis, *Arch Intern Med*. 2004;164:603-614.
72. Ferrari SL, Rizzoli R, Slosman DO, Bonjour JP, Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphisms?, *J Bone Miner Res*. 1998 Mar;13(3):363-70.
73. Liang MT, Bassin S, Dutto D, Braun W, Wong N, Pontello AM, Cooper DM, Arnaud SB, Bone mineral density and leg muscle strength in young Caucasian, Hispanic, and Asian women, *J Clin Densitom*. 2007 Apr-Jun;10(2):157-164.
74. Bid HK, Mittal RD, Study of vitamin-D receptor (VDR) gene start codon polymorphism (Fok I) in healthy individuals from North India, <http://www.ijhg.com>, 19.5.2009.
75. Eisman JA, Genetics of Osteoporosis, *Endocrine Reviews* 20(6): 788–804.
76. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA, Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles, *Nature*. 1994 Jan 20;367(6460):284-287.
77. Zhang H, Tao G, Wu Q, Liu J, Gao Y, Chen R, Leng X., Vitamin D receptor gene polymorphism in postmenopausal women of the Han and Uygur nationalities in China, *Chinese Medical Journal* 2000, 113 (9) : 787-789.
78. Zajičková K, Žfková I, Bahbouh R, Křepelová A, Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, Bone Mineral Density and Bone Turnover: FokI Genotype is Related to Postmenopausal Bone Mass, *Physiol. Res*. 2002, 51: 501-509.
79. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD, Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women, *J Bone Miner Res*. 1995 Sep;10(9):1283-1288.
80. Pérez A, Ulla M, García B, Lavezzo M, Elías E, Binci M, Rivoira M, Centeno V, Alisio A, de Talamoni NT, Genotypes and clinical aspects associated with bone mineral density in Argentine postmenopausal women, *Bone Miner Metab*. 2008, 26(4):358-65.
81. Dong J, Huang ZW, Piao JH, Gong J, Association of bone mineral density with gene polymorphisms and environmental factors in Chinese postmenopausal women, *Wei Sheng Yan Jiu*. 2006 Mar, 35(2):196-200.
82. Mitra S, Desai M, Ikram Khatkhatay M, Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women, *Maturitas*. 2006 Aug 20, 55(1):27-35.
83. Kubota M, Yoshida S, Ikeda M, Okada Y, Arai H, Miyamoto K, Takeda E, Association between two types of vitamin d receptor gene polymorphism and bone status in premenopausal Japanese women, *Calcif Tissue Int*. 2001 Jan, 68(1):16-22.
84. Tsai KS, Hsu SH, Cheng WC, Chen CK, Chieng PU, Pan WH, Bone mineral density and bone markers in relation to vitamin D receptor gene polymorphisms in Chinese men and women, *Bone*. 1996 Nov, 19(5):513-518.
85. Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, Kubota M, Yoshida S, Ikeda M, Watabe F, Kanemasa Y, Takeda E, The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene, *J Bone Miner Res*. 2001 Jul, 16(7):1256-1264.
86. Eccleshall TR, Garnero P, Gross C, Delmas PD, Feldman D, Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral

- density in premenopausal French women: the OFELY study, *J Bone Miner Res.* 1998 Jan, 13(1):31-35.
87. Zmuda JM, Cauley JA, Danielson ME, Theobald TM, Ferrell RE, Vitamin D receptor translation initiation codon polymorphism and markers of osteoporotic risk in older African-American women, *Osteoporos Int.* 1999, 9(3):214-219.
  88. Videman T, Leppavuori J, Kaprio J, Battie MC, Gibbons LE, Peltonen L, et al. Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. *Spine* 1998, 23:2477-2485.
  89. Correa-Cerro L, Berthon P, Haussler J, Bochum S, Drelon E, Mangin P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer. *Hum Genet* 1999;105:281-7.
  90. Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, et al. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clinical Cancer Research* 2000, 6:498-504.
  91. Kotowicz MA, Pasco JA, Henry MJ, et al. Vitamin D receptor start codon polymorphism is not associated with bone mineral density in Australian women. *Bone* 1998; 23: S372 (Abstract).
  92. Minamitani K, Takahashi Y, Minagawa M, Yasuda T, Niimi H. Difference In Height Associated With a Translation Start Site Polymorphism In the Vitamin D Receptor Gene. *Pediatric Research* 1998, 44:628-632.
  93. Cheng WC, Tsai KS. The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok I) and bone mineral density in premenopausal women in Taiwan. *Osteoporosis Int* 1999, 9:545-549.
  94. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok-1) and bone mineral density in premenopausal American Black and White women. *J Bone Miner Res* 1997, 12:1043-1048.
  95. Gross C, Eccleshall TR, Malloy P, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996,11:1850-1855.
  96. Chen HY, Chen WC, Hsu CD, Tsai FJ, Tsai CH, Relation of vitamin D receptor FokI start codon polymorphism to bone mineral density and occurrence of osteoporosis in postmenopausal women in Taiwan, *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002 Feb;81(2):93-8.
  97. Zhang C, Wang C, Liang J, Zhou X, Zheng F, Fan Y, Shi Q, The vitamin D receptor Fok1 polymorphism and bone mineral density in Chinese children, *Clin Chim Acta.* 2008 Sep, 395(1-2):111-114.
  98. Wu W, Zhi XM, Li DF, Lin K, Xu L, Yang YH, Vitamin D receptor gene polymorphism is not associated with bone mineral density of pre-menopausal women in Guangzhou, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007 Mar, 27(3):364-366.
  99. Moffett SP, Zmuda JM, Cauley JA, Ensrud KE, Hillier TA, Hochberg MC, Li J, Cayabyab S, Lee JM, Peltz G, Cummings SR, Association of the VDR translation start site polymorphism and fracture risk in older women, *J Bone Miner Res.* 2007 May, 22(5):730-736.
  100. Casado-Díaz A, Cuenca-Acevedo R, Quesada JM, Dorado G, Individual single tube genotyping and DNA pooling by allele-specific PCR to uncover associations of polymorphisms with complex diseases, *Clin Chim Acta.* 2007 Feb, 376(1-2):155-162.
  101. Ivanova J, Doukova P, Boyanov M, Popivanov P, FokI and BsmI polymorphisms of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in a random Bulgarian population sample, *Endocrine.* 2006 Jun, 29(3):413-418.

102. Zhang ZL, He JW, Huang QR, Qin YJ, Hu YQ, Li M, Zhang H, Liu YJ, Hu WW, Relationship between the polymorphism of start codon and CDX2 site in vitamin D receptor gene and the effect of calcium supplementation on bone mineral density of postmenopausal women, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2006 Aug, 23(4):397-401.
103. Remes T, Väisänen SB, Mahonen A, Huuskonen J, Kröger H, Jurvelin JS, Rauramaa R, Bone mineral density, body height, and vitamin D receptor gene polymorphism in middle aged men, *Ann Med*. 2005, 37(5):383-392.
104. Nguyen TV, Esteban LM, White CP, Grant SF, Center JR, Gardiner EM, Eisman JA, Contribution of the collagen I alpha1 and vitamin D receptor genes to the risk of hip fracture in elderly women, *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec, 90(12):6575-6579.
105. Zajickova K, Zofkova I, Hill M, Vitamin D receptor polymorphisms, bone ultrasound and mineral density in post-menopausal women, *Aging Clin Exp Res*. 2005 Apr, 17(2):121-124.
106. Bandrés E, Pombo I, González-Huarriz M, Rebollo A, López G, García-Foncillas J, Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ERalpha, COL1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women, *J Endocrinol Invest*. 2005 Apr, 28(4):312-321.
107. Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Chen Z, Gunn SK, Wilde M, Darlington G, Shypailo RJ, Ellis KJ, Vitamin D receptor FokI polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty, *J Bone Miner Res*. 2005 Jun, 20(6):945-953.
108. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Dańska A, Spaczyński M, Opala T, Mrozikiewicz PM, Vitamin D receptor polymorphism in the group of postmenopausal women with low bone mineral density, *Ginekol Pol*. 2004 May, 75(5):367-372.
109. Morita A, Iki M, Dohi Y, Ikeda Y, Kagamimori S, Kagawa Y, Matsuzaki T, Yoneshima H, Marumo F; JPOS Study Group, Prediction of bone mineral density from vitamin D receptor polymorphisms is uncertain in representative samples of Japanese Women. The Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study, *Int J Epidemiol*. 2004 Oct, 33(5):979-988.
110. Duman BS, Tanakol R, Erensoy N, Oztürk M, Yilmazer S, Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in postmenopausal osteoporotic and healthy women, *Med Princ Pract*. 2004 Sep-Oct, 13(5):260-266.
111. Qesada JM, Casado A, Díaz C, Barrios L, Cuenca-Acevedo R, Dorado G, Allele-frequency determination of BsmI and FokI polymorphisms of the VDR gene by quantitative real-time PCR (QRT-PCR) in pooled genomic DNA samples, *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May, 89-90(1-5):209-214.
112. Thakkestian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J, Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study, *J Bone Miner Res*. 2004 Mar, 19(3):419-428.
113. Vidal C, Grima C, Brincat M, Megally N, Xuereb-Anastasi A, Associations of polymorphisms in the vitamin D receptor gene (BsmI and FokI) with bone mineral density in postmenopausal women in Malta, *Osteoporos Int*. 2003 Nov, 14(11):923-928.
114. Lisker R, López MA, Jasqui S, Ponce De León Rosales S, Correa-Rotter R, Sánchez S, Mutchinick OM, Association of vitamin D receptor polymorphisms with osteoporosis in mexican postmenopausal women, *Hum Biol*. 2003 Jun, 75(3):399-403.
115. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H, Association of polymorphisms of interleukin-6, osteocalcin, and vitamin D receptor genes, alone or in combination, with

- bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men, *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jul, 88(7):3372-3378.
116. Strandberg S, Nordström P, Lorentzon R, Lorentzon M, Vitamin D receptor start codon polymorphism ( FokI) is related to bone mineral density in healthy adolescent boys, *J Bone Miner Metab.* 2003, 21(2):109-113.
  117. Zhang ZL, Zhao JX, Meng XW, Zhou XY, Xing XP, Xia WB, Association of polymorphisms of vitamin D receptor gene start codon and 3'-end region with bone mineral density in postmenopausal women, 2003 Feb, 20(1):5-8.
  118. Laaksonen M, Kärkkäinen M, Outila T, Vanninen T, Ray C, Lamberg-Allardt C, Vitamin D receptor gene BsmI-polymorphism in Finnish premenopausal and postmenopausal women: its association with bone mineral density, markers of bone turnover, and intestinal calcium absorption, with adjustment for lifestyle factors, *J Bone Miner Metab.* 2002, 20(6):383-390.
  119. Braga V, Sangalli A, Malerba G, Mottes M, Mirandola S, Gatti D, Rossini M, Zamboni M, Adami S, Relationship among VDR (BsmI and FokI), COLIA1, and CTR polymorphisms with bone mass, bone turnover markers, and sex hormones in men, *Calcif Tissue Int.* 2002 Jun, 70(6):457-462.
  120. Katsumata K, Nishizawa K, Unno A, Fujita Y, Tokita A, Association of gene polymorphisms and bone density in Japanese girls, *J Bone Miner Metab.* 2002, 20(3):164-169.
  121. Jaramillo-Rangel G, Cerda-Flores RM, Cardenas-Ibarra L, Tamayo-Orozco J, Morrison N, Barrera-Saldaña HA, Vitamin D receptor polymorphisms and bone mineral density in Mexican women without osteoporosis, *Am J Hum Biol.* 1999 Nov, 11(6):793-797.
  122. Kim JG, Lim KS, Kim EK, Choi YM, Lee JY, Association of vitamin D receptor and estrogen receptor gene polymorphisms with bone mass in postmenopausal Korean women, *Menopause.* 2001 May-Jun, 8(3):222-228.
  123. Choi YM, Jun JK, Choe J, Hwang D, Park SH, Ku SY, Kang D, Kim JG, Moon SY, Lee JY, Association of the vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) with bone mineral density in postmenopausal Korean women, *J Hum Genet.* 2000, 45(5):280-283.
  124. Kanan RM, Varanasi SS, Francis RM, Parker L, Datta HK, Vitamin D receptor gene start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in healthy male subjects, *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Jul;53(1):93-8.
  125. Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, Eriksen EF, Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures, *Eur J Clin Invest.* 2000 Jul, 30(7):608-617.
  126. Marc J, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Association of vitamin D receptor gene polymorphism with bone mineral density in Slovenian postmenopausal women, *Gynecol Endocrinol.* 2000 Feb, 14(1):60-64.
  127. Lorentzon M, Lorentzon R, Nordström P, Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with birth height, growth to adolescence, and adult stature in healthy caucasian men: a cross-sectional and longitudinal study, *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Apr, 85(4):1666-1670.
  128. Holmberg-Marttila D, Sievänen H, Järvinen TL, Järvinen TA, Vitamin D and estrogen receptor polymorphisms and bone mineral changes in postpartum women, *Calcif Tissue Int.* 2000 Mar, 66(3):184-189.
  129. Lucotte G, Mercier G, Burckel A, The vitamin D receptor FokI start codon polymorphism and bone mineral density in osteoporotic postmenopausal French women, *Clin Genet.* 1999 Sep, 56(3):221-224.



130. Baroncelli GI, Federico G, Bertelloni S, Ceccarelli C, Cupelli D, Saggese G, Vitamin-D receptor genotype does not predict bone mineral density, bone turnover, and growth in prepubertal children, *Horm Res.* 1999, 51(3):150-156.
131. Gennari L, Becherini L, Mansani R, Masi L, Falchetti A, Morelli A, Colli E, Gonnelli S, Cepollaro C, Brandi ML, FokI polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women, *J Bone Miner Res.* 1999 Aug, 14(8):1379-1386.
132. Baltzer AW, Reinecke J, Wehling P, Granrath M, Schulitz KP, Bone density and bone metabolism regulated by vitamin D receptor allele polymorphism in a German study sample, *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1999 May-Jun, 137(3):273-279.
133. Ferrari S, Manen D, Bonjour JP, Slosman D, Rizzoli R, Bone mineral mass and calcium and phosphate metabolism in young men: relationships with vitamin D receptor allelic polymorphisms, *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jun, 84(6):2043-2048.
134. Gong G, Stern HS, Cheng SC, Fong N, Mordeson J, Deng HW, Recker RR, The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms, *Osteoporos Int.* 1999, 9(1):55-64.
135. Ames SK, Ellis KJ, Gunn SK, Copeland KC, Abrams SA, Vitamin D receptor gene FokI polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children, *J Bone Miner Res.* 1999 May, 14(5):740-746.
136. Morita A, Iki M, Dohi Y, Ikeda Y, Kagamimori S, Kagawa Y, Yoneshima H, Effects of the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene and lifestyle factors on bone mineral density in a representative sample of Japanese women: the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Study, *Calcif Tissue Int.* 2005 Dec, 77(6):339-347.
137. Macdonald HM, McGuigan FE, Stewart A, Black AJ, Fraser WD, Ralston S, Reid DM, Large-scale population-based study shows no evidence of association between common polymorphism of the VDR gene and BMD in British women, *J Bone Miner Res.* 2006 Jan, 21(1):151-162.
138. Zhao J, Zhou X, Meng X, Liu G, Xing X, The association between vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and osteocalcin in Chinese women, *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 1997 Aug, 19(4):252-256.
139. Lim SK, Park YS, Park JM, Song YD, Lee EJ, Kim KR, Lee HC, Huh KB, Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans, *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Dec, 80(12):3677-3681.
140. Trento LK, Pietropolli A, Ticconi C, Gravotta E, De Martino MU, Fabbri A, Piccione E, Role of type I collagen C telopeptide, bone-specific alkaline phosphatase and osteocalcin in the assessment of bone status in postmenopausal women, *J Obstet Gynaecol Res.* 2009 Feb, 35(1):152-159.
141. Kamel H. Postmenopausal osteoporosis: Etiology, current diagnostic strategies, and non-prescription interventions. *J Manag Care Pharm* 2006; 12 (6 Suppl A): 4–6.
142. Leeming DJ, Alexanderson P, Karsdal MA, Qvist P, Schalker S, Tanko LB. An update on biomarkers of bone turnover and their utility in biomedical research and clinical practice. *Eur J Clin Pharmacol* 2006, 62: 781–792.
143. Scholtissen S, Guillemin F, Bruyère O, Collette J, Dousset B, Kemmer C, Culot S, Crémer D, Dejardin H, Hubermont G, Lefebvre D, Pascal-Vigneron V, Weryha G, Reginster JY, Assessment of determinants for osteoporosis in elderly men, *Osteoporos Int.* 2008 Nov 15.
144. Kalaï E, Bahlous A, Makdouli A, Sahli H, Klouz A, Lakhali M, Sellami S, Abdelmoula J, The interest of biochemical markers of bone turnover for monitoring treatment of postmenopausal osteoporosis, *Tunis Med.* 2008 Feb;86(2):122-127.

145. Meier C, Meinhardt U, Greenfield JR, De Winter J, Nguyen TV, Dunstan CR, Seibel MJ, Serum cathepsin K concentrations reflect osteoclastic activity in women with postmenopausal osteoporosis and patients with Paget's disease, *Clin Lab.* 2006, 52(1-2):1-10.
146. Prezelj J, Ostanek B, Logar DB, Marc J, Hawa G, Kocjan T, Cathepsin K predicts femoral neck bone mineral density change in nonosteoporotic peri- and early postmenopausal women, *Menopause.* 2008 Mar-Apr, 15(2):369-373.
147. Lerner UH, Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis; *J Dent Res* 2006, 85(7):584-595.
148. Laitinen K, Valimaki M. Alcohol and bone. *Calcif Tissue Int.* 1991, 49:S70-S73.
149. Cohen AJ, Roe FJ. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible aetiological role of dietary salt. *Food Chem Toxicol.* 2000, 38:237-253.
150. Wong PK, Christie JJ, Wark JD. The effects of smoking on bone health. *Clin Sci (Lond)* 2007, 113:233-241.
151. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 2002 Oct., 784-796.
152. Theis M., Bone markers – their nature and clinical use, 2008, *JMB* 27: 117–122.
153. Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, Woitge HW, Seibel MJ, Väänänen HK, Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption, *Clin Chem.* 2001 Mar, 47(3):597-600.
154. <http://www.arupconsult.com/Topics/EndocrineDz/Osteoporosis.html>, 19.5.2009.
155. Seibel M.J., Clinical use of markers of bone turnover in metastatic bone disease, october 2005, 2 (10).
156. Anderson P, May B, Morris H, Vitamin d metabolism: new concepts and clinical implications, *Clin Biochem Rev.* 2003, 24(1):13-26.
157. Malloy PJ, Wesley PJ, Feldman D, The Vitamin D Receptor and the Syndrome of Hereditary 1,25-Dihydroxyvitamin D-Resistant Rickets, *Endocrine Reviews* 20 (2): 156-188.
158. Holick M.F., Vitamin D: Millenium Perspective, *Journal of Cellular Biochemistry* 2003, 88: 296-307.
159. <http://www2.mtroyal.ab.ca/~tnickle/3311/supplement/PCR.jpg>, 25.5.2009
160. Otoničar N., Fok I polimorfizem gena za receptor vitamina D pri bolnicah z osteoporozo., *Diplomska naloga, UNI FFA Ljubljana*, 2001.
161. Wittke Thompson J. K., Pluzhnikov A., Cox N. J., Rational Inferences about Departures from Hardy – Weinberg Equilibrium, *Am. J. Hum. Genet.*, 2005, 76:967-986.
162. Zambrano-Morales M, Borjas L, Fernández E, Zabala W, de Romero P, Pineda L, Morales-Machín A, Association of the vitamin D receptor gene BBAAtt haplotype with osteoporosis in post-menopausal women. *Invest Clin.* 2008 Mar, 49(1):29-38.
163. Borjas-Fajardo L, Zambrano M, Fernández E, Pineda L, Machín A, de Romero P, Zabala W, Sánchez MA, Chacín JA, Delgado W. Analysis of Bsm I polymorphism of the vitamin D receptor (VDR) gene in Venezuelan female patients living in the state of Zulia with osteoporosis. *Invest Clin.* 2003 Dec, 44(4):275-282.
164. Jaramillo-Rangel G, Cerda-Flores RM, Cardenas-Ibarra L, Tamayo-Orozco J, Morrison N, Barrera-Saldaña HA. Vitamin D receptor polymorphisms and bone mineral density in Mexican women without osteoporosis. *Am J Hum Biol.* 1999 Nov, 11(6):793-797.
165. Quevedo LI, Martínez BM, Castillo NM, Rivera F, Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of hip fracture in Chilean elderly women. *Rev Med Chil.* 2008 Apr, 136(4):475-81.

166. Geusens P, Sambrook P, Lems W., Fracture prevention in men. *Nat Rev Rheumatol.* 2009 Jul 28.