

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

TINA ŽURAN

**POVEZANOST FIBROBLASTNEGA RASTNEGA DEJAVNIKA 23 IN SIGNALNE
POTI RANK/RANKL/OPG V KOSTNEM TKIVU PRI BOLNIKIHZ
OSTEOPOROZO**

**ASSOCIATION OF THE FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 AND
RANK/RANKL/OPG SIGNALING PATHWAY IN BONE TISSUE IN
OSTEOPOROTIC PATIENTS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., da mi je omogočila opravljanje magistrske naloge, predvsem pa za zaupanje v moje delo, ko se je odločila za zahtevnost magistrske naloge. Hvala tudi za vse nasvete in pomoč pri načrtovanju izvedbe eksperimentalnega dela in nastajanju magistrske naloge.

Posebna zahvala gre tudi asist. Jani Dragojevič, mag. farm. za pomoč pri laboratorijskem delu ter reševanju nastalih težav. Hvala za vse spodbudne besede in nasvete s katerimi mi je pomagala premagati ovire pri delu.

Prav tako hvala Petru Vrtačnik, mag. farm. za uvajanje v eksperimentalni del. Asist. Janji Zupan, mag. farm., asist. Jasni Omerzel, mag. farm. in Manji Cedilnik sam. strok. delavki pa za pomoč in nasvete pri reševanju težav, ki so se pojavljale med laboratorijskim delom. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo, da so me sprejeli medse in mi nudili pomoč.

Iz srca hvala tudi mojim domačim in prijateljem za podporo in spodbudne besede pri nastajanju magistrske naloge.

IZJAVA

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo. Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc spec. med. biokem..

Ljubljana, september 2011

Tina Žuran

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

Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK	I
SEZNAM OKRAJŠAV	III
SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC	V
1 UVOD	1
1.1 KOSTNA PREMENA	1
1.1.1 Osteoblasti	2
1.1.2 Osteociti	2
1.1.3 Osteoklasti	3
1.1.4 RANK/RANKL/OPG sistem pri uravnavanju kostne premene	3
1.1.5 Biokemični kazalci kostne premene	4
1.2 FIBROBLASTNI RASTNI DEJAVNIK 23	6
1.2.1 Protein FGF23	6
1.2.2 Delovanje FGF23	7
1.2.3 Uravnavanje FGF23	9
1.2.4 Vloga FGF23 pri boleznih z motnjami v presnovi fosfatov	11
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 PREISKOVANA SKUPINA	14
3.2 MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE	14
3.3 MERJENJE SERUMSKIH IN PLAZEMSKIH KAZALCEV	14
3.3.1 Merjenje koncentracij FGF23	14
3.3.2 Merjenje koncentracij proteina Klotho	15
3.3.3 Merjenje koncentracij OPG	15
3.4 ODVZEM KOSTNIH VZORCEV	16
3.5 DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV	16
3.5.1 Izolacija celokupne RNA	16
3.5.2 Vrednotenje izolirane RNA	17
3.5.3 Obratno prepisovanje	18
3.5.4 PCR v realnem času	19
3.5.4.1 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov in sonde	19
3.5.4.2 Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in temperature prileganja za gen RANKL, RANK, PTH1R, OPG, RPLP0 in FGF23	20
3.5.4.3 PCR v realnem času	23

3.6 STATISTIČNE METODE	25
3.6.1 Kolmogorov – Smirnov in Shapiro – Wilkov test normalnosti porazdelitve	25
3.6.2 Statistična analiza razlik v parametrih med podskupinami	26
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1 OPIS PREISKOVANIH SKUPIN	27
4.2 IZRAŽANJE GENOV ZA RANK, RANKL IN OPG V KOSTNEM TKIVU PRI PREISKOVANCIH Z OSTEOPOROZO IN OSTEARTROZO	28
4.3 MERITVE BIOKEMIJSKIH KAZALCEV	29
4.3.1 Kalcotropni hormoni in OPG pri preiskovancih z osteoporozo in preiskovancih z osteoartrozo	29
4.3.2 Primerjava FGF23 in proteina Klotho pri preiskovancih z osteoporozo in osteoartrozo	30
4.3.3 Ocena vpliva ledvične funkcije na MKG pri preiskovancih z osteoporozo	32
4.4 ANALIZE KOSTNEGA TKIVA	33
4.4.1 Vrednotenje celokupne RNA	33
4.4.2 Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov	34
4.4.3 Analiza izražanja genov	35
4.5 KLINIČNI POMEN DOBLJENIH REZULTATOV	36
4.5.1 Vpliv proteina Klotho na delovanje FGF23	36
4.5.2 Vpliv FGF23 na uravnavanje Ca ionov	37
4.5.3 Povezanost FGF23 s signalno potjo RANK/RANKL/OPG	40
4.5.4 Povezanost FGF23 z zlomi oziroma mineralno kostno gostoto	41
5 SKLEP	44
6 LITERATURA	45
PRILOGA	52

POVZETEK

Sistem lokalnih dejavnikov RANK/RANKL/OPG ima pomembno vlogo v uravnavanju kostne premene. Vpliva na osteoklastogenezo, v kateri nastajajo zreli osteoklasti in na aktivacijo zrelih osteoklastov in je povezan z razvojem pomenopavzne osteoporoze. Zaradi tega je predmet številnih raziskav na področju kostne biologije. Fibroblastni rastni dejavnik 23 (FGF23) je fosfaturični hormon, ki se izraža v glavnem v kosteh in deluje predvsem v ledvicah. Znižuje serumsko koncentracijo fosfatov preko zaviranja reabsorpcije fosfatov v proksimalnih tubulih in tudi absorpcije fosfatov iz črevesja. Zavira izražanje encima 1α -hidroksilaze in sintezo 1,25-dihidroksivitamina D₃. Znižuje izražanje ter izločanje parathormona iz obščitnice v stanju povišanih vrednosti 1,25-dihidroksivitamina D₃. Tako naj bi FGF23 vplival na kvaliteto kostnega tkiva in bil povezan s kostnimi boleznimi. Objavljeni podatki kažejo na pomembno vlogo FGF23 pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo kot biokemični kazalec sprememb v mineralizaciji kosti, žilnih kalcinacij in tveganja smrti. Podatkov o povezanosti FGF23 in osteoporoze pa nismo zasledili. Zaradi opisane vloge FGF23 v telesu in bolnikih s kronično ledvično boleznijo smo se odločili raziskati vlogo FGF23 pri razvoju osteoporoze. Namen magistrske naloge je bil na podlagi analiz na humanem kostnem tkivu in merjenju biokemičnih kazalcev pojasniti vlogo FGF23 pri razvoju osteoporoze. V raziskavo smo vključili 110 preiskovancev z zlomom vratu stegenice (N=59) ali osteoartroze (N=51). Preiskovancem so izmerili MKG kolka, MKG vratu stegenice in MKG področja ledvenih vretenc, serumske koncentracije celotnega Ca, fosfatov, kreatinina, intaktnega parathormona in 25-hidroksivitamina D₃. Dodatno smo jim določili še koncentracije FGF23, proteina Klotho in OPG. S pomočjo serumskih vrednosti kreatinina smo izračunali glomerulno filtracijo. V kostnem tkivu smo izmerili izražanje genov za RANK, RANKL, OPG, VDR, PTH1R in FGF23. S statistično analizo smo raziskovali povezanost FGF23 s koncentracijo proteina Klotho, vpliv izražanja VDR in PTH1R v humanem kostnem tkivu na aktivnost FGF23, povezanost FGF23 s kazalci homeostaze Ca ionov, povezanost FGF23 s signalno potjo RANK/RANKL/OPG, ki ima osrenjo vlogo v uravnavanju osteoklastogeneze in procesa kostne premene ter nazadnje še povezanost FGF23 z MKG pri bolnikih z osteoporozo, saj je MKG najpomembnejši kazalec osteoporoze. Rezultati potrjujejo nujnost prisotnosti koreceptorja Klotho za delovanje FGF23 z mejno statistično značilnostjo ($p=0,058$). Izražanje VDR ($p=0,750$) in PTH1R ($p=0,870$) naj nebi vplivalo na

aktivnost FGF23 pri ljudeh. Z dokazano povezanostjo koncentracij FGF23 in koncentracij iPTH ($p < 0,0001$) smo pokazali, da ima FGF23 pomembno vlogo pri uravnavanju Ca ionov. Dokazali smo, da med FGF23 in izražanjem gena za RANK ($p = 0,437$), RANKL ($p = 0,581$) ali OPG ($p = 0,795$) v humanem kostnem tkivu ni povezave, kar kaže, da FGF23 verjetno nima vpliva na RANK/RANKL/OPG signalno pot. Rezultati kažejo, da FGF23 ni povezan z MKG ($p = 1,000$) in verjetno nima vloge pri razvoju osteoporoze. Zaključujemo, da FGF23 ni povezan z razvojem osteoporoze in ga izključujemo kot morebitni kazalec osteoporoznih zlomov.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADHR	avtosomno dominantni hipofosfatni rahitis
ANCOVA	analiza kovariance (angl. analysis of covariance)
ARHR	avtosomno dominantni hiperfosfatni rahitis
ASARM	angl. acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif
BMI	angl. body mass index
BMP1	angl. bone morphogenic protein 1
Ca	kalcij
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl. complementary deoxyribonucleic acid)
CKD	kronična ledvična bolezen (angl. Chronic kidney disease)
Dmp1	angl. dentin matrix protein 1
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
ELISA	encimskoimunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
FGF	fibroblastni rastni dejavnik (angl. fibroblast growth factor)
FGFR	receptor za fibroblastni rastni dejavnik (angl. fibroblast growth factor receptor)
FTC	angl. familial tumoral calcinosis
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GALNT3	polipeptid N-acetilgalaktozaminiltransferaza 3
GFR	glomerulna filtracija
iPTH	intaktni parathormon
MEPE	angl. matrix extracellular phosphoglycoprotein
MKG	mineralna kostna gostota
MKG^{tot}	mineralna kostna gostota kolka
MKG^{fn}	mineralna kostna gostota vratu stegenice
MKG^{ls}	mineralna kostna gostota predela ledvene hrbtenice
OPG	osteoprotegerin

PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polimerase chain reaction)
Phex	angl. phosphate regulating gene with homologies to endopeptidase on the X chromosome
PTH	parathormon
PTH1R	receptor za parathormon 1
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RIN	angl. RNA integrity number
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove spojine
RPLP0	ribosomalni protein P0
RPM	angl. revolutions per minute
SIBLING	angl. short integrin binding-ligand, N-linked glycoprotein family
sOPG	serumski osteoprotegerin
TRAF6	z dejavnikom tumorske nekroze povezani faktor 6
TRPV5	transporter Ca ionov (angl. transient receptor potential cation channel subfamily V member 5)
VDR	vitamin D receptor
VDRE	angl. vitamin D response element
TIO	tumorsko inducirana osteomalacija (angl. tumor induced osteomalacija)
TMB	tetrametilbenzidin
TRAP	tartrat-rezistentna kislina fosfataza
XLR	angl. X-linked hypophosphatemic ricket
1,25(OH)₂D	1,25-dihidroksivitamin D3
25(OH)D	25-hidroksivitamin D3

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

- Slika 1:** Kostna premena.
- Slika 2:** RANK/RANKL/OPG sistem.
- Slika 3:** Cepitveno mesto FGF23.
- Slika 4:** Povezanost delovanja FGF23, PTH, 1,25(OH)₂D in proteina Klotho.
- Slika 5:** Princip encimskoimunske metode »sendvič« ELISA.
- Slika 6:** Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (Agilent 2100 Bioanalyzer) celokupne RNA izolirane iz proksimalnega dela stegenice.
- Slika 7:** Talilna krivulja.
- Slika 8:** Rezultat reakcije PCR v realnem času.

-
- Preglednica I:** Biokemični kazalci kostne premene.
- PreglednicaII:** Najpogostejše dedne bolezni z motnjami v koncentraciji FGF23.
- PreglednicaIII:** Sestava reakcijske zmesi za reakcijo obratnega prepisovanja.
- Preglednica IV:** Pogoji reakcije obratnega prepisovanja.
- Preglednica V:** Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo PCR v realnem času.
- Preglednica VI:** Priprava reakcijske zmesi za reakcijo PCR v realnem času za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za gen *RANKL*, *RANK*, *OPG*, *PTH1R*, *RPLP0* in *FGF23**, *FGF23 ***, *FGF23**** ter temperaturo prileganja.
- Preglednica VII:** Pogoji reakcije PCR v realnem času ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila.
- Preglednica VIII:** Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in temperature prileganja za merjenje izražanja gena za FGF23.
- Preglednica IX:** Priprava reakcijske zmesi za reakcijo PCR v realnem času ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila (*RANKL*, *RANK*, *PTH1R*, *RPLP0*)

- Preglednica X:** Priprava reakcijske zmesi za reakcijo PCR v realnem času ob uporabi sond (*VDR, FGF23, GAPDH*).
- Preglednica XI:** Priprava reakcijske zmesi za reakcijo PCR v realnem času ob uporabi sond (*OPG, GAPDH, RPLP0*).
- Preglednica XII:** Pogoji PCR v realnem času ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila ali uporabi sond (*RANKL, RANK, PTH1R, VDR, GAPDH, RPLP0*).
- Preglednica XIII:** Pogoji reakcije PCR v realnem času ob uporabi sond (*OPG, GAPDH, RPLP0*).
- Preglednica XIV:** Opis preiskovanih skupin
- Preglednica XV:** Izražanja genov za RANK, RANKL, OPG v kostnem tkivu pri preiskovancih z osteoporozo in preiskovancih z osteoartrozo.
- Preglednica XVI:** Koncentracije fosfatov, Ca ionov, 25(OH)D, iPTH in sOPG pri preiskovancih z osteoporozo in preiskovancih z osteoartrozo.
- Preglednica XVII:** Koncentracije proteina Klotho pri preiskovancih z osteoporozo in preiskovancih z osteoartrozo.
- Preglednica XVIII:** Frekvence preiskovancev z osteoporozo in preiskovancev z osteoartrozo glede na plazemske vrednosti FGF23.
- Preglednica XIX:** Frekvence preiskovancev v posamezni podskupini glede na GFR in MKG.
- Preglednica XX:** Koncentracije proteina Klotho pri preiskovancih z osteoporozo razdeljenih v skupino s plazemskimi vrednostmi FGF23>0 in FGF23=0.
- Preglednica XXI:** Izražanje VDR in PTH1R v kostnem tkivu preiskovancev z osteoporozo.
- Preglednica XXII:** Koncentracija fosfatov, Ca ionov, 25(OH)D in iPTH pri preiskovancih z osteoporozo.
- Preglednica XXIII:** Izražanje genov za RANK, RANKL, OPG v humanem kostnem tkivu in serumske koncentracije OPG.
- Preglednica XXIV:** Vrednosti MKG na vseh treh mestih meritev pri preiskovancih z osteoporozo.
- Preglednica XXV:** Frekvence preiskovancev z osteoporozo v primerjanih podskupinah.

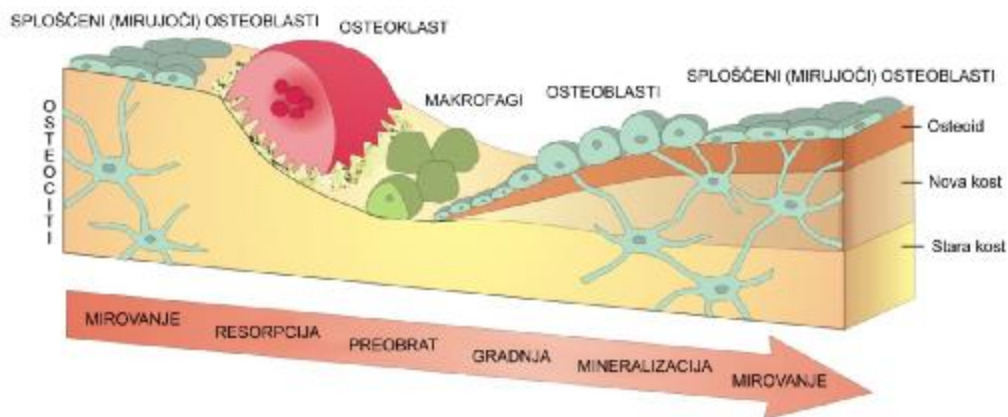
1 UVOD

1.1 KOSTNA PREMENA

Kostnina se pod vplivom hormonov, mehanskih in drugih dejavnikov neprestano obnavlja v procesu kostne premene. Kostno premeno sestavljata dva procesa, ki se pojavljata v točno določenem zaporedju: razgradnja kostnine z osteoklasti in tvorba nove kostnine z osteoblasti. Kostna premena je stalen proces, ki poteka vse življenje (1).

Preosteoklasti se aktivirajo pod vplivom lokalnega dejavnika, ki ga izločajo mirujoči osteoblasti, osteociti ali celice kostnega mozga. Preosteoklasti se preko osteopontina pritrdijo na kost in s fuzijo združijo v mnogojedrne osteoklaste, ki razgradijo kostnino. Po razgradnji kostnine in odstranitvi osteoklastov mononuklearni fagociti tvorijo cementno plast, ki predstavlja povezavo med staro in novo kostnino ter omejuje mesto razgradnje kosti. Sledi faza preobrata, v kateri se preosteoblasti aktivirajo, proliferirajo in diferencirajo v osteoblaste, ki v fazi tvorbe kostnine tvorijo osteoid (organski matriks). Osteoid mineralizira v fazi mineralizacije, ko začnejo osteoblasti izločati alkalno fosfatazo in osteokalcin (Slika 1) (1, 2).

Celoten cikel kostne premene traja pri človeku približno 3 mesece. Proces razgradnje kostnine traja približno 3 dni, preobrat 14 dni, tvorba kostnine pa približno 70 dni. V tem obdobju se zamenja približno 0,01 mm kostnine, na enem mestu kjer poteka kostna premena (2).



Slika 1: Kostna premena.

Proces kostne premene je natančno reguliran, tako da je v normalnem odraslem okostju volumen razgrajene kostnine enak volumnu na novo nastale kostnine in se vzdržuje kostna masa. Povečana aktivnost osteoklastov je torej kompenzirana s povečano aktivnostjo osteoblastov, znižana aktivnost osteoklastov pa z znižano aktivnostjo osteoblastov. V številnih primerih pa prihaja do motenega ravnotežja med procesoma tvorbe in razgradnje kostnine, kar se odraža v bolezenskih stanjih, kot je osteoporoza (1).

1.1.1 Osteoblasti

Osteoblasti so enojedrne celice na kostni površini. Razvijejo se iz mezenhimskih prekursorjskih celic, iz katerih izvirajo tudi hondrociti, adipociti in mioblasti. Njihova vloga je tvorba kostnega matriksa in regulacija dozorevanja ter delovanja osteoklastov (1, 2).

Glavna dejavnost osteoblastov je tvorba in izločanje kolagena in nekolagenskih proteinov kostnega matriksa ter proteinov, ki regulirajo kostno mineralizacijo. Pod vplivom različnih stimulusov proizvajajo osteoblasti tudi različne rastne dejavnike, na svoji površini pa izražajo receptorje za vrsto endokrinih hormonov, steroidnih hormonov, rastne dejavnike in adhezijske molekule.

Mirujoči osteoblasti so ploščati in pokrivajo dele kostnine, kjer kostna premena ne poteka. Osteoblasti, ki tekom nastanka nove kostnine v procesu kostne premene ostanejo ujeti v kostnem matriksu, diferencirajo v osteocite (2, 4, 5).

1.1.2 Osteociti

Osteociti izvirajo iz osteoblastov, ki so tekom tvorbe in mineralizacije kostnine ostali ujeti v kostnem matriksu. Čeprav se metabolna aktivnost osteoblastov, ki so obdani s kostnim matriksom, močno zniža, imajo osteociti še vedno lastnosti osteoblastov in hkrati sposobnost razgradnje kostnine. S pričetkom diferenciacije osteoblasta v osteocit pa se poveča tudi izražanje Dmp1 (angl. dentin matrix protein 1), Phex (angl. phosphate regulating gene with homologies to endopeptidase on the X chromosome), sklerostina, MEPE (angl. matrix extracellular phosphoglycoprotein) in FGF23 (angl. fibroblast growth factor 23). Osteociti tako koordinirajo tvorbo kostnine z osteoblasti z renalnim uravnavanjem sistemske homeostaze fosfatov preko FGF23.

Osteociti imajo številne izrastke, s katerimi so povezani z drugimi osteociti in celicami na površini kostnine. So najštevilčnejše kostne celice, saj predstavljajo 90-95% vseh kostnih celic (2, 6, 29).

1.1.3 Osteoklasti

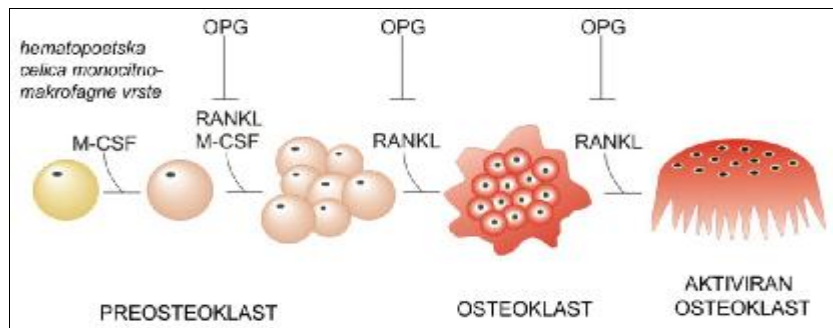
Osteoklasti so velike mnogojedrne kostne celice, odgovorne za razgradnjo kostnine. Izvirajo iz hematopoetičnih celic makrofagno-monocitne vrste. Na svoji površini izražajo RANK receptor (receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B), ki po vezavi citokina RANKL (ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B) sproži diferenciacijo celice v osteoklastno linijo. Citoplazma osteoklasta je acidofilna in vsebuje številne vakuole, obilen Golgijev aparat okoli vsakega jedra in številne mitohondrije. Na mestu razgradnje kostnine se membrana osteoklasta močno naguba in s tem poveča resorpcijsko površino. Osteoklasti aktivno sintetizirajo lizosomalne encime, kot sta od tartrata-rezistentna kislina fosfataza (TRAP) in katepsin K. Encimi se izločajo preko nagubane membrane v zaprt izvencelični prostor, kjer poteka razgradnja kostnine. Zaradi nizke vrednosti pH se kristali hidroksiapatita odcepijo od kolagena in raztopijo. Preostala kolagenska vlakna razgradi katepsin K in TRAP. Predeli izdolbene kostnine se imenujejo Howshipove lakune (2, 7).

1.1.4 RANK/RANKL/OPG sistem pri uravnavanju kostne premene

V procesu nastanka osteoklastov sodelujejo RANKL, RANK in osteoprotegerin (OPG). Skupaj tvorijo sistem lokalnih dejavnikov RANK/RANKL/OPG (slika 2), ki uravnava kostno premeno in je povezan z razvojem pomenopavzne osteoporoze, revmatoidnim artritisom, Pagetovo boleznijo in malignimi ter benignimi novotvorbami kosti (9).

Celice osteoblastne vrste so odgovorne za izražanje membransko vezane in topne oblike RANKL ter tudi OPG. Za razvoj osteoklastov je potrebna interakcija med preosteoklasti in osteoblasti. RANKL, transmembrani ligand, ki se izraža na osteoblastih, ali prisoten v topni obliki, se veže na RANK (transmembrani receptor na hemopoetičnih osteoklastnih matičnih celicah kot tudi na zrelih osteoklastih). Vezava liganda na receptor povzroči interakcijo RANK citoplazemske domene s TRAF6 (z dejavnikom tumorske nekroze povezani faktor), ki sproži prenos signala. Z vezavo RANKL na njegov receptor RANK se tako aktivira vrsta osteoklastnih celičnih funkcij. RANKL je nujen citokin za diferenciacijo v procesu osteoklastogeneze, stimulacijo preživetja in fuzije prekurzorskih osteoklastnih celic in aktivacijo zrelih osteoklastov ter upočasnitev njihove apoptoze. OPG kot nemembranski receptor kompetitivno veže RANKL in nevtralizira vse njegove biološke vplive. OPG z vezavo na RANKL prepreči njegovo vezavo na RANK, s tem inhibira osteoklastogenezo, z direktno vezavo na nekatere osteoklastne receptorje pa lahko direktno

prepreči aktivacijo osteoklastov in inducira njihovo apoptozo. RANKL in OPG imata nasprotna učinka na kostno tkivo. Medtem ko RANKL deluje v smeri povečanja kostne razgradnje in zmanjšanja kostne mase, deluje OPG v smeri zmanjšanja razgradnje kosti in povečanja kostne mase (9, 10, 11).



Slika 2: RANK/RANKL/OPG sistem.

Izražanje RANKL uravnava mnogi dejavniki. Parathormon (PTH), prostaglandin E₂, vnetni citokini in 1,25-dihidroksivitamin D₃ (1,25(OH)₂D) stimulirajo izražanje RANKL, estrogen in TGFβ pa ga zavirata. Izražanje OPG uravnava večina dejavnikov, ki uravnava izražanje RANKL v osteoblastih in vpliv je pogosto ravno nasproten. Izražanje RANK je dokaj konstantno, zato obseg kostne razgradnje posredno uravnava razmerje RANKL/OPG. Sprememba razmerja sproži ali izrazito povečanje razgradnje kostnine, kar vodi do osteoporoze, ali zmanjšanje razgradnje, kar lahko vodi do osteopetroze. (12, 13, 14).

1.1.5 Biokemični kazalci kostne premene

Biokemični kazalci kostne premene so snovi, ki jih določamo v serumu, plazmi ali urinu. Nastajajo v procesu kostne premene in odražajo intenzivnost tega procesa. Delimo jih na kazalce tvorbe kostnine in kazalce razgradnje kostnine (Preglednica I). Kazalci tvorbe kostnine odražajo stopnjo aktivnosti osteoblastov. So stranski produkti sinteze kolagena, matriksni proteini ali osteoblastni encimi. Kazalci razgradnje kostnine odražajo aktivnost osteoklastov in so produkti razgradnje kolagena ali osteoklastni encimi. Ker sta proces tvorbe in razgradnje kostnine tesno povezana, se nekateri od kazalcev sproščajo tako pri razgradnji kot tvorbi kostnine in tako odražajo celotno kostno premeno. Težavo pri določanju kazalcev kostne premene predstavlja predvsem njihova nizka specifičnost, saj

nastajajo tudi v nekaterih drugih tkivih. Spremembe v vrednostih biokemičnih kazalcev kostne premene niso bolezensko specifične in odražajo le spremembo v kostni presnovi, ne pa tudi vzroka za spremembo. Imajo tudi veliko intra- in interindividualno variabilnost saj so koncentracije v krvi pod vplivom cirkadialnega ritma ter prehrane (15, 16).

Razvoj metod določanja biokemičnih kazalcev, ki specifično odražajo stopnjo tvorbe kostnine ali razgradnje kostnine, je povečal spekter analiz, ki se uporabljajo pri ocenjevanju patogeneze skeleta. To so neinvazivne in poceni metode, ki so ob pravilni uporabi in interpretaciji zelo uporabne predvsem pri spremljanju uspešnosti zdravljenja presnovnih bolezni kosti, predvsem pri boleznih, kjer sta razgradnja ali tvorba kostnine spremenjena. Določamo jih pred začetkom zdravljenja ali pa med zdravljenjem, če želimo preveriti učinek zdravil v času (manj kot eno leto), ko spremembe v MKG (mineralna kostna gostota) še niso zaznavne (16 - 20).

Preglednica I: Biokemični kazalci kostne premene (20 - 24).

BIOKEMIČNI KAZALCI TVORBE KOSTNINE	BIOKEMIČNI KAZALCI RAZGRADNJE KOSTNINE
Osteoblastni encimi	Osteoklastni encimi
<ul style="list-style-type: none"> • Kostno specifična alkalna fosfataza 	<ul style="list-style-type: none"> • Tartrat rezistentna kislja fosfataza • Katepsin K
Matriksni proteini	Razgradni produkti kolagen tipa I
<ul style="list-style-type: none"> • Osteokalcin 	<ul style="list-style-type: none"> • Hidroksiprolin • Piridinolin • Deoksi piridinolin
Produkti sinteze kolagen tipa I:	Prečno povezani telopektidi kolagen tipa I
<ul style="list-style-type: none"> • Prokolagen I C-terminalni propeptid • Prokolagen I N-terminalni propeptid 	<ul style="list-style-type: none"> • N-terminalni prečnopovezani telopektid • C-terminalni prečnopovezani telopektid • RANKL • OPG

1.2 FIBROBLASTNI RASTNI DEJAVNIK 23

Fosfati so drugi najbolj zastopani anion v telesu in imajo pomembno vlogo v celičnem signaliziranju, aktivnosti encimov, metabolizmu, delovanju mišic in živčevja, prenosu kisika, so v fosfolipidih v celičnih membranah, proteinih in imajo osrednjo vlogo v mineralizaciji kosti. Ker ima v telesu tako hipofosfatemija kot hiperfosfatemija resne negativne učinke, je homeostaza fosfatov natančno uravnavana. Še pred dobrim desetletjem so glavno vlogo v uravnavanju homeostaze Ca ionov in fosfatov pripisovali PTH in $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ s poudarkom na homeostazi Ca ionov (25, 26).

Leta 1994 so v študiji na bolnikih s tumorjem povzročeno osteomalacijo poročali o proteinu, ki inhibira od natrija odvisen tubulni transport fosfatov v ledvicah in ima za posledico hipofosfatemijo, pospešeno renalno izločanje fosfatov in znižane vrednosti $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ v krvi. Šest let kasneje so proučevali fosfatonin in ga identificirali kot člana družine fibroblastnih rastnih dejavnikov (FGF; angl. Fibroblast Growth Factor), FGF23. Odkritje FGF23 je omogočilo razkrivanje kompleksne povezavo med FGF23, PTH in $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pri uravnavanju homeostaze fosfatov v telesu ter omogočilo boljše razumevanje bolezni, ki vključujejo metabolizem Ca ionov in fosfatov (27, 28, 29, 30).

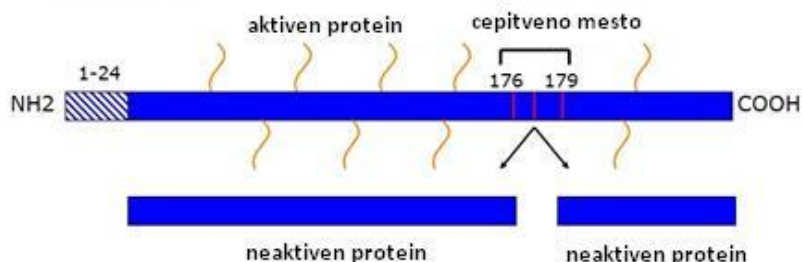
1.2.1 Protein FGF23

FGF23 je protein, sestavljen iz 251 aminokislin (32 kD). Njegov N-terminalni del je homologen domeni, značilni za družino FGF. C-terminalni del proteina, dolg 71 aminokislin, je specifičen za FGF23. Gen za FGF23 se nahaja na kromosomu 12p13. FGF23 spada v poddružino FGF19, ki jo sestavljajo FGF23, FGF19 in FGF21. Od ostalih članov družine FGF, ki delujejo kot lokalni regulatorji, se poddružina FGF19 razlikuje po svoji endokrini funkciji – sprošča se v krvni obtok in potuje do tarčnih celic, na katere deluje (31, 32, 33).

Strukturna analiza FGF23 je pokazala, da protein vsebuje cepitveno mesto, pomembno za uravnavanje njegove biološke aktivnosti (Slika 3). Biološko aktiven je le nerazcepljen protein, med tem ko fragmenti, nastali po cepitvi, niso aktivni. Mutacije v cepitvenem mestu povezujejo z avtosomno dominantnim hipofosfatnim rahitisom (ADHR), pri katerem je zaradi onemogočene proteolitične cepitve FGF23 njegova razpolovna doba podaljšana (31).

FGF23 se v glavnem izraža v osteocitih v kosteh. V manjši meri se izraža tudi v pericitom podobnih celicah v kostnem mozgu, v ventrolateralnih talamičnih jedrih, timusu in limfnih

žlezah. Najvišji nivo izražanja dosega FGF23 v osteocitih, najštevilčnejših kostnih celicah, zato se predvideva, da ta prispeva največ k serumskim koncentracijam FGF23 (29, 32).

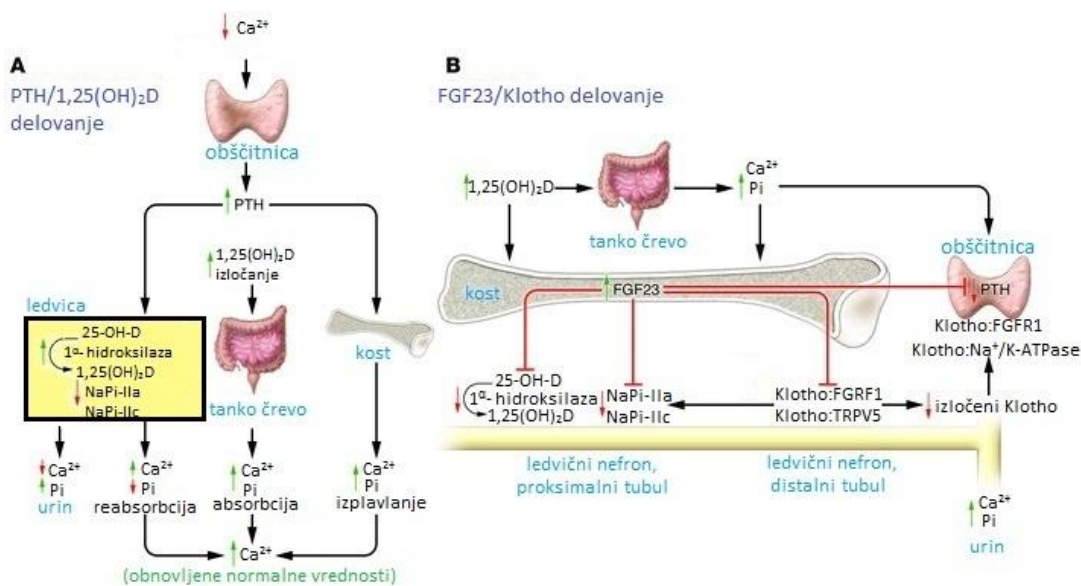


Slika 3: Cepitveno mesto FGF23.

1.2.2 Delovanje FGF23

Delovanje FGF23 je pogojeno z njegovo vezavo na FGF receptor (FGFR) in prisotnostjo koreceptorja Klotho v tarčnih tkivih za FGF23. In vitro študije kažejo, da se FGF23 s svojim N-terminalnim delom veže na FGFR1, FGFR3 ali FGFR4 le ob prisotnosti Klotho, ki se veže na C-terminalni del FGF23 in FGFR (32, 36, 37).

FGF23 v glavnem deluje na ledvice, kjer uravnava reabsorbcijo fosfatov in tvorbo $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Inhibira prehajanje fosfatov z natrij fosfatnim kotransporterjem IIa in IIc (NaPi-IIa in NaPi-IIc), zmanjšuje aktivnost 1α -hidroksilaze ter zvišuje aktivnost 24-hidroksilaze. Povišane vrednosti FGF23 vodijo v hipofosfatemijo in posledično v rahitis oziroma osteomalacijo in znižane vrednosti $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Pri tem je koncentracija Ca in PTH v krvi lahko normalna. Znižane vrednosti FGF23 lahko imajo za posledico hiperfosfatemijo in povišane vrednosti $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (29, 30, 32). Miši z izbitim genom za FGF23 so imele prisotne kalcinacije mehkih tkiv, retardacijo v rasti, nenormalno mineralizacijo kosti in krajšo življenjsko dobo. Podoben fenotip so opazili tudi pri miših z delecijami ali inaktivacijskimi mutacijami v genu za Klotho, kar dokazuje nujnost prisotnosti proteina Klotho za učinke FGF23 (38-41). Zaradi vpliva FGF23 na aktivnosti 1α -hidroksilaze in posledično tudi na procese prezgodnjega staranja, povezujejo FGF23 z razvojem senilne osteoporoze in žilnih kalcinacij (68). Povišane koncentracije FGF23 v primerjavi s kontrolno skupino povezujejo tudi s procesom celjenja in regeneracije zlomljene kosti in ga tako uvrščajo med kandidatne kazalce zlomov kosti (69).



Slika 4: Povezanost delovanja FGF23, PTH, 1,25(OH)₂D in proteina Klotho. (A) PTH/1,25(OH)₂D delovanje: Padec serumskih koncentracij Ca ionov stimulira izločanje PTH iz obščitnice. Zato se zavre izločanje Ca ionov z urinom, stimulira aktivnost 1 α -hidroksilaze in poveča nivo 1,25(OH)₂D v krvi, poveča se izločanje fosfatov preko ledvic in izplavljanje Ca ionov ter fosfatov iz kosti. 1,25(OH)₂D pa v tankem črevesju povzroči pospešeno absorpcijo Ca ionov, ki nato zavre sekrecijo PTH. (B) FGF23/Klotho delovanje: FGF23, ki nastaja v kosteh, v glavnem deluje na ledvice, kjer zavira reabsorpcijo fosfatov v ledvicah in tvorbo 1,25(OH)₂D z inhibicijo aktivnosti 1 α -hidroksilaze. Prav tako pa FGF23 v ledvicah zavira izražanje Klotho, ki uravnava reabsorpcijo Ca ionov in deluje na obščitnico, kjer zavira sekrecijo PTH (25).

Kompleks Klotho/FGFR1 se nahaja tudi v obščitnici in tako omogoča, da FGF23 zavira izražanje in sekrecijo PTH neposredno. Ob tem onemogoči aktivacijo 1 α -hidroksilaze preko PTH, hkrati pa prevzame njegove fosfaturične učinke. *In vitro* in *in vivo* študije kažejo, da ob prisotni hiperkalcemiji in hiperfosfatemiji FGF23 zavira tako izražanje kot sekrecijo PTH. V primeru obsežnega izgubljanja Ca ionov in fosfatov preko ledvic pa učinki FGF23 v obščitnici niso prisotni, kar pripisujejo rezistenci obščitnice na FGF23 in pojavu sekundarnega hiperparatireodizma (43, 44, 45). Yuan je v svoji študiji na mišjem modelu pokazal, da popolna izguba FGF23/Klotho signalne poti ne vpliva na fosfaturični

vpliv PTH, torej FGF23/Klotho signalna pot ni nujno potrebna za delovanje PTH. Tako lahko PTH, kljub nenormalnim serumskim vrednostim FGF23 opravlja funkcijo uravnavanja Ca ionov in fosfatov v telesu (46). Delovanje PTH in $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ter FGF23 in Klotho prikazuje slika 4.

Protein Klotho

Protein Klotho ima ob delovanju kot koreceptor za FGF23 tudi mnoge druge funkcije. Transmembranska oblika proteina deluje kot koreceptor za FGF23. Topna oblika, ki nastane s postranslacijskimi modifikacijami ali proteolitično cepitvijo transmembranske oblike, pa deluje endokrino. Dokazali so, da sodeluje pri uravnavanju inzulina/IGF-1 signalne poti in tako zavira oksidativni stres, deluje kot glukuronidaza in aktivira TRPV5 ionski kanal za tubulno reabsorbcijo kalcijevih ionov, varuje pred disfunkcijo endotelija z uravnavanjem tvorbe NO in ROS (reaktivne kisikove spojine), uravnava proces celičnega staranja, sodeluje v protein-kinaznem signaliziranju, vpliva na Wnt signalno pot ter preko Na^+/K^+ -ATPaze uravnava sekrecijo PTH (42). V ledvicah FGF23 zavira tudi izražanje proteina Klotho, ki uravnava reabsorbcijo Ca ionov (25).

1.2.3 Uravnavanje FGF23

Nivo cirkulirajočega FGF23 uravnava tako transkripcijski kot posttranslacijski mehanizmi. *In vitro* in *in vivo* študije transkripcije gena za FGF23 kažejo, da aktivnost tega gena uravnava tako sistemski kot lokalni dejavniki (47).

Sistemsko uravnavanje FGF23

Sistemsko uravnavanje FGF23 deluje predvsem na principu negativne povratne zanke preko $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Ta preko VDR (vitamin D receptor) in VDRE (angl. vitamin D response element) v promotorju gena za FGF23 direktno stimulira izražanje FGF23 v osteocitih. FGF23 pa v ledvicah zavira nastajanje $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (47, 48, 49).

Glavna vloga FGF23 je uravnavanje homeostaze fosfatov v telesu. Študije na mišjih modelih kažejo, da dodajanje fosfatov pri miših zviša FGF23 v krvi (50). Rezultati študij o vplivu koncentracij fosfatov na izražanje FGF23 pri ljudeh pa so nasprotujoči (47, 51, 52,). Študije na osebah brez očitnih bolezni ledvic, ki so peroralno prejemale fosfate ali fosfatne vezalce, niso pokazale povezanosti med koncentracijo FGF23 in ravno fosfatov v serumu.

To pripisujejo hitremu odgovoru PTH na koncentracijo fosfatov, med tem ko je odgovor FGF23 kronične narave (65, 66). Predvideva se, da fosfati ne vplivajo direktno na izražanje FGF23. Vpliv fosfatov na izražanje FGF23 tako ostaja neznanka, saj receptorja, preko katerega naj bi fosfati uravnavali izražanje FGF23, še niso odkrili. Ca in PTH naj bi posredno uravnavala izražanje FGF23, saj niti Ca ioni niti PTH direktno ne povečujeta aktivnosti promotorja v genu za FGF23 v osteoblastih (25, 47, 53).

Lokalno uravnavanje FGF23

Lokalni dejavniki, ki izvirajo iz kosti in uravnavajo FGF23, so: Phex, izvencelični matriksni protein Dmp1 ter matriksni izvencelični fosfoglikoprotein MEPE (47, 54).

Mutacije v genu za *Phex* povečajo izražanje gena za FGF23 v osteocitih. Mehanizem, kako Phex uravnava izražanje *FGF23*, ni poznan. Predvideva se, da se v primeru mutacij v genu za Phex, ki inaktivirajo delovanje encima, kopiči neznani substrat. Ta substrat pa naj bi stimuliral promotorsko aktivnost v genu za FGF23 (54). Študije na mišjih modelih kažejo, da imajo delecije v genu *Phex* za posledico povišane vrednosti FGF23, hipofosfatemijo, znižane vrednosti 1,25(OH)₂D ter rahitis oziroma osteomalacijo. Pri miših z povečanim izražanjem *Phex* pa povišanih vrednosti FGF23 niso uspeli znižati, kar kaže na indirekten vpliv Phex na izražanje *FGF23* (55, 56).

Dmp1 oziroma aktivna fragmenta (N-terminalni in C-terminalni fragment), ki nastaneta z poroteolitično cepitvijo Dmp1 s proteazo (BMP1, angl. bone morphogenic protein 1 ali katepsin B), stimulirata mineralizacijo kostnega tkiva. Inaktivirajoče mutacije v genu za Dmp1 imajo za rezultat enake posledice kot mutacije v genu za Phex. Mehanizem, kako pomanjkanje učinkov Dmp1 stimulira izražanje FGF23, ni poznan. Predvideva se, da inaktivirajoče mutacije gena za Dmp1 in Phex povzročijo povečano izražanje gena za FGF23 preko nepoznanega substrata za Phex, ki se zaradi mutacije v genu za Phex kopiči v kostnem matriksu, ali pa inaktivirajoče mutacije v genu za Dmp1 ali Phex direktno vplivajo na funkcijo osteocitov, kar povzroči povečano tvorbo FGF23 (25).

MEPE oziroma njegov proteolitični fragment ASARM (angl. acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif) je inhibitor mineralizacije in stimulira izražanje FGF23 z inhibicijo PHEX. Posledica povečanega izražanja gena za MEPE je povečano izražanje FGF23, pospešeno izločanje fosfatov preko ledvic in zmanjšana mineralizacija kostnine. Slednja pa ni odvisna od nivoja FGF23, temveč od nivoja MEPE (57).

Dmp1 in MEPE sta člana družine SIBLING (angl. short integrin binding-ligand, N-linked glycoprotein family). Phex uravnava delovanje Dmp1 in MEPE. Preprečuje njuno

proteolitično cepitev in nastajanje fragmenta ASARM (58,59). ASARM je aktiven peptid, ki inhibira mineralizacijo kostnine z vezavo na hidroksiapatit. Veže se lahko na PHEX in inhibira njegovo delovanje ter izražanje, kar ima za posledico povišane vrednosti FGF23. Inhibira tudi izražanje genov v osteoblastih in njihovo diferenciacijo z zniževanjem razmerja RANKL/OPG (60). Študije na mišjih modelih s hipofosfatemijo, ki so jim injicirali inhibitorje katepsina (encim, ki od MEPE in Dmp1 cepi ASARM) kažejo normalno mineralizacijo kostnine brez korekcije v izražanju FGF23 ali hipofosfatemije, kar kaže na ločeno uravnavanje mineralizacije kostnine in hipofosfatemije s strani PHEX (61).

1.2.4 Vloga FGF23 pri boleznih z motnjami v presnovi fosfatov

Patološko zvišane ali znižane vrednosti FGF23 so najpogosteje posledica mutacije v genu za FGF23 ali enem izmed genov, ki je vključen v signalne poti FGF23. Dedne bolezni z motnjami v signalnih poteh FGF23 vodijo v metabolne motnje, kot je hipo- ali hiperfosfatemija. Najpogostejše dedne motnje prikazuje preglednica II. Tudi nekateri tumorji prekomerno proizvajajo FGF23. Primer takšne bolezni je TIO (angl. Tumor-induced osteomalacia) (64).

Preglednica II: Najpogostejše dedne bolezni z motnjami v koncentraciji FGF23.

Bolezen	Gen z mutacijo	Koncentracija FGF23
Avtosomno dominantni hipofosfatni rahitis	<i>FGF23</i>	↑
Na kromosom X vezan hipofosfatni rahitis	<i>Phex</i>	↑
Avtosomno recesivni hipofosfatni rahitis	<i>Dmp1</i>	↑
Družinska tumorska kalcinoza	<i>FGF23 in Glant3</i>	↓

V zadnjih letih so raziskovalci veliko pozornosti posvečali vlogi FGF23 pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo (CKD; angl. chronic kidney disease), ki ima za posledico razvoj renalne osteodistrofije. Ugotovili so, da serumske koncentracije FGF23 naraščajo s padajočo ledvično funkcijo oziroma z napredujočo CKD. Vrednosti FGF23 začnejo naraščati že pri zmerno okrnjeni sposobnosti glomerulne filtracije in ko je koncentracija fosfatov še normalna. Vendar pa v zgodnjih fazah CKD, ko imajo bolniki še normalno

koncentracijo fosfatov, značilne povezave med FGF23 in stopnjo glomerulne filtracije niso določili. Kot vzrok za visoke vrednosti FGF23 opisujejo rezistenco ledvic oziroma zmanjšano izražanje *Klotho* v okvarjeni ledvici. Bolniki s CKD v stadiju 1 do 4 imajo še normalne vrednosti fosfatov, v stadiju 5 pa le te začnejo naraščati zaradi presežene kapacitete delovanja okvarjenih ledvic. Bolniki s končnim stadijem CKD imajo tako ekstremno visoke vrednosti FGF23. FGF23 pri bolnikih z CKD zato predlagajo kot nov prognostični kazalec sprememb v mineralizaciji kosti, nastanku žilnih kalcinacij in tveganja smrti, ter kot morebitno novo tarčo za zdravljenje pri bolnikih s CKD (65, 66, 67).

2 NAMEN DELA

Za učinkovit proces kostne premene je potrebna natančno uravnavana homeostaza Ca ionov in fosfatov v telesu. Še pred desetletjem so glavno vlogo pri uravnavanju Ca ionov in fosfatov pripisovali PTH in $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Odkritje FGF23 je razkrilo kompleksno povezavo med FGF23, PTH in $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ pri uravnavanju homeostaze predvsem fosfatov v telesu. FGF23, ki se izraža v glavnem v kosteh, deluje kot fosfaturični hormon v ledvicah in znižuje serumsko koncentracijo fosfatov. Ob tem zavira tudi izražanje 1α -hidroksilaze in sodeluje pri uravnavanju kalciotropnih hormonov. Tako naj bi FGF23 vplival na kvaliteto kostnega tkiva in bil povezan z nastankom kostnih bolezni. Vlogo FGF23 pri razvoju renalne osteodistrofije opisujejo številne raziskave tako na živalskih modelih kot pri ljudeh (65, 66, 67). Podatkov o vlogi FGF23 pri osteoporozi pri ljudeh pa nismo zasledili.

Namen našega dela je ugotoviti:

- Povezanost FGF23 in koncentracije proteina Klotho, ki naj bi bil nujno potreben kofaktor za delovanje FGF23.
- Vpliv izražanja VDR in PTH1R na aktivnost FGF23.
- Povezanost FGF23 s kazalci homeostaze Ca ionov in sicer s serumskimi koncentracijami Ca ionov, fosfatov ter kalciotropnih hormonov (sistemski dejavniki regulacije kostne premene)
- Povezanost FGF23 s signalno potjo RANK/RANKL/OPG, ki ima osrednjo vlogo v uravnavanju osteoklastogeneze, predstavlja lokalni dejavnik regulacije kostne premene in je povezana z razvojem osteoporoze.
- Povezanost FGF23 z MKG pri bolnikih z osteoporozo, saj je MKG najpomembnejši kazalec osteoporoze.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANA SKUPINA

V raziskavo smo vključili 110 preiskovancev, napotnih na polovično ali popolno zamenjavo kolčnega sklepa zaradi zloma vratu stegenice (N=59) ali osteoartroze (N=51) na Oddelek za travmatologijo Splošne bolnišnice Celje ali v Ortopedsko bolnišnico Valdoltra. V raziskavo so bili vključeni preiskovanci brez znanih sistemskih ali drugih presnovnih bolezni, ki vplivajo na kosti ali presnovo mineralov. Preiskovanci v 12 mesecih pred operacijo niso prejeli farmakoloških hormonskih pripravkov ali dodatkov Ca ionov ali vitamina D.

3.2 MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE

Diagnozo so preiskovancem postavili na podlagi merjenja MKG z dvoenergijsko rentgensko absorpciometrijo (DEXA; angl. Dual Energy X-Ray Absorptiometry) in kliničnim ter radiografskim pregledom kolka v Splošni bolnišnici Celje. Preiskovancem so izmerili MKG kolka (MKG_{tot}; angl. total hip bone mineral density), vratu stegenice (MKG_{fn}; angl. femoral neck bone mineral density) in področja ledvene hrbtenice (MKG_{ls}; lumbar spine bone mineral density).

3.3 MERJENJE SERUMSKIH IN PLAZEMSKIH KAZALCEV

Preiskovancem je bila odvzeta kri in v Splošni bolnišnici Celje izmerjene serumske vrednosti Ca ionov, fosfatov, kreatinina, iPTH (intaktni PTH) in 25(OH)D (25 hidroksivitamin D). V serumu oziroma plazmi, ki smo ju do uporabe hranili na -80°C, smo določili še koncentracije FGF23, proteina Klotho in OPG. Iz serumskih vrednosti kreatinina in podatkov o starosti ter spolu smo po enačbi MDRD ocenili glomerulno filtracijo ledvic preiskovancev (70).

3.3.1 Merjenje koncentracij FGF23

Koncentracijo intaktnega proteina FGF23 smo merili v plazmi z encimskoimunskim testom. Uporabili smo Human Intact FGF-23 ELISA Kit (Immutopics, Inc. San Clemente, CA) in meritev izvedli po navodilih proizvajalca.

Princip: V testu uporabljamo dve vrsti protiteles, ena specifična za N-terminalni del FGF23 in druga specifična za C-terminalni del FGF23. Primarna protitelesa so vezana v mikrotitrski ploščici, sekundarna so konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP) in služijo detekciji FGF23. Vzorec, ki vsebuje FGF23, inkubiramo v mikrotitrski ploščici z vezanim primarnimi protitelesi in dodanimi označenimi sekundarnimi protitelesi. Povezava FGF23 z primarnimi in sekundarnimi protitelesi tvori »sendvič« kompleks. Po dodatku konjugiranega substrata (TMB; tetrametilbenzidin) poteče barvna reakcija, ki jo po inkubaciji ustavimo. Merimo absorbanco, ki je sorazmerna koncentraciji FGF23 v vzorcu. Princip metode prikazuje slika 5.

3.3.2 Merjenje koncentracij proteina Klotho

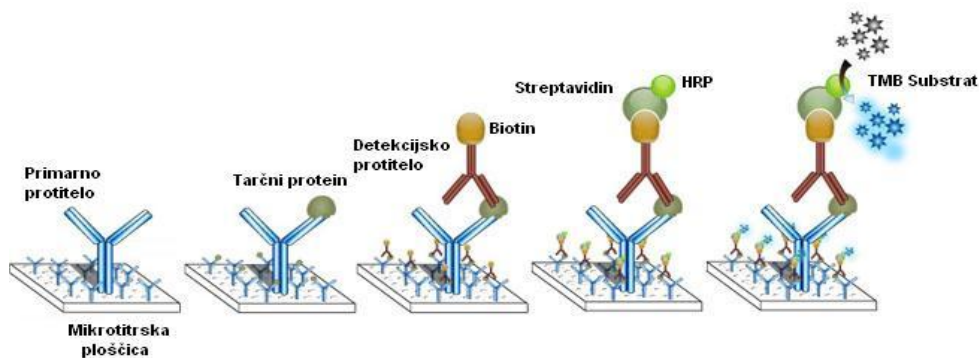
Serumske koncentracije proteina Klotho smo merili z encimskoimunsko metodo po navodilih proizvajalca testa Soluble α -Klotho ELISA (IBL International, Japonska).

Princip: Test je »sendvič« ELISA s specifičnimi primarnimi in sekundarnimi protitelesi za proteina Klotho. Nastali »sendvič« kompleks inkubiramo s konjugiranim substratom (TMB), da poteče barvna reakcija, ustavimo reakcijo in merimo absorbanco, ki je sorazmerna s koncentracijo α -Klotho v vzorcu. Princip metode prikazuje slika 5.

3.3.3 Merjenje koncentracij OPG

Koncentracijo OPG v serumu smo merili z encimskoimunsko metodo po navodilih proizvajalca testa Osteoprotegerin ELISA (Biomedica Austria, Vienna, Austria). Okvirne referenčne vrednosti, ki jih podaja proizvajalec, so 1,8 pmol/L (n = 1134, starost = 19-96 let).

Princip: V testu uporabljamo dve vrsti protiteles, ki prepoznajo OPG. Monoklonska protitelesa so vezana na površino mikrotitrške plošče in vežejo OPG iz vzorca, na katerega se nato pripnejo poliklonska protitelesa iz raztopine, ki so označena z biotinom. Po spiranju prebitka protiteles dodamo konjugat hrenove peroksidaze in streptavidina. Streptavidin iz konjugata se poveže z biotinom na imunskem kompleksu. Po inkubaciji in spiranju dodamo kromogeni substrat za peroksidazo (TMB), inkubiramo, ustavimo reakcijo in izmerimo absorbanco nastalega produkta, ki je sorazmerna koncentraciji OPG v vzorcu. Princip metode prikazuje slika 5.



Slika 5: Princip encimskoimunske metode »sendvič« ELISA.

3.4 ODVZEM KOSTNIH VZORCEV

Vzorec kostnega tkiva (cca 1cm³), je bil odvzet iz intertrohantra proksimalnega dela stegenice in sicer iz kostnega tkiva, ki se pri rutinski operaciji vstavitve umetnega kolčnega sklepa odstrani in je namenjen uničenju. Preiskovanci tako niso bili dodatno obremenjeni ali izpostavljeni nevarnosti za namen študije. Trabekularno kostno tkivo za naše analize smo dobili iz področja intertrohantra. Kostni vzorci so bili takoj po odvzemu zamrznjeni v tekočem dušiku in nato shranjeni na -80°C.

3.5 DOLOČANJE IZRAŽANJA GENOV

3.5.1 Izolacija celokupne RNA

Kostno tkivo, ki smo ga hranili na – 80°C, smo uprašili s pomočjo homogenizatorja tkiva Mikro-Dismembrator S (Solis). Kovinsko kapsulo smo pred prenosom vzorca vsaj 5 minut hladili v tekočem dušiku. Po prenosu vzorca, ki smo ga ves čas hladili v tekočem dušiku, v kapsulo, smo le-to vpeli v homogenizator in stresali 1 min na 2000 RPM. Po homogenizaciji smo kapsulo z vzorcem hladili 2 min v tekočem dušiku. Približno 0,2 mg uprašenega kostnega tkiva smo prenesli v stehtano plastično epruvetko z 1 mL TRIzol reagenta. Po prenosu uprašenega vzorca v TRIzol reagent smo plastično epruvetko ponovno stehali in nato po delno spremenjenih navodilih proizvajalca TRIzol® Reagent (Invitrogen) izolirali celokupno RNA.

Spremembe v postopku so bile sledeče: Po inkubaciji v TRIzol reagentu smo s centrifugiranjem (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) 5 min in 10 000 g ločili raztopino od netopnega anorganskega kostnega matriksa. Pri ločevanju organske in vodne faze po dodatku kloroforma smo čas centrifugiranja podaljšali iz 15 na 20 min ter iz 10 na 25 min pri centrifugiranju oborjene RNA po dodatku izopropilnega alkohola. Izolirano celokupno RNA smo sušili 15-20 min na zraku in raztapljali 2-3 dni v RNase-free vodi na 2-8°C.

Kemikalije:

- TRIzol reagent (Invitrogen) (fenol, gvanidinijev izotiocianat)
- Kloroform
- Izopropilni alkohol
- 75% etanol
- RNase-free voda

3.5.2 Vrednotenje izolirane RNA

Koncentracijo in čistost izolirane RNA smo ocenili s pomočjo UV/Vis spektrofotometrije in sicer z merjenjem absorbance pri treh valovnih dolžinah: 230 nm, 260 nm in 280 nm. Koncentracijo smo določili z merjenjem absorbance pri 260 nm, kjer absorbirajo nukleinske kisline. Z razmerji med posameznimi valovnimi dolžinami (A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230}) pa smo ocenili čistost izolirane RNA. Razmerje A_{260}/A_{280} nam poda oceno čistosti RNA. Vrednost razmerja $\approx 2,0$ pomeni čisto RNA, nižje vrednosti pa kažejo na prisotnost proteinov, fenola ali drugih kontaminantov, ki absorbirajo blizu valovne dolžine 280 nm. Razmerje A_{260}/A_{230} nam poda sekundarno oceno čistosti RNA. Navadno je višje od razmerja A_{260}/A_{280} in sicer v območju 1,8-2,2. Nižja vrednost od 1,8 pomeni prisotnost kontaminantov, ki absorbirajo pri 230 nm. Za merjenje absorbanc pri omenjenih valovnih dolžinah smo uporabili spektrofotometer Nanodrop ND-1000.

Celovitost izolirane RNA smo ocenili s kapilarno elektroforezo na aparatu Agilent Bioanalyzer 2100. Uporabili smo Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) in analizo izvedli po navodilih proizvajalca. Aparat uporablja tehnologijo mikrofluidov in mikrokapilarne elektroforeze, ki je alternativa tehnologiji klasične elektroforeze. Pri delu uporabljamo čipe z vdolbinicami, ki so povezane v sistem mikrokanalčkov, napolnjenih z gelom v katerem je fluorescentno barvilo in polimer, ki omogoča ločbo glede na velikost RNA molekul. Ob kontaktu z elektrodami postane čip integrirani električni krog. Nabite

molekule tako potujejo po gelu na osnovi svojega naboja in velikosti. Komplekse fluorescentnega barvila in RNA zaznamo z lasersko inducirano fluorescenco. Dobljeni rezultati se nato prevedejo v elektroferograme in gelske slike.

3.5.3 Obratno prepisovanje

Obratno prepisovanje ali reverzna transkripcija je postopek, v katerem enoverižno RNA obratno prepíšemo v komplementarno DNA (cDNA) s pomočjo encima reverzna transkriptaza. Dobljeno cDNA lahko nato uporabimo v reakciji verižne polimerizacije PCR, ki skupaj z reakcijo obratnega prepisovanja predstavlja trenutno najobčutljivejšo metodo tako za kvantitativno kot kvalitativno vrednotenje mRNA. Za izvedbo reakcije obratnega prepisovanja potrebujemo: RNA, encim reverzna transkriptaza, ustrezne oligonukleotidne začetnike, zmes dNTP in inhibitor RNaz. Uporabili smo naključne oligonukleotidne začetnike (heksamere) za prepis celokupne RNA.

Za reakcijo obratnega prepisovanja smo uporabili High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) z dodatkom inhibitorja RNaz. Reakcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Sestava reakcijske zmesi in pogoji reakcije so prikazani v preglednici III in IV.

Preglednica III: Sestava reakcijske zmesi za reakcijo obratnega prepisovanja.

Sestavina	Volumen (μL)
RT pufer (10x)	10,0
Zmes dNTP (25x)	4,0
Naključni začetniki (heksameri) (10x)	10,0
Reverzna transkriptaza (50 U/μL)	5,0
Inhibitor RNaz (20 U/μL)	5,0
Celokupna RNA	10 μg
Voda brez RNaz	ad 100

Preglednica IV: Pogoji reakcije obratnega prepisovanja.

Faza	temperatura	čas
Prileganje začetnikov	25°C	10 min
Prepisovanje	37°C	120 min
Prekinitev reakcije	85°C	5 min
	4°C	∞

Kemikalije:

- Komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)
- RNase inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Oprema:

- Ciklični termostat peqSTAR (peqlab)

3.5.4 PCR v realnem času

PCR v realnem času je kvantitativna metoda, ki omogoča sledenje količine PCR produkta (DNA ali cDNA) med reakcijo s pomočjo fluorescence izbranega barvila, ki ga vključimo v reakcijo. V uporabi sta dve vrsti barvil: barvila, ki so vezana na specifična oligonukleotidna zaporedja (sonde) in barvila, ki nespecifično interkelerajo v dvojnovijačno DNA. V slednjem primeru specifičnost reakcije zagotavljajo zgolj oligonukleotidni začetniki. Za namen naše raziskave smo uporabili oboje. Za izvedbo reakcije potrebujemo ciklični termostat z detektorjem, ki meri fluorescenco v rednih intervalih tekom reakcije pomnoževanja.

3.5.4.1 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov in sonde

Za določanje izražanja gena za RANKL, RANK, OPG, PTH1R, FGF23 ter hišni (referenčni) gen RPLP0 (ribosomalni protein P0) smo oligonukleotidne začetnike načrtovali sami s pomočjo programa Primer-BLAST (71), na podlagi objavljenega zaporedja omenjenih genov (72). Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za gen *RANKL*, *RANK*, *OPG*, *PTH1R*, *FGF23* in *RPLP0* prikazuje preglednica V. S pomočjo programa Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies) (73) smo preverili ali načrtovani oligonukleotidni začetniki tvorijo homodimere, heterodimere ali sekundarne strukture, ki

jih v PCR reakciji ne želimo. Za določanje izražanja gena za VDR ter hišnega (referenčnega) gena GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza) smo uporabili sonde iz nabora že pripravljenih kompletov proizvajalca Applied Biosystems (ZDA), zato njihovo nukleotidno zaporedje ni poznano.

Preglednica V: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo PCR v realnem času.

Gen	Začetnik	Zaporedje	Tm(°C)
RANKL	F-začetnik	GGCCAGGTTGTCTGCAGCGT	72,1
	R-začetnik	TGGGAACCAGATGGGATGTCGGT	74,4
RANK	F-začetnik	TTATGAGCATCTGGGACGGTGCTGT	73,1
	R-začetnik	AAGGAAGGTACAGTTGGTCCAGGGT	69,4
OPG	F-začetnik	CCAGCCCTGAAAGCGTTAACCCCT	71,6
	R-začetnik	TGGAGATGTCCAGAAACACGAGCGC	75,8
PTHIR	F-začetnik	GGCCATGCCTACCGACGCTG	60,2
	R-začetnik	GGCGGTCAAACACCTCCCGTTC	60,2
RPLP0	F-začetnik	TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT	63,7
	R-začetnik	CAATCTGCAGACAGACACTGG	63,6
FGF23*	F-začetnik	TCAGAGGATGCTGGCTTTGTGGTG	59,2
	R-začetnik	TCCGGGTCGAAATAGTGTGATCCAA	57,8
FGF23**	F-začetnik	CCCATCAGACCATCTACAGTGCCC	71,5
	R-začetnik	TCACCACAAAGCCAGCATCCTCT	71,0
FGF23***	F-začetnik	ACAGCCAGGAACAGCTACCACCT	69,0
	R-začetnik	TCATCAGGGCACTGTAGATGGTCTG	70,2

*,**,*** - označujejo tri različne pare oligonukleotidnih začetnikov za *FGF23*.

3.5.4.2 Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in temperature prileganja za gen *RANKL*, *RANK*, *PTHIR*, *OPG*, *RPLP0* in *FGF23*

Pripravili smo zmes 22 vzorcev, ki smo jim določili $RIN \geq 4$ in jih zaradi manjkajočih podatkov nismo vključili v študijo. Iz zmesi z izhodno koncentracijo cDNA 100 ng/ μ L, smo pripravili standarde 30, 15, 7.5, 3.75 in 1.875 ng cDNA. Za določitev optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov smo najprej pripravili reakcijske mešanice s koncentracijo 100 nM, 200nM, 300nM in 600nM oligonukleotidnih začetnikov in izbrali temperaturo prileganja 60°C. Opazovali smo talilno krivuljo, pri kateri je pomembno, da

nastaja samo en produkt, in umeritveno krivuljo ter njeno učinkovitost, ki naj bo čim bliže številu 2.

Pogoje merjenja in pripravo reakcijske zmesi za posamezno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov prikazujeta preglednica VI in VII.

Preglednica VI: Priprava reakcijske zmesi za reakcijo PCR v realnem času za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za gen *RANKL*, *RANK*, *OPG*, *PTH1R*, *RPLP0* in *FGF23, *FGF23***, *FGF23**** ter temperaturo prileganja.**

Konc. oligonukleotidnih začetnikov	100 nM	200 nM	300 nM	600 nM
Sestavina	Volumen (μL)	Volumen (μL)	Volumen (μL)	Volumen (μL)
Univerzalna zmes reagentov (EvaGreen)	5,85	5,7	5,55	5,1
F-oligonukleotidni začetnik (20 μM)	0,075	0,15	0,225	0,45
R-oligonukleotidni začetnik (20 μM)	0,075	0,15	0,225	0,45
Ultra čista voda	ad 9,0	ad 9,0	ad 9,0	ad 9,0
cDNA (2,5 ng/μL)	6,0	6,0	6,0	6,0
	15	15	15	15

Preglednica VII: Pogoji reakcije PCR v realnem času ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila.

korak	T ($^{\circ}\text{C}$)	čas	Št. ciklov
Začetna denaturacija	95	15 min	1
Denaturacija	95	30 s	50x
Prileganje in podaljševaje	60	60 s	kvantifikacija
MELTING	65-97		

Kemikalije:

- Univerzalna zmes reagentov (EvaGreen): 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR MiX Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia)
- Oligonukleotidni začetniki za *RANKL*, *RANK*, *OPG*, *PTH1R*, *RPLP0* in *FGF23**, *FGF23***, *FGF23**** (Sigma)

Oprema:

- PCR aparatura: LightCycler®480 II (Roche)
- Centrifuga: CENTRIC 322A (Tehtnica)

V primeru, ko smo opazili nastajanje več produktov ali neustrezno umeritveno krivuljo (FGF23), smo optimizacijo nadaljevali kot prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VIII: Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in temperature prileganja za merjenje izražanja gena za FGF23. (*, **, *** označujejo uporabljene oligonukleotidne začetnike za FGF23, katerih nukleotidno zaporedje je prikazano v preglednici V).

Oligonukleotidni začetnik	Koncentracija oligonukleotidnega začetnikov (nM)	T prileganja (°C)
FGF23	50*	61
	100*	61
	200*	62
	100F/150R*	61
	150F/100R*	61
	100F/200R*	61
	200F/100R*	61
	100F/300R*	61
	300F/100R*	61
	600**	61

Ko pogojev koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in temperature prileganja za uspešno PCR reakcijo nismo uspeli optimirati, smo se odločili za uporabo sond (*OPG*, *FGF23*).

3.5.4.3 PCR v realnem času

Reakcijo smo izvedli za vsak vzorec v trojniku za posamezen gen in hišni gen, v našem primeru gen za GAPDH in RPLP0. Pripravili smo 15 μL ali 20 μL reakcijske mešanice kot je prikazano v preglednicah IX do XI, in standarde za umeritveno krivuljo, kot je opisano v točki 3.5.4.2. Za merjenje izražanja *OPG* in pripadajočih hišnih genov (*GAPDH* in *RPLP0*) smo pripravili standarde z 40, 20, 10, 5 in 2.5 ng cDNA z izhodiščno koncentracijo cDNA 100ng/ μL .

Reakcijsko mešanico smo pripravili iz univerzalne zmesi reagentov (angl. universal master mix, UMM), oligonukleotidnih začetnikov ali sond in ultra čiste vode v dveh 2 mL plastičnih epruvtkah. Reakcijsko mešanico smo križno premešali v obeh plastičnih epruvtkah in jo nanесли v vdolbinice na ploščici. Nato smo nanесли še standarde in vzorce, ki smo jih redčili iz izhodiščne koncentracije cDNA (100 ng/ μL) na 2,5 ng/ μL cDNA (za merjenje izražanja *OPG* in pripadajočih hišnih genov pa na 1,5 ng/ μL) ali ultra čisto vodo za negativno kontrolo (NTC; angl. nontemplate control). Ploščico smo prekrili z lepljivo folijo, jo 20 minut centrifugirali na 2200 g in vstavili v PCR aparaturo. Pogoje reakcije prikazujeta preglednici XII in XIII.

Preglednica IX: Priprava reakcijske zmesi za reakcijo PCR v realnem času ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila (*RANKL*, *RANK*, *PTH1R*, *RPLP0*)

Sestavina	Volumen (μL)
Univerzalna zmes reagentov (EvaGreen qPCR Mix)	3,0
F-oligonukleotidni začetnik (20 μM)	0,075
R-oligonukleotidni začetnik (20 μM)	0,075
Ultra čista voda	ad 9,0
cDNA (2,5 ng/ μL)	6,0
	15

Preglednica X: Priprava reakcijske zmesi za reakcijo PCR v realnem času ob uporabi sond (*VDR, FGF23, GAPDH*).

Sestavina	Volumen (μL)
Univerzalna zmes reagentov (Probe qPCR qPCR Mix)	3,0
Sonde (Taqman)	0,75
Ultra čista voda	ad 9,0
cDNA (2,5 ng/ μL)	6,0
	15

Preglednica XI: Priprava reakcijske zmesi za reakcijo PCR v realnem času ob uporabi sond (*OPG, GAPDH, RPLP0*).

Sestavina	Volumen (μL)
Univerzalna zmes reagentov (Light Cycler Probes Master)	10
Sonde (Taqman)	1
Ultra čista voda	3
cDNA (2,5 ng/ μL)	6
	20

Preglednica XII: Pogoji PCR v realnem času ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila ali uporabi sond (*RANKL, RANK, PTH1R, VDR, GAPDH, RPLP0*).

korak	T ($^{\circ}\text{C}$)	čas	Št. ciklov
Začetna denaturacija	95	15 min	1
Denaturacija	95	30 s	} 50x kvantifikacija
Prileganje in podaljševanje	60	60 s	
MELTING*	65-97		

*Melting pri PCR v realnem času z uporabo oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila.

Preglednica XIII: Pogoji reakcije PCR v realnem času ob uporabi sond (OPG, GAPDH, RPLP0).

korak	T (°C)	čas	Št. ciklov
Začetna denaturacija	95	10 min	1
Denaturacija	95	10 s	} 50x } kvantifikacija
Prileganje in podaljševaje	60	30s	

Kemikalije:

- Univerzalna zmes reagentov (EvaGreen): 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR MiX Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia)
- Univerzalna zmes reagentov (Probe qPCR): 5X HOT FIREPol® Probe qPCR MIX Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia)
- LightCycler Probes Master (Roche)
- Oligonukleotidni začetniki za *RANKL*, *RANK*, *PTH1R*, *RPLP0* (Sigma)
- Sonda TaqMan za *VDR*, *OPG*, *FGF23* in *GAPDH* (Applied Biosystems)

Oprema:

- PCR aparatura: LightCycler®480 II (Roche)
- Centrifuga: CENTRIC 322A (Tehtnica)

3.6 STATISTIČNE METODE

Statistično analizo smo izvedli s pomočjo računalniškega programa SPSS/PASW v. 18.0.0 (IBM, Chicago, IL, USA). Preiskovance smo na podlagi diagnoze razdelili v dve skupini: skupino preiskovancev z osteoporozo in skupino preiskovancev z osteoartrazo.

3.6.1 Kolmogorov – Smirnov in Shapirov – Wilkov test normalnosti porazdelitve

Pred nadaljnjo statistično obdelavo smo preverili normalnost porazdelitve vseh izmerjenih parametrov v posamezni podskupini s Kolmogorov-Smirnovim ali Shapirov – Wilkovim testom. Slednji se uporablja v primeru majhnega števila preiskovancev. Normalno porazdelitev smo poskušali dobiti tudi z logaritmiranjem podatkov. Za parametre z normalno porazdelitvijo smo uporabili parametrične teste (ANCOVA ali t-test). Za

parametre, pri katerih porazdelitev ni bila normalna, pa smo uporabili neparametrične teste (Mann-Whitneyevim test).

3.6.2 Statistična analiza razlik v parametrih med podskupinami

S t-testom smo najprej preverili ali se podskupini osteoporoznih in osteoartroznih preiskovancev razlikujeta po starosti, indeksu telesne teže (BMI; angl. body mass index) in MKGls, MKGfn, MKGhip. S χ^2 testom pa skladnost skupin v frekvencah spola. Postavili smo ničelno hipotezo, da se skupini ne razlikujejo glede na opisane značilnosti. Pri vrednostih $p \geq 0,05$ smo ničelno hipotezo potrdili, v primeru vrednosti $p < 0,05$ pa smo ničelno hipotezo zavrnil.

S testom ANCOVA smo skupini primerjali glede na ostale izmerjene prametre z normalno porazdelitvijo. Za parametre, ki se niso normalno porazdeljevali, smo za primerjavo podskupin uporabili Mann – Whitney test.

Preiskovani skupini smo razdelili vsako na nadaljnji dve podskupini glede na serumske vrednosti FGF23. Razlike v frekvencah preiskovancev glede na serumske vrednosti FGF23 v skupini preiskovancev z osteoporozo in skupini preiskovancev z osteoartrozo smo preverili s χ^2 testom oziroma Fisherjevim testom.

V skupini preiskovancev z osteoporozo smo nadaljnji dve podskupini, razdeljeni glede na serumske vrednosti FGF23, med seboj primerjali po izmerjenih parametrih s t-testom za parametre z normalno porazdelitvijo in z Mann – Whitney testom za parametre z nenormalno porazdelitvijo.

Če je bila vrednost $p > 0,05$ smo zaključili, da med primerjanimi podskupinami ni statistično značilne razlike v analizirani spremenljivki, pri vrednostnih $p < 0,05$ pa smo dokazali razliko za določen parameter med primerjanimi podskupinami preiskovancev.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPIS PREISKOVANIH SKUPIN

V raziskavo smo vključili 110 preiskovancev, in sicer 29 moških in 81 žensk, starih od 49 do 88 let. Preiskovanci so bili sprejeti na Oddelek za travmatologijo v Splošni bolnišnici Celje ali Ortopedski bolnišnici Valdoltra za zamenjavo kolčnega sklepa zaradi zloma vratu stegenice (padeč iz stojne višine) ali osteoartroze. Preiskovano skupino (N=110) smo na podlagi kliničnih podatkov razdelili v skupino preiskovancev z osteoporozo (N=59) in skupino preiskovancev z osteoartrozo (N=51). Skupini smo med seboj primerjali s t-testom in χ^2 testom. Želeli smo ugotoviti ali sta primerljivi glede na starost, BMI ter frekvence spoa, saj lahko na ta način lažje ocenjujemo ostale razlike, na primer v MKG, saj smo primerjali skupini z nasprotnim fenotipom kosti. Podatke o starosti, spolu, BMI in MKG, ter rezultate statistične analize (p) prikazuje preglednica XIV.

Preglednica XIV: Opis preiskovanih skupin. (BMI=angl. body mass index, MKG_{tot}=mineralna kostna gostota kolka, MKG_{fn}=mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG_{ls}=mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc, N=število preiskovancev).

	OSTEOPOROZA	OSTEOARTROZA	p
Starost (leta)	75,7 ± 7,2 (N=59)	71,6 ± 6,8 (N=51)	0,003*
Spol (moški/ženske)	12/47 (N=59)	17/34 (N=51)	0,123**
BMI (kg/m²)	25,0±3,2 (N=44)	28,9±4,4 (N=51)	<0,0001*
MKG_{tot} (kg/m²)	0,701 ±0,148 (N=41)	0,904 ±0,153 (N=45)	<0,0001*
MKG_{fn} (kg/m²)	0,599 ±0,106 (N=41)	0,787 ±0,148 (N=45)	<0,0001*
MKG_{ls} (kg/m²)	0,858±0,193 (N=42)	1,012 ±0,198 (N=48)	<0,0001*

*t-test, ** χ^2 test

Preiskovani skupini smo med seboj primerjali po starosti, BMI, MKG_{tot}, MKG_{fn} in MKG_{ls} z t-testom. Frekvence spola v posamezni skupini pa s χ^2 testom. Rezultati primerjav so pokazali, da se skupini statistično značilno razlikujeta po vseh parametrih

razen po frekvencah spola. Tako smo izključili spol kot vpliv za morebitne razlike med preiskovanima skupinama v nadaljnjih analizah. Skupini sta se razlikovali v starosti, BMI in MKG na vseh treh mestih meritev. Rezultati niso presenetljivi, saj so osteoporozni zlomi vratu stegenice značilni za starejšo starostno skupino. Osteoartroza kolčnega sklepa, ko je potrebna zamenjava sklepa, pa se običajno pojavlja prej. Skupina preiskovancev z osteoporozo je imela v povprečju nižji BMI od preiskovancev z osteoartrozo, saj so posamezniki z osteoporozo v povprečju lažji od posameznikov z osteoartrozo in je povišana telesna teža eden izmed dejavnikov tveganja za razvoj osteoartroze. Starost in BMI bomo v nadaljnji statistični analizi upoštevali kot kovariato.

S primerjavo MKG na vseh treh mestih skeleta smo potrdili nasprotna si fenotipa pri osteoporozi in osteoartrozi in tako skupino preiskovancev z osteoartrozo v nadaljnji statistični analizi uporabili kot kontrolno skupino.

4.2 IZRAŽANJE GENOV ZA RANK, RANKL IN OPG V KOSTNEM TKIVU PRI PREISKOVANCIH Z OSTEOPOROZO IN OSTEARTROZO

Rezultati že objavljene študije izražanja genov v humanem kostnem tkivu pri preiskovancih z osteoporozo in preiskovancih z osteoartrozo kažejo, da je izražanje genov za RANK in RANKL višje v osteoporoznem kostnem tkivu, izražanje OPG pa nižje kot v osteoartrozem (75). Z primerjanjem izražanja genov *RANK*, *RANKL* in *OPG* v kostnem tkivu pri preiskovancih z osteoporozo s preiskovanci z osteoartrozo, smo poskušali preveriti, če se naši rezultati ujemajo s predpostavkami in tako potrditi verodostojnost skupine osteoporoznih bolnikov. Osteoartrozno kostno tkivo smo uporabili kot primerjalno tkivo, saj zdravega kostnega tkiva pri ljudeh iste starostne skupine zaradi etičnih razlogov ni mogoče dobiti. Za osteoartrozno tkivo smo se odločili, saj so fenotipske lastnosti kostnega tkiva nasprotne, pri čemer je kostno tkivo pri artrozi trdnjše in bolj podobno zdravemu kostnemu tkivu. Preglednica XV prikazuje srednje vrednosti izražanja genov za RANKL, RANK in OPG v posamezni skupini preiskovancev in rezultate statistične analize.

Preglednica XV: Izražanja genov za RANK, RANKL, OPG v kostnem tkivu pri preiskovanih z osteoporozo in preiskovanih z osteoartrozo. (RANKL=ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, RANK=receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, OPG=osteoprotegerin, N=število preiskovancev).

	OSTEOPOROZA	OSTEOARTROZA	p
RANK	1,131±1,390 (N=42)	0,388±0,243 (N=41)	<0,0001*
RANKL	0,563±0,557 (N=43)	0,313±0,310 (N=40)	0,01*
OPG	1,480±1,434 (N=44)	3,549±3,440 (N=50)	0,034*

*ANCOVA

Rezultati statistične analize kažejo značilno razliko v izražanju genov za RANK, RANKL in OPG v kostnem tkivu med primerjanima skupinama preiskovancev in se tako ujemajo s pričakovano predpostavko o izražanju genov v kostnem tkivu pri preiskovanih z osteoporozo in preiskovanih z osteoartrozo (75), kar pomeni, da je nabor bolnikov za namen naše raziskave ustrezen in omogoča oblikovanje relevantnih zaključkov.

4.3 MERITVE BIOKEMIJSKIH KAZALCEV

Preiskovancem smo v plazmi izmerili koncentracijo FGF23, v serumu pa koncentracijo fosfatov, Ca ionov, 25(OH)D in iPTH kot kazalcev homeostaze Ca ionov, OPG kot lokalni regulator kostne premene, kreatinin za izračun GFR ter protein Klotho za oceno nujnosti pisotnosti le tega pri delovanju FGF23.

4.3.1 Kalcotropni hormoni in OPG pri preiskovanih z osteoporozo in preiskovanih z osteoartrozo

V nadaljnji statistični analizi smo poskušali oceniti ujemanje koncentracije kalcotropnih hormonov pri preiskovanih z osteoporozo in preiskovanih z osteoartrozo (kontrolna skupina). Med preiskovanimi skupinama smo primerjali koncentracijo kalcotropnih hormonov (25(OH)D, iPTH), koncentracijo Ca ionov ter fosfatov v krvi ter koncentracijo OPG. Rezultate analize (p) in srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) izmerjenih parametrov za posamezno skupino prikazuje preglednica XVI. Z ANCOVA testom smo primerjali spremenljivke z normalno porazdelitvijo (Pi, Ca ioni, 25(OH)D, sOPG

(serumski osteoprotegerin)) in z Mann-Whitney testom spremenljivke z nenormalno porazdelitvijo (iPTH). Vrednosti p manjše od 0,05 za posamezno testirano spremenljivko, smo opredelili kot statistično značilne razlike med preiskovanima skupinama.

Preglednica XVI: Koncentracije fosfatov, Ca ionov, 25(OH)D, iPTH in sOPG pri preiskovancih z osteoporozo in preiskovancih z osteoartrozo. (Ca ioni = kalcijevi ioni, iPTH=intaktni parathormon, sOPG=serumski osteoprotegerin, N=število preiskovancev).

	OSTEOPOROZA	OSTEOARTROZA	p
Fosfati (mmol/L)	0,97±0,177 (N=21)	1,05±0,257 (N=18)	0,390*
Ca ioni (mmol/L)	2,04±0,17 (N=21)	2,04±0,07 (N=18)	0,789*
25(OH)D (nmol/L)	32,81±20,92 (N=21)	29,94±16,34 (N=18)	0,816*
iPTH (ng/L)	74,63±102,30 (N=32)	73,67±41,97 (N=18)	0,221**
sOPG (pmol/L)	9,89±5,85 (N=17)	8,25±1,99 (N=10)	0,868*

*ANCOVA, ** Mann-Whitney test

Statistična analiza ni pokazala značilnih razlik med preiskovanima skupinama v izmerjenih parametrih ($p > 0,05$), kar praktično pomeni, da primerjanih parametrov ni potrebno vključiti v nadaljnje statistične analize kot kovariato pri ocenjevanju vpliva FGF23.

4.3.2 Primerjava FGF23 in proteina Klotho pri preiskovancih z osteoporozo in osteoartrozo

V nadaljevanju naše raziskave smo poskušali ugotoviti povezanost koncentracij FGF23 in proteina Klotho. Zato smo na tem mestu poskušali ugotoviti ali se preiskovanci z osteoporozo in preiskovanci z osteoartrozo razlikujejo v koncentraciji proteina Klotho in koncentraciji FGF23. Pri tem skupino preiskovancev z osteoartrozo uporabljamo kot kontrolno skupino. Preglednica XVII prikazuje srednje vrednosti koncentracije proteina

Klotho pri preiskovancih z osteoporozo in preiskovancih z osteoartrozo ter rezultat statistične analize (p).

Preglednica XVII: Koncentracije proteina Klotho pri preiskovancih z osteoporozo in preiskovancih z osteoartrozo.

	OSTEOPOROZA	OSTEOARTROZA	p
α-Klotho (pg/mL)	834,97±270,43	808,88±239,79	0,938*
	(N=15)	(N=16)	

*ANCOVA

Rezultat analize ujemanja primerjanih skupin v koncentracijah protein Klotho je statistično neznačilna razlika, kar zagotavlja verodostojnost rezultatov v nadaljnjih analizah na preiskovancih z osteoporozo.

Plazemske vrednosti FGF23 smo preiskovancem izmerili z encimskoimunskim testom. Pri 79,6% preiskovancev so plazemske vrednosti FGF23 bile nemerljiva (glej tabelo v prilogi). Zato smo se odločili, da posamezno skupino preiskovancev (osteoporozo, osteoartroza) delimo glede na vrednosti FGF23 v podskupino preiskovancev z vrednostmi FGF23>0 in podskupino preiskovancev z vrednostmi FGF23=0. Primerjali smo frekvence preiskovancev po vrednostih FGF23 v posamezni podskupini med seboj. Analizo smo izvedli s Fisherjevim testom. Preglednica XVIII prikazuje frekvence preiskovancev v posamezni skupini in rezultat statistične analize (p).

Preglednica XVIII: Frekvence preiskovancev z osteoporozo in preiskovancev z osteoartrozo glede na plazemske vrednosti FGF23. (FGF23= angl. fibroblast growth factor 23).

	FGF23>0	FGF23=0	p
OSTOARTROZA	3	16	
OSTOPOROZA	7	10	0,720*

*Fisherjev test

Rezultati statistične analize kažejo, da se preiskovani podskupini ne razlikujeta v frekvencah preiskovancev s FGF23>0 oziroma FGF23=0. Statistično neznačilna razlika v frekvencah preiskovancev s FGF23>0 med podskupinama s statistično značilnimi razlikami v MKG (poglavje 4.1) nakazuje, da FGF23 ne vpliva na MKG in verjetno nima pomembne vloge pri razvoju osteoporoze.

4.3.3 Ocena vpliva ledvične funkcije na MKG pri preiskovancih z osteoporozo

Iz vrednosti kreatinina in podatkov o starosti in spolu smo po enačbi MDRD izračunali glomerulno filtracijo (GFR) in ocenili funkcijo ledvic. Večina preiskovancev (84,8 %) je imela GFR>60 mL/min/1,73m³ in torej normalno ledvično funkcijo. S Fisherjevim testom smo želeli preveriti vpliv funkcije ledvic pri preiskovancih z osteoporozo na MKG, saj je pri okvari ledvic ena izmed posledic tudi znižanje MKG. Na ta način smo želeli izključiti funkcijo ledvic kot vzrok za nizek MKG, saj smo v nadaljnji statistični analizi ugotavljali vplive FGF23 na razvoj pomenopavzne osteoporoze. Preiskovano podskupino osteoporoznih preiskovancev smo delili glede na GFR (GFR>60 mL/min/1,73m³ in GFR<60 mL/min/1,73m³) ter glede na MKG (MKG>-2,5 SD in MKG<-2,5 SD).

Frekvence preiskovancev in rezultat statistične analize (p) prikazuje preglednica XIX.

Preglednica XIX: Frekvence preiskovancev v posamezni podskupini glede na GFR in MKG.
(GFR=glomerulna filtracija, MKG=mineralna kostna gostota, SD=standardna deviacija).

	GFR>60 mL/min/1,73m ³	GFR<60 mL/min/1,73m ³	p
MKG>-2,5 SD	6	1	
MKG<-2,5 SD	9	3	1,000*

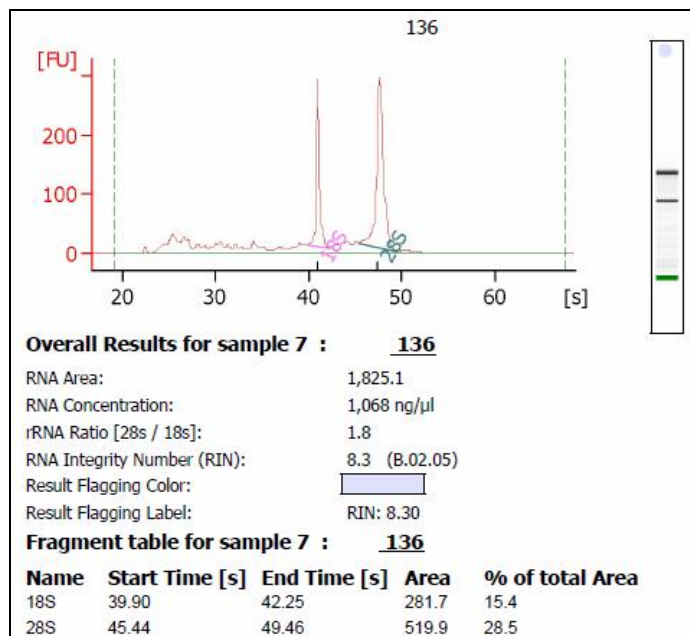
*Fisherjev test

Statistična analiza je pokazala statistično neznačilno razliko (p=1,000). Zaključili smo, da GFR v preiskovani podskupini preiskovancev z osteoporozo ni vzrok za nizek MKG.

4.4 ANALIZE KOSTNEGA TKIVA

4.4.1 Vrednotenje celokupne RNA

Z merjenjem absorbance pri 260 nm smo določili koncentracijo izolirane celokupne RNA ($594,18 \pm 415,9$ ng/ μ L). Z merjenjem absorbance pri 280nm in 230 nm in izračunom razmerij A260/A280 in A260/A230 smo ocenili, da je čistost izolirane celokupne RNA zadovoljiva za nadaljnjo analizo. Celovitost izolirane RNA smo ocenili z kapilarno elektroforezo na aparatu Agilent Bioanalyzer 2100. Rezultat analize je elektroferogram, gelska slika in vrednost RIN (angl. RNA integrity number) (slika 6). RIN dobimo z oceno celotne elektroforezne poti vzorca celokupne RNA, vključno s prisotnostjo in odsotnostjo produktov razgradnje in ribosomalnimi vrhovi. Vrednost RIN=1 pomeni popolnoma razgrajen vzorec celokupne RNA in vrednost RIN=10 popolno nerazgrajen vzorec celokupne RNA.

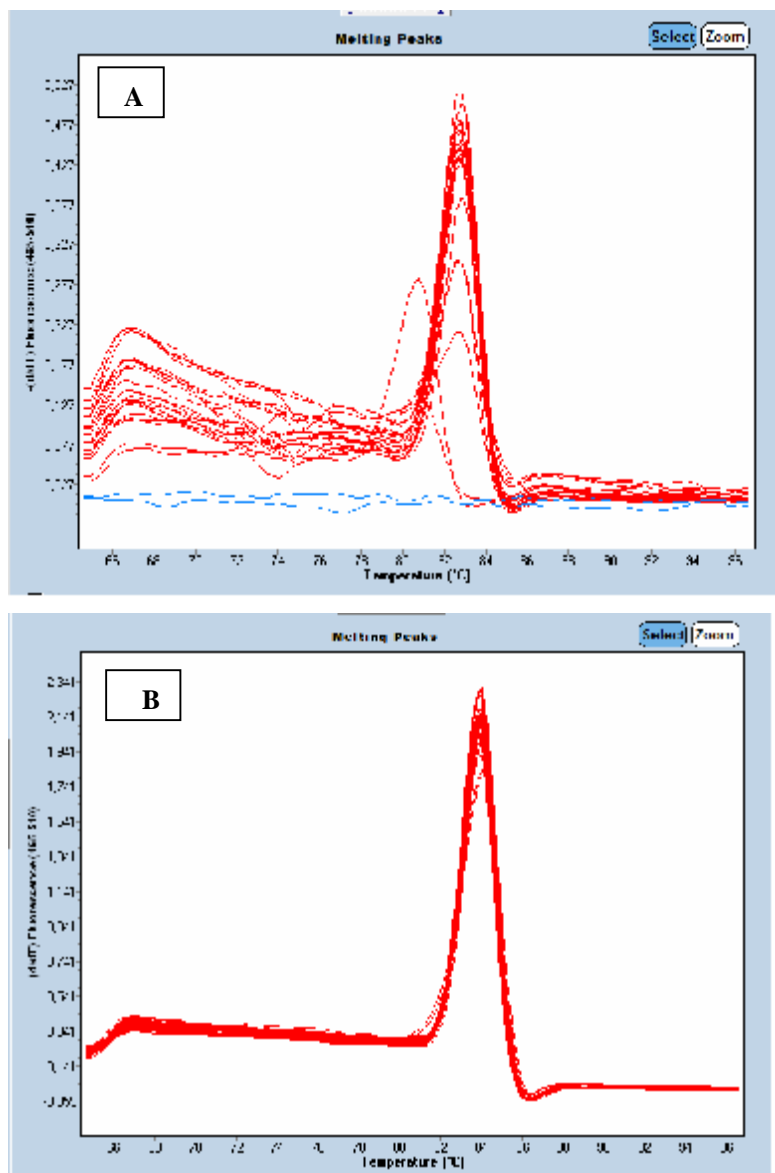


Slika 6: Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (Agilent 2100 Bioanalyzer) celokupne RNA izolirane iz proksimalnega dela stegenice.

V reakcijo obratnega prepisovanja smo vključili vzorce, ki smo jim določili vrednost RIN ≥ 4 . Iz vrednosti koncentracij pa smo določili volumen izolirane RNA za reakcijo obratnega prepisovanja.

4.4.2 Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov

Za analizo izražanja genov *RANKL*, *RANK*, *OPG*, *PTH1R*, *FGF23* IN *RPLP0* smo optimizirali koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov in temperaturo prileganja oligonukleotidnih začetnikov. Opazovali smo talilno krivuljo, pri kateri je pomembno, da prikazuje nastajanje le enega produkta. V primeru ustrezne talilne krivulje smo vrednotili še prileganje umeritvene krivulje.



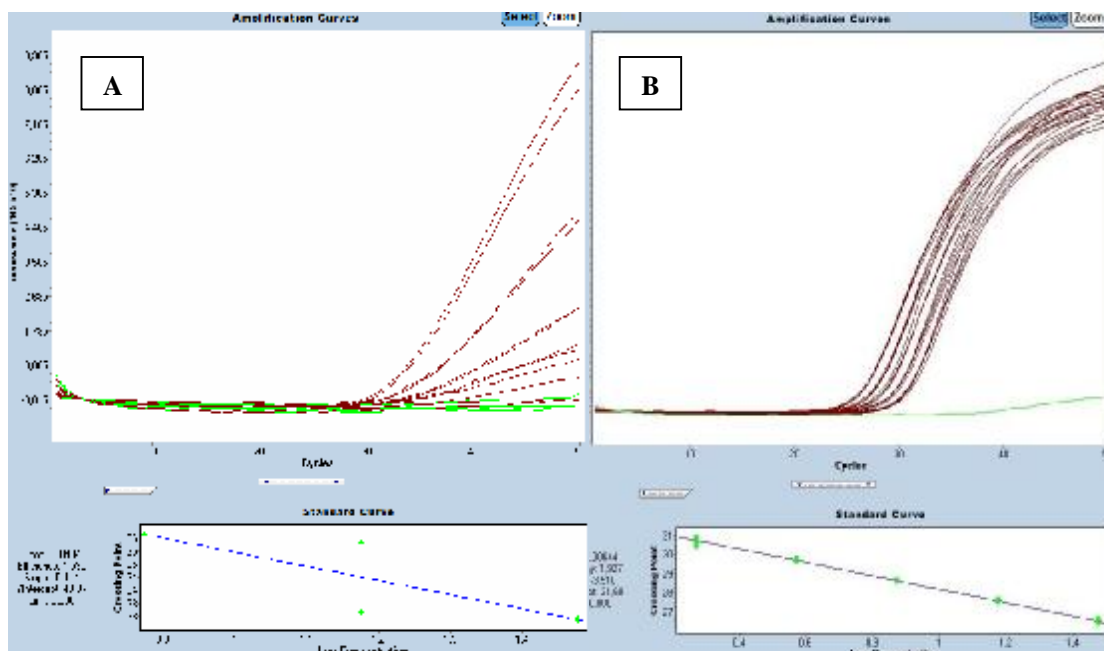
Slika 7: Talilna krivulja. A-talilna krivulja neuspešne optimizacije oligonukleotidnih začetnikov, B-talilna krivulja uspešne optimizacije oligonukleotidnih začetnikov.

Slika 7A prikazuje talilno krivuljo neuspešne optimizacije oligonukleotidnih začetnikov. V reakciji PCR nastaja ob želenem produktu še neželeni produkt. Slika 7B prikazuje talilno krivuljo uspešne optimizacije oligonukleotidnih začetnikov, kjer nastaja samo en, želeni produkt.

Uspešno smo optimirali koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov in temperaturo prileganja oligonukleotidnih začetnikov za gene *RANKL*, *RANK*, *PTH1R* in *RPLP0*. Za merjenje izražanja gena za *FGF23* in *OPG* nismo uspeli optimirati koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in temperature prileganja, s katerimi bi dosegli ustrezne rezultate. Odločili smo se, da za merjenje izražanja *FGF23* in *OPG* uporabimo sonde TaqMan.

4.4.3 Analiza izražanja genov

Izražanje genov smo merili z reakcijo PCR v realnem času. Za merjenje izražanja genov za *RANKL*, *RANK*, *PTH1R* in hišni gen *RPLP0* smo uporabili oligonukleotidne začetnike (merjenje hišnega gena *RPLP0* za namen merjenja izražanja *OPG* pa s sondami), katerih zaporedje je prikazano v preglednici V, in interkelirajoče barvilo. Za merjenje izražanja genov *VDR*, *OPG*, *FGF23* in hišni gen *GAPDH* smo uporabili oligonukleotidne začetnike, označene z fluorescentnim barvilom (sonde). Primer uspešne reakcije PCR v realnem času ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila prikazuje slika 7B v poglavju 4.3.2. Primer uspešne reakcije PCR v realnem času ob uporabi sond prikazuje slika 8B. Slika 8A prikazuje neuspešno reakcijo PCR ob uporabi sond (*FGF23*). Z reakcijo PCR v realnem času smo uspešno izmerili izražanje genov za *RANKL*, *RANK*, *OPG*, *PTH1R*, *VDR* in hišna gena *GAPDH* ter *RPLP0*. Izmerjene koncentracije (*RANKL*, *RANK*, *OPG*, *VDR*, *PTH1R*) smo uravnali z geometrično sredino izmerjenih koncentracij hišnih genov (*GAPDH* in *RPLP0*) in tako uravnali vpliv napak pipetiranja. Izražanje gena za *FGF23* nismo uspeli izmeriti niti z sondami TaqMan (slika 8A), zato njegove vloge v kosteh nismo mogli vrednotiti. V statistično analizo smo vključili plazemske vrednosti *FGF23*, ki so klinično tudi bolj relevantne.



Slika 8: Rezultat reakcije PCR v realnem času. A- Primer neuspešne reakcije PCR v realnem času z uporabo sond TaqMan. B-primer uspešne reakcije PCR v realnem času z uporabo sond TaqMan. Prikazane so krivulje standardov 30, 15, 7.5, 3.75 in 1.875 ng cDNA.

4.5 KLINIČNI POMEN DOBLJENIH REZULTATOV

Pojavile so se raziskave, ki kažejo na pomembno vlogo FGF23 pri razvoju renalne osteodistrofije. Podatkov o vlogi tega fosfaturičnega hormona pri osteoporozi pa praktično ni. Edina študija, ki kaže na možno povezanost FGF23 z razvojem senilne osteoporoze, je bila izvedena na živalskem modelu (68). Namen našega dela je bil zato ovrednotiti vlogo FGF23 pri osteoporozi pri ljudeh. Zato smo najprej želeli oceniti vpliv proteina Klotho na delovanje FGF23, nato oceniti povezanost FGF23 s sistemskimi in lokalnimi regulatorji kostne premene, na koncu pa oceniti vpliv FGF23 na MKG, ki je diagnostični kazalec osteoporoze.

4.5.1 Vpliv proteina Klotho na delovanje FGF23

Protein Klotho je nujno potreben kofaktor za delovanje FGF23. V študijah na mišjih modelih z delecijami ali inaktivacijskimi mutacijami v genu za protein Klotho so dokazali nujnost prisotnosti proteina Klotho za učinke FGF23 (38-41). V naši raziskavi smo želeli

ugotoviti povezanost plazemskih koncentracij FGF23 s serumskimi koncentracijami proteina Klotho pri preiskovancih z osteoporozo. Na ta način smo želeli ugotoviti sodelovanje FGF23 in proteina Klotho v doseganju učinkov FGF23 pri ljudeh.

Preiskovance z osteoporozo smo razdelili glede na vrednosti FGF23 v podskupino preiskovancev z vrednostmi FGF23>0 in vrednostmi FGF23=0. Podskupini smo med seboj primerjali s t-testom v koncentracijah proteina Klotho. Preglednica XX prikazuje srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) koncentracije proteina Klotho pri preiskovancih z osteoporozo v posamezni preiskovani podskupini in rezultat statistične analize (p).

Preglednica XX: Koncentracije proteina Klotho pri preiskovancih z osteoporozo razdeljenih v skupino s plazemskimi vrednostmi FGF23>0 in FGF23=0. (FGF23 = angl. fibroblast growth factor 23, N=število preiskovancev).

	FGF23>0	FGF23=0	p
α-Klotho (pg/mL)	1015,89 \pm 304,37	777,84 \pm 239,62	0,058*
	(N=6)	(N=19)	

*t-test

Rezultat statistične analize kaže, da med plazemskimi vrednostmi FGF23 in serumskimi vrednostmi proteina Klotho obstaja mejno značilna povezava. Vrednosti proteina Klotho so zvišane skupaj z zvišanim FGF23 in znižane skupaj z nizkim FGF23, kar lahko nakazuje na povezanost FGF23 in Klotho pri ljudeh. Vendar bi morali rezultate potrditi na večjem številu preiskovancev z vrednostmi FGF23>0.

4.5.2 Vpliv FGF23 na uravnavanje Ca ionov

Vlogo FGF23 pri uravnavanju Ca ionov smo najprej proučili na nivoju izražanja genov v kostnem tkivu, nato smo ugotavljali povezanost FGF23 s kalcotropnimi hormoni in tako ocenjevali vpliv FGF23 na sistemske dejavnike regulacije kostne premene.

Povezanost FGF23 z izražanjem VDR in PTH1R v humanem kostnem tkivu

Študije kažejo, da je VDR eden izmed regulatorjev izražanja FGF23. Kot transkripcijski faktor se veže v promotorski regiji gena za FGF23 in neposredno povečuje izražanje FGF23 v osteocitih (47, 48, 49). *In vitro* in *in vivo* študije kažejo, da naj bi PTH1R prav tako neposredno uravnaval izražanje FGF23 v kosteh (74). Ker podatkov o vplivu VDR in PTH1R na koncentracije FGF23 praktično ni, smo v naši raziskavi želeli ugotoviti povezanost plazemskih vrednosti FGF23 z izražanjem VDR in PTH1R v humanem kostnem tkivu pri bolnikih z osteoporozo.

Izražanje gena za VDR in PTH1R v kostnem tkivu smo izmerili z reakcijo PCR v realnem času. Preiskovance z osteoporozo smo razdelili glede na plazemske vrednosti FGF23 v podskupino preiskovancev s FGF23>0 in podskupino preiskovancev s FGF23=0. S statistično analizo smo poskušali ugotoviti povezanost med izražanjem VDR ali PTH1R in plazemskimi koncentracijam FGF23. Srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD) izražanja VDR in PTH1R za posamezno preiskovano podskupino in rezultate statistične analize (p) prikazuje preglednica XXI.

Preglednica XXI: Izražanje VDR in PTH1R v kostnem tkivu preiskovancev z osteoporozo. (VDR=vitamin D receptor, PTH1R= receptor za parathormon 1, FGF23=ang. Fibroblast growth factor 23).

	FGF23>0	FGF23=0	p
VDR	1,147 \pm 0,545 (N=7)	1,094 \pm 0,552 (N=23)	0,750**
PTH1R	0,835 \pm 1,056 (N=7)	0,745 \pm 1,056 (N=22)	0,870*

*t-test, **Mann-Whitney test

Rezultati naše analize kažejo, da imajo preiskovanci s FGF23>0 sicer višjo povprečno vrednost izražanja VDR in PTH1R, vendar pa je razlika v primerjavi s podskupino s FGF23=0 statistično neznačilna. Zaključujemo, da med plazemskimi koncentracijami FGF23 in izražanjem VDR (p=0,750) ali PTH1R (p=0,870) v humanem kostnem tkivu pri preiskovancih z osteoporozo ni povezave, kar pomeni, da VDR oziroma PTH1R verjetno nima pomembnejšega vpliva na aktivnost FGF23 pri ljudeh. Naši rezultati so v nasprotju z

že objavljenimi rezultati študij na živalskih modelih (48, 49, 74). To pripisujemo majhnemu številu preiskovancev, saj smo FGF23>0 izmerili le pri 7 preiskovancih. Vpliv VDR in PTH1R na plazemske koncentracije FGF23 bi bilo potrebno raziskati v nadaljnjih študijah na ljudeh in morebiti uporabiti bolj občutljive teste za merjenje plazemskih vrednosti FGF23. Predlagamo tudi merjenje koncentracije celokupne koncentracije FGF23, ki bi morebiti razkrila povezanost izražanja VDR ter PTH1R s plazemskimi vrednostmi FGF23.

Povezanost FGF23 s kalciotropnimi hormoni

V skupini preiskovancev z osteoporozo, ki smo jo delili v podskupino s plazemskimi koncentracijami FGF23>0 in podskupino s plazemskimi koncentracijami FGF23=0 smo omenjene podskupine primerjali med seboj in ugotavljali ali obstajajo med njima statistično značilne razlike v koncentracijah Ca ionov, fosfatov, 25(OH)D in iPTH. Ugotavljali smo povezanost FGF23 s serumskimi vrednostmi fosfatov, Ca ionov in glavnima regulatorjema homeostaze Ca ionov in tako imenovanima sistemskima regulatorjema kostne premene. Želeli smo oceniti vlogo FGF23 pri uravnavanju Ca ionov. Spremenljivke z normalno porazdelitvijo smo med podskupinama primerjali s t-testom, spremenljivke z nenormalno porazdelitvijo pa z Mann-Whitney testom. Srednje vrednosti (povprečna vrednost ± SD) parametrov za posamezno podskupino in rezultati statistične analize (p) so prikazani v preglednici XXII.

Preglednica XII: Koncentracija fosfatov, Ca ionov, 25(OH)D in iPTH pri preiskovancih z osteoporozo. (Pi = fosfati, Ca = kalcijevi ioni, iPTH = intaktni PTH, sOPG = serumski osteoprotegerin, FGF23 = angl. fibroblast growth factor 23, N=število preiskovancev).

	FGF23>0	FGF23=0	p
fosfati (mmol/L)	0,94±0,25 (N=7)	0,97±0,17 (N=23)	0,595*
Ca ionov (mmol/L)	2,01±0,29 (N=7)	2,02±0,25 (N=23)	0,301*
25(OH)D (nmol/L)	27,43±12,83 (N=7)	31,25±24,49 (N=7)	0,831*
iPTH (ng/L)	171,5±198,2 (N=23)	49,3±12,62 (N=7)	0,001**

*t-test, ** Mann-Whitney test

Analiza je pokazala statistično značilno razliko v serumskih vrednostih iPTH ($p=0,001$) med skupino preiskovancev z osteoporozo, ki imajo plazemske vrednosti $FGF23>0$ in skupino preiskovancev z osteoporozo, ki imajo plazemske vrednosti $FGF23=0$. Preiskovanci z osteoporozo in plazemskimi vrednostmi $FGF23>0$ imajo značilno višje vrednosti iPTH. Študije na živalskih modelih kažejo, da naj bi povišane vrednosti FGF23 zavirale izražanje in sekrecijo PTH iz obščitnice (43, 44), kar je v nasprotju z rezultati naše analize. V našem primeru povišane vrednosti iPTH ob normalni koncentraciji Ca ionov in fosfatov ter povišanih vrednostih FGF23 kažejo na sekundarni hiperparatiroidizem, ko obščitnica razvije rezistenco na FGF23.

Statistično značilnih razlik v serumskih koncentracijah fosfatov, Ca ionih, 25(OH)D in sOPG nismo dokazali. Neznačilne razlike v serumskih koncentracijah fosfatov, Ca ionov in 25(OH)D pripisujemo sposobnosti telesa, da natančno uravnava koncentracijo fosfatov in Ca ionov. Rezultati kažejo, da FGF23 korelira z iPTH, kar pomeni, da je FGF23 pomemben člen v uravnavanju homeostaze Ca ionov v telesu.

4.5.3 Povezanost FGF23 s signalno potjo RANK/RANKL/OPG

Sistem lokalnih dejavnikov RANKL/RANK/OPG je najpomembnejši sistem za uravnavanje osteoklastogeneze in aktivnosti osteoklastov. Posredno ima osrednjo vlogo v procesu kostne premene. Prav zaradi njegove vloge je predmet številnih raziskav na področju kostne biologije. Nedavno nazaj je bilo tudi registrirano prvo biološko zdravilo za zdravljenje osteoporoze, ki je monoklonsko protiteleso proti RANKL, Denosumab.

Zaradi pomembnosti tega sistema pri razvoju osteoporoze smo nazadnje želeli oceniti povezanost FGF23 s signalno potjo RANK/RANKL/OPG, saj pri pregledu literature nismo odkrili študije, ki bi ugotavljala omenjeno povezavo.

Preiskovance z osteoporozo smo glede na plazemske vrednosti FGF23 razdelili v podskupino preiskovancev z vrednostmi $FGF23>0$ in podskupino preiskovancev z vrednostmi $FGF23=0$. Podskupini smo med seboj primerjali s t-testom v vrednostih izražanja *RANKL*, *RANK* in *OPG* in serumskih koncentracijah OPG. Tako smo poskušali ovrednotiti ali obstaja povezava med FGF23 in lokalnimi dejavniki regulacije kostne premene. Preglednica XXIII prikazuje srednje vrednosti (povprečna vrednost \pm SD)

izražanja genov za RANK, RANKL, OPG v humanem kostnem tkivu, koncentracije OPG ter rezultate statistične analize (p).

Preglednica XXIII: Izražanje genov za RANK, RANKL, OPG v humanem kostnem tkivu in serumske koncentracije OPG. (RANKL =ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, RANK=receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, OPG = osteoprotegerin , FGF23 = angl. fibroblast growth factor 23, N=število preiskovancev).

	FGF23>0	FGF23=0	p
RANK	1,310±0,980 (N=7)	1,063±0,949 (N=23)	0,437*
RANKL	0,604±0,401 (N=7)	0,618±0,636 (N=23)	0,581*
OPG	1,336±1,180 (N=7)	1,342±1,296 (N=23)	0,795*
sOPG (pmol/L)	12,71±9,57 (N=7)	8,50±3,7 (N=19)	0,339*

*t-test

Rezultati statistične analize kažejo, da med plazemskimi vrednostmi FGF23 in izražanjem RANK ($p = 0,437$), RANKL ($p = 0,581$), OPG ($p = 0,795$) v humanem kostnem tkivu ter serumskimi koncentracijami OPG ($p=0,339$) ni povezave, kar pomeni, da FGF23 verjetno ni pomemben dejavnik v kostni premeni. Dokazana nepomembna vloga FGF23 v kostni premeni in signalni poti RANK/RANKL/OPG pa kaže, da FGF23 verjetno ne vpliva na MKG oziroma osteoporozni zlom in ni povezan z razvojem osteoporoze pri ljudeh. Vendar bi naše rezultate morali potrditi na večjem številu preiskovancev s plazemskimi vrednostmi FGF23>0 in uporabiti bolj občutljive metode za merjenje FGF23.

4.5.4 Povezanost FGF23 z zlomi oziroma mineralno kostno gostoto

Vlogo FGF23 pri razvoju osteoporoze smo ocenjevali na podlagi ugotavljanja povezanosti plazemskih vrednosti FGF23 z MKG, kot glavnim kliničnim kazalcem osteoporoze in na ta način poskušali ovrednotiti vlogo FGF23 pri osteoporozi pri ljudeh. Povezanost FGF23 z

MKG v skupini preiskovancev z osteoporozo smo vrednotili na podlagi plazemskih vrednosti FGF23. Preiskovance smo razdelili v podskupino preiskovancev s plazemskimi vrednostmi FGF23>0 in podskupino preiskovancev s plazemskimi vrednostmi FGF23=0. Ugotavljali smo razlike med podskupinama preiskovancev s FGF23>0 in FGF23=0 v vrednostih MKG na vseh treh mestih meritev. Za ugotavljanje razlik smo uporabili t-test. p vrednosti večje od 0,05 smo vrednotili kot statistično neznačilne, p vrednosti manjše od 0,05 pa kot statistično značilne. Srednje vrednosti in standardne deviacije MKG za posamezno mesto meritve in rezultate statistične analize (p) prikazuje preglednica XXIV.

Preglednica XXIV: Vrednosti MKG na vseh treh mestih meritev pri preiskovancih z osteoporozo. (MKG_{tot}=mineralna kostna gostota kolka, MKG_{fn}=mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG_{ls}=mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc, FGF23=angl. fibroblast growth factor 23, N=število preiskovancev)

	FGF23>0	FGF23=0	p
MKG_{tot} (kg/m²)	0,673±0,146 (N=4)	0,667±0,146 (N=14)	0,949*
MKG_{fn} (kg/m²)	0,554±0,166 (N=4)	0,587±0,108 (N=14)	0,643*
MKG_{ls} (kg/m²)	0,819±0,152 (N=4)	0,879±0,226 (N=14)	0,630*

*t-test

Statistično značilne razlike v vrednostih MKG_{tot}, MKG_{fn} in MKG_{ls} med preiskovanima podskupinama nismo ugotovili. Rezultate smo preverili še z nadaljnjim statističnim testom. Preiskovance z osteoporozo smo razdelili v podskupine glede na MKG in sicer v podskupino preiskovancev z MKG>-2,5SD in podskupino preiskovancev z MKG<-2,5SD. Frekvence preiskovancev v omenjenih podskupinah smo analizirali s Fisherjevim testom. Frekvence preiskovancev v primerjanih podskupinah in rezultat analize (p) prikazuje preglednica XXV.

Preglednica XXV: Frekvence preiskovancev z osteoporozo v primerjanih podskupinah.

MKG=mineralna kostna gostota, FGF23 = angl. fibroblast growth factor 23.

	FGF23>0	FGF23=0	p
MKG>-2,5SD	5	2	1,000*
MKG<-2,5SD	9	2	

*Fisherjev test

Rezultat analize s Fisherjevim testom kaže ($p=1,000$), da med plazemsko koncentracijo FGF23 in MKG ni povezave. Rezultati obeh analiz se ujemajo in pridružujejo rezultatom iz poglavja 4.3.2. Zaključujemo, da FGF23 ni povezan z zlomi oziroma MKG pri preiskovancih z osteoporozo, kar pomeni, da FGF23 verjetno nima pomembnejše vloge pri uravnavanju MKG in razvoju osteoporoze.

5 SKLEP

Našo raziskavo zaključujemo z naslednjimi sklepi:

- FGF23 ni povezan s serumskimi koncentracijami protina Klotho, vendar pa zaradi mejno statistične značilnosti ($p=0,058$) in majhnega števila preiskovancev z vrednostmi $FGF23>0$ povezave ne izključujemo.
- Plazemske vrednosti FGF23 niso povezane z izražanjem VDR ali PTH1R v kostnem tkivu pri preiskovancih z osteoporozo, kar pomeni, da izražanje VDR in PTH1R v humanem kostnem tkivu verjetno ne vpliva na aktivnost FGF23.
- Plazemske vrednosti FGF23 so povezane s serumskimi vrednostmi iPTH, kar kaže na sodelovanje FGF23 pri uravnavanju homeostaze Ca ionov.
- Plazemske vrednosti FGF23 niso povezane s signalno potjo RANK/RANKL/OPG, kar nakazuje na majhno pomembnost FGF23 v kostni remodelaciji pri bolnikih z osteoporozo.
- Plazemske vrednosti FGF23 niso povezane z zlomi oziroma MKG pri preiskovancih z osteoporozo, kar pomeni, da FGF23 nima pomembnejše vloge pri uravnavanju MKG in razvoju osteoporoze.

Zaključujemo, da FGF23 ni povezan z razvojem osteoporoze in ga izključujemo kot morebitni diagnostični oziroma prognostični kazalec osteoporoznih zlomov.

6 LITERATURA

1. A. Kocijančič: Presnovne bolezni kosti. V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005: 898-900, 916-924.
2. R. Baron: Anatomy and ultrastructure of bone-histogenesis, growth and remodeling. Chapter 1; 2008. Dosegljivo na: <http://www.endotext.com>.
3. P. G. Robey, A. L. Boskey: Extracellular matrix in biomineralization of bone. V: M. J. Favus (ed.) Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism, 6th ed. American society for bone and mineral research, Washington, DC, USA, 2006:12-9.
4. J. Caetano-Lopes, H. Canhao, J. E. Fonseca: Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatol Port 2007 Apr-Jun; 32(2): 103-10.
5. M. M. Jr. Cohen: The New Bone Biology: Pathologic, Molecular and Clinical Correlates. American Journal of Medical Genetics Part A 140A 2006: 2646-2706.
6. L. Bonewald: Osteocytes as multifunctional cells. J Musculoskelet Neuronal Interact 2006; 6(4):331-333.
7. F. P. Ross: Osteoclast biology and bone resorption. In: Favus MJ (ed.) Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 6th ed. American society of bone and mineral research, Washington, DC, USA, 2006: 20-9.
8. W. J. Boyle, W. S. Simonet, D. L. Lacey: Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003; 423: 337-342.
9. S. Mencej Bedrač, J. Marc: Sistem RANKL/RANK/OPG – nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze. Farmacevtski vestnik 2008; 59: 175-178
10. L. C. Hofbauer, S. Khosla, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, W. J. Boyle, B. L. Riggs: The Roles of osteoprotegerin and OPG Ligand in the paracrine Regulation of Bone Resorbtion. JBMR 2000; 15: 2-12
11. D. Stejskal, J. Bartek, R. Pastorkova, V. Ružička, I. Oral, D. Horalik: Osteoprotegerin, RANK, RANKL. Biomed Papers 2001; 145(2): 61-64
12. S. Theoleyre, Y. Wittrant, S. K. Tat, Y. Fortun, F. Redini, D. Heymann: The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of patophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev 2004; 15:457-75.

13. T. Wada, T. Nakashima, N. Hiroshi, J. M. Penninger: RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006 Jan;12(1):17-25. Epub 2005 Dec 13. Review.
14. L. C. Hofbauer, A. E. Heufelder: The role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(7): 2355-63.
15. J. G. Kim, J. H. Kim, D. O. Lee, H. Kim, J. Y. Kim, C. S. Suh, S. H. Kim, Y. M. Choi: Changes in serum levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator for nuclear factor κ B ligand after estrogen-progestogen therapy and their relationships with changes in bone mass in postmenopausal women. *Menopause.* 2008 Mar-Apr;15(2): 357-62.
16. M. E. Kraezlin: Biochemical Markers of bone Turnover and Osteoporosis managment. *IBMS BoneKey* 2007; 4: 191-203, 204-205. Dostopno na: <http://www.bonekey-ibms.org/cgi/content/full/ibmske;4/7/191>
17. S. Cremers, P. Gornero: Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease; potential uses and pitfalls. *Drugs* 2006; 66(16): 2031-58.
18. R. Ciritelli, R. Armamento-Villareal, N. Napoli: Bone turnover markers: understanding their value in clinical trails and practice. *Osteoporos Int* 2009. Epub ahead of print.
19. P. M. Comacho, N. A. Lopez: Use of biochemical markers of bone turnover in the managment of postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(10):1345-57.
20. M. J. Siebel: Biochemical Markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Lab Med* 2007; 45(8):1014-1018.
21. K. K. Ivaska, T.A. Hentunen, J. Vääräniemi, H. Ylipahkala, K. Petterson, H. K. Väänänen: Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30; 279(18): 18361-9. Epub 2004 Feb 16.
22. P. Garnero: Advances in bone turnover assessment with biochemical markers. *Medicographia* 2008; 30(4):339-49
23. J. B. Hemry: *Clinical diagnosis and managment by laboratory methods*, 20th ed., Saunder, USA, 2001:195-198.

24. S. Jabbar, J. Drury, J. N. Fordham, H. K. Datta, R. M. Francis, S. P. Tuck: Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Pathol*. 2001 Apr;64(4):354-7. Epub 2011 Feb 9.
25. L.D. Quarles: Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest* 2008; 118(12): 3820-3828.
26. A. M. Davison, J. S. Cameron, J. P. Gruenfeld: Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford University Press, 2005. New York ZDA third ed.
27. M. J. Econs, M. K. Drezner: Tumor-induced-osteomalacia-unveiling a new hormone. *New Engl J Med* 1994; 330: 1679-81.
28. T. Yamashita, M. Yoshioka, N. Itoh: Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventroalterl thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 494-498.
29. Biomedica Gruppe: <http://www.bmgrp.com/>
30. S. Khoshiniat, A. Bourguine, M. Julien, P. Weiss, J. Guicheux, L. Beck: The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 205-218.
31. X. Y. Bai, D. Miao, D. Goltzman, A. C. Karaplis: The autosomal dominant hypophosphatemic ricket R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and changes in vivo biological potency. *J Biol Chem* 2003. 278:9843-9849.
32. S. Liu, L.D. Quarles: How Fibroblast Growth Factor 23 Works. *J AM Soc Nephrol* 2007; 18: 1637-1647.
33. R. Marsell, K.B. Jonsson: The phosphate regulating hormone fibroblast growth factor-23. *Acta Phhysiol* 2010; 200: 97-106.
34. R. Bueno de Oliveira, R.M. Affonso Moyses: FGF-23:state of art. *J Bras Nefrol* 2010 sept; 32(3):323-32.
35. H. Yokota, J. F. Raposo, A. Chen, C. Jiang, H. G. Ferreira: Evaluation of the Role of FGF23 in Mineral Metabolism. *Gene Regul Syst Bio* 2009; 3: 131-142.
36. I. Urakawa, et al: Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor factor for FGF23. *Nature* 2006; 444: 770-774.
37. H. Li, A. Martin, V. David, L.D. Quarles: Compaund deletion of Fgfr3 and Fgfr4 partially rescues the Hyp mouse phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 300(3). Epub 2010.

38. B. Lanske, M.S. Razzague: Mineral metabolism and aging: The fibroblast growth factor 23 enigma. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16(4): 311-8.
39. D. Sitara, et al: Genetic ablation of vitamin D activation pathway reverses biochemical and skeletal anomalies in FGF-23-null animals. *Am J Pathol* 2006; 169: 2161-2171.
40. S. Ichikawa, et al: A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest* 2007; 117: 2684 – 2691.
41. H. Segawa, et al: Corelation between hyperphosphatemia and type II Na-Pi cotransporter activity in klotho mice. *Am J Phsiol Renal Physiol* 2007; 292: F769-F779.
42. Y. Wang, P. and Z. Sun, MD, PhD, FAHA: Current Understanding of Klotho. *Ageing Res Rev* 2009; 8(1): 43-51.
43. I. Z. Ben-Dov, H. Galitzer, V. Lavi-Moshayoff, R. Goetz, M. Kuro-o, M. Mohammadi, R. Sirkis, T. Naveh-Many, J. Silver: The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007; 117: 4003-4008.
44. T. Krajisnik, P. Bjorklund, R. Marsell, O. Ljunggern, G. Akerstrom, K. B. Jonsson, G. Westin, T. E. Larsson: Fibroblast growth factor 23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007; 195: 125-131.
45. R. Calanejo et al: FGF23 Fails to Inhibit Uremic Parathyroid Glands. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1125–1135.
46. Yuan O., Sato T., Densmore M., Saito H., Schüler C., Erben R. G., Lanske B.: Fgf23/Klotho signaling is not essential for the phosphaturic and anabolic function of PTH. *JBMR* 2011; Epub ahead of print.
47. S. Liu, et al.: Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1305-1315.
48. M. R. Hausslera , C. A. Hausslera, G. K. Whitfielda, J. Hsieha, P. D.Thompsona, T. K. Barthela, L. Bartika, J. B. Eganb, Y. Wua, J. L.Kubiceka, C. L. Lowmillera, E. W. Moffeta, R. E. Forstera, P. W. Jurutkab: The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the “Fountain of Youth” to mediatehealthful aging; *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121(1-2): 88–97.

49. M. R. Haussler, C. A. Haussler, L. Bartig, G. K. Whitfield, J. Hsieh, S. Slater, P. W. Jurutka: Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutrition Reviews* 2008; 66: S98-S112.
50. H. Saito, A. Maeda, S. Ohtomo, M. Hirata, K. Kusano, S. Kato, E. Ogata, H. Segawa, K. Miyamoto, N. Fukushima: Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280: 2543-2549.
51. S. L. Ferrari, J. P. Bonjour, R. Rizzoli: Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1519-1524.
52. Y. Nishida, et al.: Acute effect on oral phosphate loading on serum fibroblast growth factor 23 levels in healthy men. *Kidney Int* 2006; 70: 2141-2147.
53. F. Saji, T. Shigematsu, T. Sakaguchi, M. Ohya, H. Orita, Y. Maeda, M. Ooura, T. Mima, S. Negi: Fibroblast growth factor 23 production in bone is directly regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D, but not PTH. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(5): F1212-F1217.
54. L. D. Quarles: Evidence for a bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis. *J Clin Invest* 2003; 112: 642-646.
55. X. Bai, D. Miao, D. Panda, S. Grady, M.D. McKee, D. Goltzman, A.C. Karaplis: Partial rescue of Hyp phenotype by osteoblast-target PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on X chromosome) expression. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 2913-2925.
56. R. G. Erben, D. Mayer, K. Weber, K. Jonsson, H. Juppner, B. Lanske: Overexpression of human PHEX under the human beta-actin promoter does not fully rescue Hyp mouse phenotype. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1149-1160.
57. S. Liu, P. S. Rowe, L. Vierthaler, J. Zhou, L. D. Quarles: Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol* 2007; 192: 261-267.

58. R. Guo, P. S. Rowe, S. Liu, L. G. Simpson, Z. S. Xiao, L. D. Quarles: Inhibition of MEPE cleavage by Phex. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 38-45.
59. W. N. Addison, Y. Nakano, T. Loisel, P. Crine, M. D. McKee: MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 1638-1649.
60. A. Martin, V. David, J. S. Laurence, P. M. Schwarz, E. M. Lafer, A. M. Hedge, P. S. N. Rowe: Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (Minhibins): ASARM-Peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinol* 2008; 149(4): 1757–1772.
61. P. S. Rowe, et al.: Correction of mineralization defect in hyp mice treated with protease inhibitors CA074 and pepstatin. *Bone* 2006; 39: 773-786.
62. C. A. Brownstein, et al.: A translocation causing increased alpha-klotho level result in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 3455-3460.
63. K. E. White, et al.: Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 361-367.
64. I. Nobuyuki: Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res.* 2010 October; 342(1): 1–11.
65. N. Kosaku: Relationship between Fibroblast Growth Factor-23 and mineral metabolism in chronic kidney disease. *Int J Nephrol* 2010; dec: 167984.
66. S. Seiler, Heine GH, D. Fliser: Clinical relevance of FGF-23 in chronic kidney disease. *Kidney Inter* 2009; 114: S34–S42.
67. H. Jüppner, M. Wolf, I. B. Salusky: FGF-23: More than a regulator of renal phosphate handling?. *J Bone Miner Res* 2010; 25(10): 2091-7.
68. B. Lanske, M.S. Razzague: Mineral metabolism and aging: The fibroblast growth factor 23 enigma. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16(4): 311-8.
69. S. Goebel, J. Lienau, U. Rommoser, L. Seefried, K. Witgens, J. Seuferd, G. Duda, F. Jakob, R. Ebert: FGF 23 is a putative marker for bone healing and regeneration. *J Orth Res* 2009; 27(9): 1141-1146.
70. M. Penko, S. Bevc, V. Kanič, R. Hojs: Prevalenca kronične ledvične bolezni pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom. *Zdrav Vestn* 2007; 76: 151-7.

71. Primer-BLAST. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
72. Zaporednja posameznih genov. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
73. Oligo Analyzer: Dosegljivo na:
<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>.
74. Y. Rhee, N. Bivi, E. Farrow, V. Lezcano, L. I. Plotkin, K. E. White, T. Bellido: Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. Bone 2011; Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726676>.
75. D. B. Logar, R. Komadina, J. Preželj, B. Ostanek, Z. Trošt, J. Marc: Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. J Bone Mineral Metab 2007; 25(4): 219-25.

PRILOGA

vzorec	študija	starost	masa	višina	Spol (1=Ž)	MKGtot	ttot
35	Darja	73	65	1,53	1	0,764	-1,76
36	Darja	68	75	1,85	2	0,851	-1,70
37	Darja	75	62	1,62	1	0,686	-2,41
38	Darja	71	74	1,62	1	0,772	-1,69
39	Darja	80	54	1,60	1	0,672	-2,52
40	Darja	63	79	1,72	2	0,906	-1,27
41	Darja	68	60	1,53	1	0,443	-4,44
42	Darja	74	70	1,68	1	0,742	-1,94
43	Darja	81	64	1,63	1	0,726	-2,08
44	Darja	75	63	1,51	1	0,541	-3,62
45	Darja	77	64	1,68	2	0,790	-2,17
46	Darja	74	69	1,63	1	0,789	-1,55
47	Darja	78	65	1,60	1		
49	Darja	78	75	1,62	1	0,735	-2,00
51	Darja	70	70	1,74	1	0,929	-0,38
52	Darja	84	70	1,82	2	0,866	-1,58
53	Darja	77	80	1,92	2	0,682	-3,00
55	Darja	71	77	1,77	2	1,114	0,33
60	Darja	74	75	1,62	1	0,979	0,03
64	Darja	71	76	1,57	1	0,861	-0,95
67	Darja	66	72	1,55	1	0,763	-1,76
68	Darja	69	59	1,61	2	0,728	-2,05
70	Darja	73	65	1,50	2	1,053	-0,14
72	Darja	75	90	1,58	1	0,838	-1,14
73	Darja	72	92	1,73	1	0,950	-0,21
76	Darja	66	85	1,66	1	0,995	0,16
77	Darja	66	109	1,58	1	1,009	0,28
78	Darja	78	69	1,64	2	0,853	-1,69
79	Darja	75	82	1,57	1	0,826	-1,24
81	Darja	68	80	1,73	2	0,885	-1,44
82	Darja	72	70	1,60	1	0,781	-1,61
84	Darja	66	82	1,66	1	0,960	-0,38
86	Darja	68	47	1,45	1		
88	Darja	71	77	1,60	1	0,851	-1,03
89	Darja	66	59	1,57	1	0,793	-1,52
90	Darja	53	60	1,55	1	0,610	-3,04
91	Darja	67	80	1,66	1	0,782	-1,61
92	Darja	72	75	1,64	1	0,869	-0,88
94	Darja	69	73	1,61	1	0,928	-0,39
96	Darja	65	84	1,74	2	1,121	0,38
97	Darja	72	80	1,56	2	1,064	-0,06
101	Darja	80	50	1,55	1	0,663	-2,60
102	Darja	79	58	1,53	1	0,712	-2,19
103	Darja	80	73	1,63	2	1,011	-0,47
104	Darja	73	76	1,63	1	1,101	1,05
105	Darja	77	62	1,60	1	0,743	-1,93
106	Darja	73	52	1,50	1	0,641	-2,78
107	Darja	72	56	1,55	1	0,739	-1,96
108	Darja	72	67	1,56	1		

vzorec	študija	starost	masa	višina	Spol (1=Ž)	MKGtot	ttot
109	Darja	77	58	1,55	1	0,572	-3,36
110	Darja	80	70	1,70	1	0,808	-1,39
111	Darja	85	65	1,63	1	0,760	-1,79
112	Darja	85	60	1,57	1	0,474	-4,17
114	Darja	77	58	1,55	1	0,572	-3,36
103 V	Vindišar	73			1		
107 V	Vindišar	82			1		
108 V	Vindišar	74			1		
114 V	Vindišar	69	95	1,68	1	0,875	-0,60
117 V	Vindišar	68	85	1,73	2	0,785	-1,60
121 V	Vindišar	76	70	1,72	1	0,714	-1,90
123 V	Vindišar	73	65	1,62	1	0,700	-2,00
125 V	Vindišar	72	63	1,59	1	0,680	-2,10
130 V	Vindišar	81			1		
133 V	Vindišar	72	83	1,83	2	0,974	-0,40
135 V	Vindišar	71	65	1,72	1	0,540	-3,30
136 V	Vindišar	77	70	1,76	2	0,500	-3,50
137 V	Vindišar	83	59	1,53	1	0,687	-2,10
138 V	Vindišar	67			1		
141 V	Vindišar	77	73	1,65	1	0,581	-3,00
144 V	Vindišar	87			1		
145 V	Vindišar	57			2		
147 V	Vindišar	74			1		
151 V	Vindišar	74			1		
152 V	Vindišar	83			1		
154 V	Vindišar	85	61	1,78	2		
162 V	Vindišar	78	68	1,59	1	0,560	-3,10
163 V	Vindišar	81			1		
164 V	Vindišar	73			1		
170 V	Vindišar	76	88	1,61	1	0,941	0,00
172 V	Vindišar	77	60	1,58	1	0,731	-1,70
179 V	Vindišar	85	56	1,60	1	0,402	-4,40
181 V	Vindišar	77			1		
182 V	Vindišar	79	90	1,65	1	0,505	-3,60
183 V	Vindišar	83	60	1,64	1	0,570	-3,00
186 V	Vindišar	88	56	1,60	1	0,469	-3,90
187 V	Vindišar	72	80	1,72	1	0,678	-2,20
188 V	Vindišar	82	80	1,73	2	0,777	-1,70
189 V	Vindišar	83			1		
190 V	Vindišar	86			1		
191 V	Vindišar	66	65	1,66	1	0,834	-0,90
302 V	Vindišar	74	84	1,58	2	1,255	1,50
303 V	Vindišar	49	70	1,51	1	0,962	0,20
304 V	Vindišar	77	70	1,59	1	0,758	-1,50
306 V	Vindišar	83	90	1,65	1	0,749	-1,60
311 V	Vindišar	72	90	1,80	2		
312 V	Vindišar	74	68	1,60	1	0,909	-0,30
313 V	Vindišar	65	65	1,67	1	1,005	0,50
315 V	Vindišar	77	80	1,80	2	1,314	1,90
317 V	Vindišar	58	88	1,74	1	0,959	0,10
318 V	Vindišar	59	95	1,73	2		
319 V	Vindišar	70	100	1,65	1	0,849	-0,80

vzorec	študija	starost	masa	višina	Spol (1=Ž)	MKGtot	ttot
323 V	Vindišar	74	92	1,83	2		
325 V	Vindišar	79	65	1,69	2	0,793	-1,60
335 V	Vindišar	87	80	1,56	1	0,721	-1,80
336 V	Vindišar	64	82	1,68	2	1,042	0,10
339 V	Vindišar	76	85	1,73	2	0,979	-0,40
340 V	Vindišar	67	90	1,69	1	0,931	-0,10
VR1	Vindišar	88	63	1,54	1		
VR6	Vindišar	70	90	1,63	1		

vzorec	BMDFN	tfn	BMDLS	tls	diag_DN	Pi	Ca
35	0,608	-2,86	1,047	0	1		
36	0,722	-2,34	1,156	1	1		
37	0,580	-3,15	0,805	-2	1		
38	0,647	-2,47	0,988	-1	0		
39	0,594	-3,01	0,777	-2	0		
40	0,714	-2,41	1,083	0	1		
41	0,374	-5,20	0,438	-6	1		
42	0,611	-2,84	0,797	-2	1		
43	0,600	-2,95	0,736	-3	1		
44	0,474	-4,16	0,583	-4	0		
45	0,635	-3,13	0,813	-3	1		
46	0,648	-2,47	0,989	-1	0		
47			1,315	2	1		
49	0,648	-2,46	0,903	-1	1		
51	0,920	0,25	1,205	1	0		
52	0,769	-1,91	0,929	-1	1		
53	0,573	-3,69	0,890	-2	1		
55	0,870	-0,99	1,387	3	0		
60	0,757	-1,38	1,159	1	0		
64	0,672	-2,22		-2	0		
67	0,734	-1,61	0,755	-3	0		
68	0,672	-2,23	0,792	-2	0		
70	0,745	-2,13	0,860	-2	0		
72	0,707	-1,88	1,180	1	0		
73	0,738	-1,56	1,130	1	0		
76	0,924	0,29	1,073	0	0		
77	0,879	-0,16	1,183	1	0		
78	0,723	-2,33	1,033	-1	0		
79	0,788	-1,07	0,916	-1	0		
81	0,820	-1,45	1,294	2	0		
82	0,586	-3,08	0,645	-4	0		
84	0,678	-2,17	0,854	-2	1		
86			0,819	-2	1		
88	0,842	-0,53	0,797	-2	0		
89	0,653	-2,42	0,942	-1	0		
90	0,511	-3,84			1		
91	0,669	-2,26	1,073	0	0		
92	0,804	-0,91	0,790	-2	0		
94	0,697	-1,98	1,167	1	0		
96	0,957	-0,20	1,098	0	0		
97	0,949	-0,27	1,207	1	0		
101	0,569	-3,26	0,674	-3	1		
102	0,581	-3,13	0,770	-3	1		
103	0,828	-1,37	1,025	-1	0		
104	1,062		0,884	-1	0		
105	0,725	-1,70	0,863	-2	1		
106	0,588	-3,07	0,908	-1	1		
107	0,606	-2,89	0,902	-1	0		
108			1,076	0	0		
109	0,766	-1,94	0,900	-2	1		

vzorec	BMDFN	tfn	BMDLS	tls	diag_DN	Pi	Ca
110	0,752	-1,42	0,915	-1	0		
111	0,663	-2,32	0,879	-2	1		
112	0,481	-4,13	0,726	-3	1		
114	0,519	-3,75	0,627	-4	1		
103 V					1	1,00	2,07
107 V					1	0,80	1,77
108 V					1	0,90	1,99
114 V	0,678	-1,50	1,114	1	1	1,20	2,11
117 V	0,669	-1,90	0,910	-2	1	0,90	1,93
121 V	0,734	-1,00	0,823	-2	1	0,80	1,96
123 V	0,616	-2,10	0,675	-3	1	1,00	1,97
125 V	0,528	-2,90	0,886	-2	1	1,30	2,25
130 V					1		
133 V	0,740	-1,40	0,885	-2	1	0,90	2,07
135 V	0,447	-3,60	0,625	-4	1	1,00	2,16
136 V	0,490	-3,20	0,903	-2	1	1,00	2,03
137 V	0,567	-2,50	0,608	-4	1	1,20	2,14
138 V					1	0,90	1,69
141 V	0,487	-3,30	0,733	-3	1	0,90	1,98
144 V					1	1,30	2,11
145 V					1	1,10	2,14
147 V					1		
151 V					1		
152 V					1		
154 V					1	1,20	2,73
162 V	0,522	-2,90	0,748	-3	1	0,80	2,16
163 V					1	0,90	2,17
164 V					1	0,80	1,98
170 V	0,798	-0,50	1,461	4	1	0,90	2,10
172 V	0,551	-2,70	0,819	-2	1	0,90	2,01
179 V	0,386	-4,20	0,785	-2	1	1,30	1,85
181 V					1	0,60	1,93
182 V	0,591	-2,30	0,683	-3	1	0,80	2,03
183 V	0,522	-2,90	0,601	-4	1	1,10	1,95
186 V	0,401	-4,00	0,779	-2	1	0,80	1,94
187 V	0,619	-2,10	1,108	1	1	0,90	2,03
188 V	0,644	-2,10	0,982	-1	1	0,70	1,98
189 V					1	0,90	2,00
190 V					1	1,00	1,89
191 V	0,675	-1,60	0,974	-1	1	1,10	2,01
302 V	1,179	1,80	1,329	2	0	0,90	2,04
303 V	0,765	-0,80	0,748	-3	0	0,80	1,98
304 V	0,639	-1,90	0,793	-2	0	1,00	2,02
306 V	0,718	-1,20	0,764	-3	0	0,80	2,08
311 V			1,133	0	0	0,80	2,10
312 V	0,707	-1,30	1,161	1	0	1,50	1,97
313 V	0,935	0,80	1,034	0	0	1,20	1,97
315 V	1,102	1,30	1,401	3	0	0,80	1,93
317 V	0,931	0,70	1,061	0	0	1,40	2,13
318 V			1,096	0	0	1,10	2,18
319 V	0,743	-1,00	0,849	-2	0	1,00	1,98
323 V			1,136	0	0	1,20	1,99

vzorec	BMDFN	tfn	BMDLS	tls	diag_DN	Pi	Ca
324 V	0,916	-0,10	1,116	0	0	1,40	2,06
325 V	0,708	-1,60	0,899	-2	0	1,00	2,05
335 V	0,761	-0,80	1,240	2	0	1,50	2,10
336 V	1,030	0,70	1,305	2	0	0,80	2,13
339 V	0,911	-0,10	0,937	-1	0	0,90	1,97
340 V	0,669	-1,60	0,768	-3	0	0,80	2,08
VR1					0		
VR6					0		

vzorec	@25OHD	MDRD	iPTH	kreatinin	urea	Klotho	FGF23
103 V	44	>60	33	73	6,5	828,67	0,00
107 V	38	>60	55	34	7,9	603,00	0,00
108 V	47	>60	35	68	4,6	766,33	0,00
114 V	44	>60	68	80	7,8	791,00	0,00
117 V	46	>60	70	99	5,8		
121 V	26	>60	48	53	8,5	747,00	0,00
123 V	39	>60	42	62	8,0	623,00	0,00
125 V	28	21	45	206	11,9	518,67	0,00
130 V							
133 V	19	>60	65	84	8,1		1,13
135 V	42	>60	95	76	7,4	995,00	0,22
136 V	16	>60	40	73	5,6		0,00
137 V	44	>60	31	86	8,5		
138 V	11	>60	76	53	4,5		0,00
141 V	52	>60	32	84	7,9	672,33	0,00
144 V	10	>60	56	54	3,6	1.410,00	0,00
145 V	42	>60	34	68	5,2	701,33	0,00
147 V							
151 V							
152 V							
154 V	41	11	609	452	11,9	630,33	42,87
162 V	31	>60	45	60	5,4		0,00
163 V	10	43	32	106	8,6	645,33	0,00
164 V	35	>60	49	59	6,3	492,67	0,00
170 V	10	>60	44	65	8,0	967,00	0,00
172 V	21	>60	41	70	6,3	1.201,67	0,00
179 V	15	>60	188	54	10,9	1.243,00	5,08
181 V	38	>60	52	61	9,8	1.476,67	13,34
182 V	18	44	48	104	12,7	866,33	0,00
183 V	87	43	64	106	6,8		0,00
186 V	100	60	31	79	13,0	1.019,33	0,00
187 V	10	>60	70	66	4,3	530,00	0,00
188 V	15	19	120	274	14,4	948,00	11,65
189 V	22	>60	72	57	5,2	802,33	3,61
190 V	12	>60	42	55	2,9	833,00	0,00
191 V	37		56	52	3,2	562,33	0,00
302 V	42	85,9	69	81	9,0		0,00
303 V	25	96	79	60	7,7		
304 V	12	87,4	96	61	4,3		0,00
306 V	10	60	59	82	10,1	385,00	0,00
311 V	14	83,3	91	82	6,4	948,00	0,00
312 V	28	54,5	175	91	10,3	770,00	1,11
313 V	43	>60	35	76	4,9	1.204,67	0,00
315 V	68	72,7	69	91	5,8	732,00	0,00
317 V	28	81,7	38	67	5,0	570,33	0,00
318 V	39	111,6	41	66	3,9	799,33	0,00
319 V	29	75,9	85	69	5,0	1.270,67	1,78
323 V	37	69,1	85	96	5,1	1.132,00	0,00
324 V	16	50,9	164	128	8,6	872,67	0,00
325 V	30	87,4	58	101	4,6	673,00	152,27
335 V	12	62,1	92	79	7,8	690,00	0,00

vzorec	@25OHD	MDRD	iPTH	kreatinin	urea	Klotho	FGF23
336 V	42	70,4	33	97	6,9	600,00	0,00
339 V	54	78	32	86	7,3	639,00	0,00
340 V	10	67,3	25	77	5,1	914,00	0,00
VR1						741,33	0,00
VR6							0,00

vzorec	sOPG	PTH1R	RANK	VDR	RANKL	OPG
35			0,6095	1,2745	0,3036	1,7862
36		4,1439	2,1913	2,6294	0,7142	1,7739
37		0,5468	0,8667	0,8554	0,4717	3,1542
38		1,3560	0,9275	1,7409	0,3623	4,7745
39		2,3839	0,5087	2,7982	1,4789	5,6582
40		0,1032	0,4338	0,6832	0,0419	0,4586
41		1,0885	0,6035	1,2578	0,1348	4,2905
42		0,0813	0,3836	1,1420	0,3465	1,4132
43		0,4001	1,0777	0,9379	0,5338	0,4105
44		0,9926	0,2699	1,1050	0,2517	2,2280
45		0,2213	0,1970	1,4220	0,1093	2,8941
46		0,3778	0,3571	1,1948	0,0981	1,7422
47						1,2972
49		0,1256		1,9297	0,3534	5,6151
51		2,6461	0,4985	2,7567	0,8170	7,0581
52		0,1249	0,2367	1,1639	0,4504	1,2150
53		0,2038	0,2864	0,9041	1,3766	0,6861
55						
60		1,5413	0,8089	3,4357	0,5656	11,2453
64		0,1358	0,2351	1,1197	0,0441	0,9444
67		0,3469	0,2836	1,2760	0,1028	2,0962
68		1,0769		2,0127		7,0406
70		0,1937		1,6803		1,3054
72				1,7418	0,1548	1,8918
73			0,1698	0,9527	0,1114	0,9962
76		0,0831	0,1562	0,8773	0,0319	0,7876
77		0,1428	0,1434	0,9286	0,0306	0,6431
78		1,0525	0,3610	1,8946	0,4018	5,8014
79		0,5824	0,2341	1,2277	0,0566	2,0359
81		0,0539	0,1602	0,9103	0,0204	0,5337
82		0,0720	0,1687	0,8559		0,7867
84		0,6079	1,0602	1,0841	0,4425	1,6431
86		0,2874	1,4696	1,0465	0,3486	0,3294
88		1,1253	0,6971	2,2508	0,1401	5,9882
89		0,3359	0,8151	1,7462	0,3571	3,6726
90		0,2453	0,7192	1,2548	2,4503	0,6837
91		2,3627	1,0165	3,6907	0,6943	11,1556
92		0,3708	0,3686	1,6809	0,1437	3,0523
94		0,4854		1,2561	0,0629	9,3965
96		3,3757	0,6583	3,8759	0,5371	6,1466
97		0,6092	0,3045	1,1862	0,3576	1,5369
101		0,1333	0,2370	0,7583	0,4138	0,4779
102			9,1203	1,9130	0,1913	0,4590
103		0,0698	0,1188	0,6853	0,0160	0,4837
104		0,7170	0,8261	2,2013	0,3373	7,9377
105		0,0817	0,1939	0,8342	0,0562	1,0412
106		0,2549	0,9314	0,7756	0,1772	1,2634
107		0,1097	0,1480	0,7775	0,0330	0,4443
108				2,2702		3,3873
109		0,0858	0,2574	0,9283	0,6773	0,7281

vzorec	sOPG	PTH1R	RANK	VDR	RANKL	OPG
110		0,0554	0,1658	0,8027	0,0255	1,0073
111		0,4049	0,8391	1,0826	0,1637	1,6760
112		0,1964	0,2089	1,0411	1,6816	1,6135
114		0,3009	0,9872	0,9196	0,7439	0,5296
103 V	7,58	0,2716	0,4571	1,0911	1,5459	0,7599
107 V		0,8471	1,5934	0,8010	0,2990	0,5408
108 V	3,48	0,1847	0,5504	1,1436	1,1099	4,0739
114 V	7,58	0,1382	0,5632	0,9343	0,3398	0,5048
117 V		0,1674	0,3081	0,7020	0,3934	0,3919
121 V	7,70	0,0844	0,2813	0,9054	0,5586	1,6060
123 V	8,05	0,2451	0,4611	0,7691	0,0790	0,3420
125 V	9,57	0,1785	0,3530	0,7337	0,0952	0,8273
130 V		1,2087	2,1358	1,6987	0,3902	2,9585
133 V	3,84	0,1963	0,3934	0,8656	0,5489	0,5346
135 V	5,84	0,1864	0,4232	0,5495	0,1172	0,7568
136 V	6,79	0,2593	1,2510	0,4643	0,6873	0,5243
137 V		0,7385	3,3919	1,1273	0,1560	0,8686
138 V		0,2672	0,7087	0,6862	0,0865	0,3928
141 V		0,7760	2,7975	0,8387	0,7957	0,9344
144 V	9,47		1,7451	0,7781	0,1459	0,3170
145 V	5,16	2,2045	0,7535	1,1558	1,9618	4,6332
147 V		5,5461		5,6526	0,7550	6,7069
151 V		0,6381	0,6012	1,0540	0,2676	0,4380
152 V		0,1519	0,3466	0,6664	0,0750	0,2785
154 V	30,85	3,0596	2,4448	2,0629	1,2886	3,6291
162 V	12,83	1,4494	2,5746	1,7239	0,2028	1,0602
163 V	6,53	0,1937	0,1632	0,7410	0,1406	0,6584
164 V	9,28	0,3730	0,3430	0,6575	2,5029	0,7904
170 V	6,78	3,3170	0,9601	2,3423	0,8922	3,2480
172 V	16,68	0,0797	0,1100	0,8183	0,3631	1,0218
179 V	11,29	0,1095	0,7551	1,3902	0,4393	0,6908
181 V	19,59	1,1767	2,4515	1,5852	0,3196	0,9340
182 V	8,82	0,8364	2,9170	1,3260	0,3846	0,8179
183 V	17,18	2,3862	0,4362	2,5179	0,5510	1,7404
186 V	7,73	0,1076	1,1145	0,5472	0,0577	0,2136
187 V		1,0402	0,3283	2,0273	0,8077	1,6582
188 V	12,36	0,8035	2,1348	0,7751	0,5309	0,5284
189 V	5,98	0,3149	0,5671	0,7996	0,9830	2,2790
190 V	10,69	0,9037	3,1750	1,0549	0,2232	0,4708
191 V	5,62	0,2548	0,8191	1,0911	0,3903	3,7350
302 V	8,59	3,9958	0,6697	5,8445	0,5376	11,6344
303 V		0,3187	0,2093	1,1257	0,0694	2,4463
304 V	4,33	0,3545	0,3911	0,8861	0,5885	1,1127
306 V		0,6366	0,3026	1,2012		1,9074
311 V		1,8778	0,4941	1,2149	0,4347	10,4774
312 V		0,2200	0,2090	0,7968		2,5248
313 V		0,1417	0,1595	0,8673	0,0507	1,0781
315 V	10,20	0,4823	0,3402	1,2179	0,4859	0,7587
317 V	5,63	0,0982	0,2493	1,1835		0,6220
318 V		0,7987		1,4078	0,3038	10,6564
319 V	9,36	0,5508	0,2233	1,5805	0,0570	2,5923
323 V		0,0973		0,7061		0,6300

vzorec	sOPG	PTH1R	RANK	VDR	RANKL	OPG
324 V	8,64	0,7598	0,2538	1,1688	0,2360	8,8933
325 V		1,1741	0,3268	1,8807	0,2149	1,7782
335 V	7,73	0,3407		1,1346	0,3621	1,4045
336 V	7,65	0,1241	0,1934	1,2165		0,8196
339 V	10,06	0,2518		1,0892		0,7061
340 V	10,27	0,9275	0,4653	1,5254	0,8502	0,9821
VR1		0,5570	0,3559	1,1575	0,2744	2,0035
VR6		0,7474	0,6611	1,2762	0,8359	2,6611