

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TIMEA TOMŠIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

LJUBLJANA, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TIMEA TOMŠIČ

**PRESNOVA ŽELEZA PRI BOLNIKI H Z OSTEOPOROZO IN
OSTEOARTROZO**

**IRON METABOLISM IN PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS AND
OSTEOARTHRITIS**

MAGISTRSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2012

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo in v Diagnostičnem laboratoriju Zdravstvenega doma Ljubljana (enota Center), pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. Meritve mineralne kostne gostote so opravili na Kliniki za travmatologijo v Splošni bolnišnici Celje.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek, mag. farm. za uvajanje v laboratorijsko delo, strokovno vodenje in koristne nasvete. Zahvala tudi ostalim zaposlenim na Katedri za klinično kemijo za pomoč pri opravljanju laboratorijskega dela.

Posebna zahvala gre tudi sodelavkam in sodelavcem ter vodji Spomenki Lajtner, spec. med. biokem. Diagnostičnega laboratorija v Zdravstvenem domu Ljubljana (enota Center) za pomoč, podporo in spodbudo tekom študija. Zahvaljujem se tudi Jerneju za pomoč pri pisanju naloge. Obenem se zahvaljujem tudi podjetju Siemens, da so prispevali del reagentov za izvedbo praktičnega dela magistrske naloge.

Zahvala gre tudi mojim domačim, Toniju in prijateljem za podporo in spodbudne besede ter razumevanje v času študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek, mag. farm..

Timea Tomšič

KAZALO

POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC	VIII
1. UVOD	1
1.1. PRESNOVA ŽELEZA	1
1.1.1. ABSORPCIJA ŽELEZA	1
1.1.2. TRANSPORT ŽELEZA	3
1.1.3. SKLADIŠČENJE ŽELEZA	4
1.1.4. IZLOČANJE ŽELEZA	5
1.1.5. KROŽENJE ŽELEZA	5
1.2. MOTNJE V PRESNOVI ŽELEZA	5
1.2.1. POMANJKANJE ŽELEZA	5
1.2.2. MOTNJE V PORAZDELITVI IN IZKORIŠČANJU ŽELEZA	5
1.2.3. KOPIČENJE ŽELEZA	6
1.3. KLINIČNI POMEN IN VREDNOTENJE PRESKRBE Z ŽELEZOM V TELESU	8
1.3.1. DOLOČANJE KONCENTRACIJE ŽELEZA	8
1.3.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJE CELOTNE VEZALNE SPOSOBNOSTI ZA ŽELEZO (TIBC, angl. total iron binding capacity)	9
1.3.3. DOLOČANJE KONCENTRACIJE TRANSFERINA	10
1.3.4. IZRAČUN NASIČENOSTI (SATURACIJE) TRANSFERINA (TfS)	11
1.3.5. DOLOČANJE KONCENTRACIJE FERITINA	12
1.4. HEREDITARNA HEMOKROMATOZA (HH)	13
1.4.1. GEN ZA HFE	13
1.4.2. MUTACIJE V GENU <i>HFE</i> IN PREVALENCA HH	15
1.4.3. KLINIČNA SLIKA HEREDITARNE HEMOKROMATOZE	16

1.4.4.	DIAGNOSTIKA HEREDITARNE HEMOKROMATOZE	16
1.4.5.	ZDRAVLJENJE HEREDITARNE HEMOKROMATOZE	18
1.5.	OSTEOPOROZA IN OSTEOARTROZA	19
1.5.1.	POVEZAVA MED KOPIČENJEM ŽELEZA IN KOSTNO PRESNOVO	20
2.	NAMEN DELA.....	23
3.	MATERIALI IN METODE	24
3.1.	PREISKOVANCI.....	24
3.2.	MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE	24
3.3.	DOLOČANJE SERUMSKIH PARAMETROV.....	24
3.3.1.	PRINCIP METODE ZA MERJENJE ŽELEZA V SERUMU.....	25
3.3.2.	PRINCIP METODE ZA MERJENJE TIBC V SERUMU.....	25
3.3.3.	PRINCIP METODE ZA MERJENJE FERITINA V SERUMU	25
3.3.4.	IZRAČUN NASIČENOSTI TRANSFERINA (TfS).....	26
3.4.	IZOLACIJA GENOMSKE DNA.....	26
3.5.	VREDNOTENJE IZOLIRANIH VZORCEV DNA	29
3.6.	MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI IZOLIRANE DNA	31
3.7.	GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI.....	32
3.7.1.	PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI	33
3.8.	STATISTIČNE METODE.....	35
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4.1.	OPIS PREISKOVANIH SKUPIN	37
4.2.	PRIMERJAVA BIOKEMIČNIH PARAMETROV MED SKUPINAMA PREISKOVANCEV GLEDE NA SPOL	39
4.3.	UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI MED STAROSTJO IN BIOKEMIČNIMI PARAMETRI TER MINERALNO KOSTNO GOSTOTO	41
4.4.	UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI MED BIOKEMIČNIMI PARAMETRI IN MINERALNO KOSTNO GOSTOTO	42
4.5.	IZOLACIJA GENOMSKE DNA.....	44

4.6.	UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI MUTACIJ V GENU HFE	45
4.6.1.	UGOTAVLJANJE RAZLIK V PORAZDELITVI GENOTIPOV MED SKUPINAMA PREISKOVANCEV	48
4.7.	UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI GENOTIPOV Z BIOKEMIČNIMI PARAMETRI 49	
4.8.	VPLIV GENOTIPA NA MINERALNO KOSTNO GOSTOTO.....	51
5.	SKLEP.....	55
	LITERATURA.....	56
	PRILOGE	60

POVZETEK

Železo ima pomembno vlogo v celični presnovi. Za ustrezno preskrbo organizma z njim je odgovornih več mehanizmov, ki uravnavajo njegovo absorpcijo, transport, skladiščenje in kroženje. Porušena presnova železa vodi do različnih bolezenskih stanj. Zvečana absorpcija železa zaradi mutacij v genu *HFE* je vzrok za hereditarno hemokromatozo. Najpogostejši vzrok so mutacije C282Y, H63D in S65C. Bolezen se deduje avtosomno recesivno in zanjo je značilno počasno in progresivno kopičenje železa v različnih organih zaradi povečane absorpcije. Železo ima negativen učinek na kostno presnovo, in sicer zavira aktivnost osteoblastov in sintezo kostnine, kar vodi v osteopenijo in osteoporozo. Zaplet hereditarne hemokromatoze je tudi osteoartritoza.

V naši raziskavi smo želeli oceniti vpliv preskrbe z železom na kostno presnovo pri bolnikih z osteoporozo (N = 83) in osteoartritozo (N = 13), ki jim je bila odvzeta kri in izmerjena mineralna kostna gostota (MKG). V serumu smo določili koncentracije železa, TIBC (angl. total iron binding capacity), feritina in izračunali nasičenost transferina (TfS). Iz polne krvi smo izolirali genomsko DNA, ki smo jo nato uporabili za genotipizacijo mutacij C282Y, H63D in S65C v genu *HFE* s hidrolizirajočimi sondami ter ugotavljali pogostnost mutacij in vpliv genotipov na MKG in preskrbo z železom.

V primerjavi s preiskovanci z osteoartritozo ($68,9 \pm 9,5$ let) so bili preiskovanci z osteoporozo starejši ($79,5 \pm 7,4$ let), imeli so višje koncentracije železa, feritina in TfS ter nižje vrednosti MKG na treh mestih meritve. V skupini preiskovancev z osteoporozo smo dokazali pozitivno korelacijo med starostjo in železom ($r = 0,308$, $p = 0,005$) ter TfS ($r = 0,321$, $p = 0,003$) in negativno korelacijo med starostjo in MKG-FN ($r = -0,401$, $p = 0,002$) ter MKG-TOT ($r = -0,411$, $p = 0,002$). Dokazali smo tudi pozitivno korelacijo med TIBC in MKG na treh mestih meritve. V skupini preiskovancev z osteoartritozo smo določili negativno povezavo med železom in MKG-FN ($r = -0,540$, $p = 0,011$) ter MKG-TOT ($r = -0,494$, $p = 0,023$). Dokazali smo tudi negativno povezavo med TfS in MKG-FN ($r = -0,458$, $p = 0,037$). V celotni skupini preiskovancev smo določili naslednje frekvence mutiranega alela: 3,4 % za mutacijo C282Y, 27,9 % za mutacijo H63D in 1,0 % za mutacijo S65C. Razlike v porazdelitvi genotipov med skupinama preiskovancev nismo določili. V skupini preiskovancev z osteoartritozo smo določili vpliv genotipa C282Y na TIBC ($p = 0,005$), MKG-FN ($p = 0,038$) in MKG-TOT ($p = 0,049$).

Naši rezultati kažejo na prisotnost razlik v preskrbi z železom med bolniki z osteoporozo in osteoartrozo, ki lahko vplivajo na MKG. Pri bolnikih z osteoartrozo je prisotnost mutacije C282Y povezana z nižjo MKG. Zaradi majhnega števila preiskovancev bi bilo potrebno v prihodnje študijo razširiti na večje število preiskovancev.

ABSTRACT

Iron plays a significant role in cellular metabolism. Therefore several mechanisms that regulate its absorption, transport, storage as well as cycling have evolved. Defects in iron metabolism lead to various health conditions. Mutations in *HFE* gene are responsible for hereditary hemochromatosis which results in iron accumulation. C282Y, H63D and S65C are the most frequently found mutations. The disease is inherited in autosomal recessive pattern. Slow and progressive iron accumulation in various organs is specific for this type of pattern due to increased iron absorption. Iron can have a negative effect on bone metabolism, it inhibits the activity of osteoblasts and bone formation, causing osteopenia and osteoporosis. Osteoarthrosis, a type of complication for hereditary hemochromatosis, is also often present in patients.

The aim of this study, was to evaluate the impact of iron status on bone metabolism in patients with osteoporosis (N = 83) and osteoarthrosis (N = 13). Blood samples were taken from patients for iron, TIBC, ferritin and transferrin saturation (TfS) serum determination. Bone mineral density (BMD) was also measured. DNA was isolated from whole blood samples and then used for C282Y, H63D and S65C mutations genotyping in *HFE* gene by using hydrolysis probes. The genotype frequencies were determined and genotype influence on BMD as well as iron status was assessed.

Patients with osteoporosis were older ($79,5 \pm 7,4$ yrs) than those with osteoarthrosis ($68,9 \pm 9,5$ yrs). They also had higher serum concentrations of iron, ferritin, and TfS, while the values of BMD in three places of measurement were lower. Positive correlation was observed between age and iron concentration ($r = 0,308$, $p = 0,005$) and TfS ($r = 0,321$, $p = 0,003$) in the osteoporosis population. Negative correlation was also found in the osteoporotic patients between age and BMD-FN ($r = -0,401$, $p = 0,002$) and BMD-TOT ($r = -0,411$, $p = 0,002$). Furthermore, the positive correlation was determined for TIBC and BMD in three places of measurement. In osteoarthrotic group the negative correlation was determined for iron concentration and BMD-FN ($r = -0,540$, $p = 0,011$) and BMD-TOT (r

= - 0,494, $p = 0,023$) as well as negative correlation between TfS and BMD-FN ($r = - 0,458$, $p = 0,037$). In the whole group of patients the following minor allele frequencies were determined: 3,4 % for C282Y mutation, 27,9 % for H63D mutation and 1,0 % for S65C mutation. The difference in genotype distribution between the two groups was not found. In the osteoarthrotic patients the effect of C282Y genotype on TIBC ($p = 0,005$) and BMD-FN ($p = 0,038$) as well as BMD-TOT ($p = 0,049$) was determined.

Our study indicates that there are in fact differences in iron status between patients with osteoporosis and those with osteoarthrosis. The differences may have a significant impact on BMD. Furthermore, the presence of C282Y mutation in osteoarthrotic patients is associated with lower BMD values. Due to the small number of enrolled patients in our study further studies including larger number of patients should performed.

SEZNAM OKRAJŠAV

ALP	alkalna fosfataza
DEXA	dvoenergijska rentgenska absorpciometrija
DNA	deoksi ribonukleinska kislina
Fe	železo
FPN	feroportin
GIT	gastrointestinalni trakt
HAMP	hepcidin
HH	hereditarna hemokromatoza
HJV	hemojuvelin
ITM	indeks telesne mase
MKG	mineralna kostna gostota
MKG-FN	mineralna kostna gostota vratu stegenice
MKG-LS	mineralna kostna gostota predela ledvene hrbtenice
MKG-TOT	mineralna kostna gostota kolka
r	Pearsonov korelacijski koeficient
RES	retikuloendotelijski sistem
ROS	reaktivne kisikove spojine
PCR	verižna reakcija s polimerazo
SD	standardni odklon (deviacija)
SR	sedimentacija eritrocitov
Tf	transferin
TfR	transferinski receptor
TfS	nasičenost (saturacija) transferina
TIBC	celotna vezalna sposobnost za železo (angl. total iron body capacity)

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1:	Shematski prikaz presnove železa.
Slika 2:	Prikaz normalne absorpcije železa (A) in absorpcije železa pri HFE odvisni hemokromatozi (B).
Slika 3:	Shematski prikaz diagnostike hereditarne hemokromatoze.
Slika 4:	Detekcija produktov PCR s hidrolizirajočimi sondami.
Slika 5:	Elektroforeza izoliranih vzorcev DNA na 2 % agaroznem gelu.
Slika 6:	Porazdelitev vrednosti za TIBC med normalnimi homozigoti in heterozigoti pri genotipu C282Y.
Slika 7:	Porazdelitev vrednosti MKG-FN (kg/m^2) med normalnimi homozigoti in heterozigoti pri genotipu C282Y.
Slika 8:	Porazdelitev vrednosti MKG-TOT (kg/m^2) med normalnimi homozigoti in heterozigoti pri genotipu C282Y.

Preglednica I:	Klasifikacija primarnih hemokromatoz (povzeto po klasifikaciji OMIM).
Preglednica II:	Referenčne vrednosti za železo po starosti.
Preglednica III:	Referenčne vrednosti za feritin po starosti.
Preglednica IV:	Definicija osteoporoze na osnovi meritev mineralne kostne gostote (MKG).
Preglednica V:	Priporočeni volumni reagentov za izolacijo genomske DNA iz polne krvi.
Preglednica VI:	Priprava reakcijske zmesi za genotipizacijo.
Preglednica VII:	Pogoji reakcije PCR v realnem času.
Preglednica VIII:	Opis preiskovanih skupin.

Preglednica IX:	Povprečne vrednosti biokemičnih parametrov glede na spol in skupino preiskovancev.
Preglednica X:	Korelacija med starostjo in biokemičnimi parametri ter mineralno kostno gostoto glede na skupino preiskovancev.
Preglednica XI:	Korelacija med železom, TIBC (angl. total iron binding capacity), nasičenostjo transferina in mineralno kostno gostoto.
Preglednica XII:	Frekvence (%) posameznih mutacij v genu <i>HFE</i> v preiskovanih skupinah.
Preglednica XIII:	Število alelov in alelne frekvence v preiskovanih skupinah.
Preglednica XIV:	Ugotovljene in pričakovane vrednosti genotipov v preiskovanih skupinah.
Preglednica XV:	Povprečne vrednosti za železo, TIBC (angl total iron binding capacity), feritin in nasičenost transferina za mutacijo C282Y.
Preglednica XVI:	Povprečne vrednosti za železo, TIBC (angl. total iron binding capacity), feritin in nasičenost transferina za mutacijo H63D.
Preglednica XVII:	Povprečne vrednosti za železo, TIBC (angl total iron binding capacity), feritin in nasičenost transferina za mutacijo S65C.
Preglednica XVIII:	Vpliv genotipa C282Y na mineralno kostno gostoto (MKG).
Preglednica XIX:	Vpliv genotipa H63D na mineralno kostno gostoto (MKG).

1. UVOD

Železo se v živih organizmih nahaja v sledovih, kljub temu pa igra zelo pomembno vlogo v celični presnovi. Je sestavni del hemoglobina, mioglobina, citokromov in številnih drugih encimov ter sodeluje pri prenosu kisika in v celičnih reakcijah. Železo se nahaja tudi v ribonukleotid reduktazi, ki je nujno potrebna za sintezo DNA. Ker pri reakcijah z železom lahko nastanejo tudi škodljivi kisikovi radikali, ki povzročajo poškodbe celic in organov, so morali organizmi razviti mehanizme, ki skrbijo za privzem, prenos in skladiščenje železa v neškodljivi obliki (1).

Železo se v organizmu nahaja v treh oblikah, in sicer kot skladiščno, funkcionalno in transportno. Skladiščno železo je v obliki feritina v jetrih, vranici in kostnem mozgu. Porazdelitev železa je različna pri moških in ženskah, ki imajo manjše zaloge in nižje koncentracije hemoglobina. Odrasli moški imajo v telesu približno 4 g železa, medtem ko ženske četrtino manj. Funkcionalno železo je vezano v hemoglobinu (65 - 70 %), 4 % v mioglobinu in manj kot 1 % železa je vezanega v različnih encimih. Transportno železo je vezano v transferinu in predstavlja 4 mg. Dnevne potrebe po železu se razlikujejo tudi glede na spol, starost in fiziološko stanje osebe. Pri ženskah so v rodni dobi potrebe večje količine zaradi izgub (1,5 - 2 mg), odrasli moški in ženske v menopavzi pa potrebujejo 1 mg železa dnevno. Nosečnice in doječe matere potrebujejo 3 mg železa dnevno (1, 2).

1.1. PRESNOVA ŽELEZA

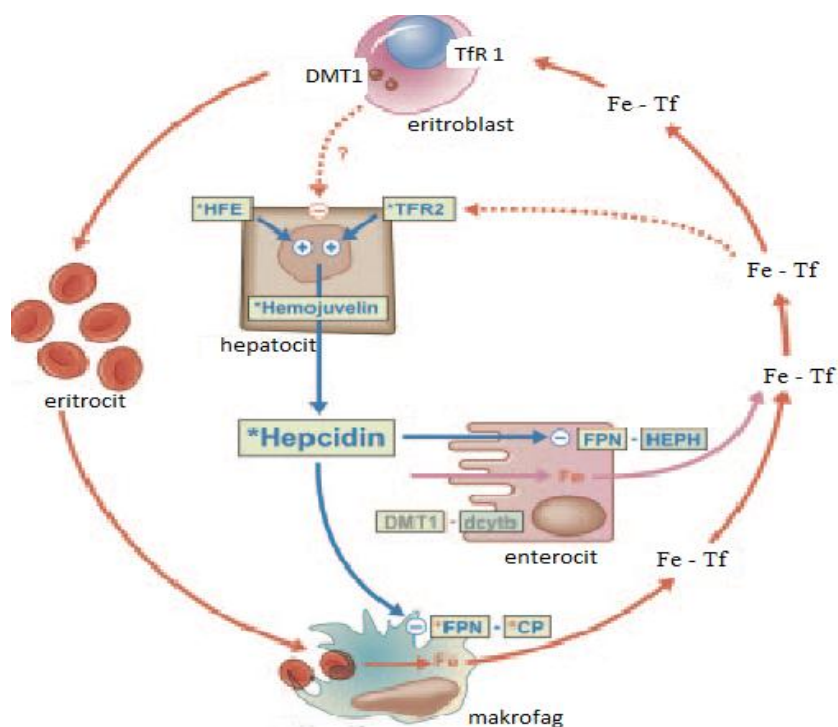
1.1.1. ABSORPCIJA ŽELEZA

Vnos železa je odvisen od prehranjevalnih navad. Povprečna količina železa, ki ga dnevno zaužijemo s hrano je 10 - 20 mg. Absorpcija poteka v dvanajstniku in v zgornjem delu tankega črevesa. Običajno se absorbira le 10 % vsega vnešenega železa (2). Vilusni enterociti proksimalnega dvanajstnika imajo na svoji površini vezane številne prenašalne beljakovine in vsebujejo encime, ki so potrebni za transport železa iz črevesnega lumna do krvi. V hrani se železo nahaja v nehemski in hemski obliki. Slednji se lažje absorbira kot nehemsko železo. Hem nastane kot produkt proteolitične razgradnje hemoglobina in mioglobina v gastrointestinalnem traktu (GIT). Hem vstopi v enterocite s pomočjo

vezikularnega transporta po vezavi na ustrezni receptor. V enterocitu hem oksigenaza cepi porfirinski obroč, sprostí se hemsko Fe^{2+} (3). Nehemsko Fe^{3+} se mora reducirati preden vstopi v enterocite. Redukcija do Fe^{2+} poteka s ferireduktazami (citokrom b), ki se nahajajo na krtačastem robu enterocitov. Na membrani enterocitov se nahajajo transportne beljakovine (divalentni metalni transporter 1 (DMT 1)), ki vežejo Fe^{2+} in ga z aktivnim transportom prenesejo v notranjost celic. V citosolu enterocitov se Fe^{2+} , ki nastane iz hemske in nehemske oblike, oksidira v Fe^{3+} , ki se potem veže na transportne beljakovine in se izloči v kri (slika 1) (4).

Na absorpcijo železa vplivajo številni dejavniki:

1. Fiziološki dejavniki: Absorpcija železa je odvisna od stanja in količine zalog v telesu. Glede na potrebo po železu se na površini enterocitov izražajo transportne beljakovine, ki vežejo železo. Ob pomanjkanju železa se njihovo izražanje poveča, v primeru zadostne količine železa se izražanje zmanjša in se absorbira manj železa. Med fiziološkimi dejavniki ima pomembno vlogo tudi obseg eritropoeze. Če je eritropoeza pospešena, se poveča tudi absorpcija, čeprav je v telesu zadostna količina železa (npr. pri talasemiji) (5).
2. Lokalni dejavniki v GIT: Ob nezadostni kislosti želodčnega soka se absorpcija železa zmanjša. Na hitrost absorpcije vpliva tudi tvorba kompleksov z železom. Fe^{3+} tvori netopne komplekse s snovmi, ki so prisotne v hrani in tankem črevesju (fitati, tanini, oksalati, bikarbonati, fosfati,...), kar omeji absorpcijo. Tvorba topnih kompleksov z askorbinsko in citronsko kislino, sladkorji in aminokislinami pa absorpcijo poveča. Askorbinska kislina povzroči tudi redukcijo Fe^{3+} v Fe^{2+} (5).
3. Vloga jeter: Jetra imajo pomembno vlogo pri presnovi železa. Skladiščijo odvečno železo v obliki feritina in hemosiderina. Sintetizirajo transferin in hepcidin. Ob visoki koncentraciji železa, se sinteza feritina poveča in obratno (3). Hepcidin je negativni regulator absorpcije železa. Po svoji sestavi je peptidni hormon, ki uravnava absorpcijo železa v enterocitih in sproščanje železa iz makrofagov preko feroportina (FPN). Feroportin se nahaja na površini enterocitov, makrofagov in hepatocitov ter iz njih izloča železo. Mehanizem, ki uravnava izražanje hepcidina še ni popolnoma raziskan, znano pa je, da se njegovo izražanje poveča ob kopičenju železa in vnetjih, zniža pa ob anemijah in hipoksiji (6).



Slika 1: Shematski prikaz presnove železa.

Železo po vstopu v enterocite s pomočjo DMT 1 veže na transportno beljakovino transferin (Tf) in se izloči v kri. Pri izločanju železa iz enterocita sodelujeta feroportin in hefestin, ki ima feroooksidazno aktivnost. Po krvi potuje do jeter in kostnega mozga. V jetra vstopi preko transferinskega receptorja (TfR) 2 kjer se skladišči in njegovo količino uravnava hepcidin. Pot uravnavanja preko hepcidina je označena z modro barvo. V kostni mozeg kjer poteka eritropoeza železo vstopi preko TfR 1 in se vgradi v hemoglobin v eritroblaste, ki nato dozori v eritrocite. Ostareli eritrociti se razgradijo v makrofagih ter se železo ponovno veže na transferin in se prenaša po krvi. Železo se iz enterocita izloči s pomočjo feroportina in ceruloplazmina, ki Fe^{2+} oksidira v Fe^{3+} . Eritroidna pot je označena z rdečo barvo. (DMT 1 = divalentni metalni transporter 1, TfR 1= transferinski receptor 1, Fe-Tf = železo vezano na transferin, TfR 2 = transferinski receptor 2, FPN = feroportin; CP = ceruloplazmin, HEPH = hefestin)

1.1.2. TRANSPORT ŽELEZA

Absorbirano železo in železo, ki nastane pri katabolizmu hemoglobina (Hb) se v krvi veže na beta globulin - apotransferin, ki se sintetizira v jetrih. Kompleks med apotransferinom

in železovim ionom (Fe^{3+}) imenujemo transferin (Tf). Na apotransferinsko molekulo se reverzibilno vežeta dva iona Fe^{3+} in na ta način se železo prenaša do organov kjer se shranjuje (jetra in retikuloendotelijski sistem (RES)) in tkiv, kjer poteka sinteza komponent, ki vsebujejo železo (npr. eritropoetično tkivo v kostnem mozgu). Na celični površini tarčnih tkiv so specifični transferinski receptorji, kamor se vežejo kompleksi železa s transferinom. Nastali kompleks TfR-Tf-Fe se v notranjost celice prenese z endocitozo. Zaradi nižje pH vrednosti v endosomih se železo sprostí iz kompleksa in TfR-Tf se izloči iz celice. Apotransferin se odcepi iz transferinskega receptorja in je ponovno sposoben vezati nove ione železa. Izražanje TfR je uravnavano z znotrajcelično koncentracijo železovih ionov (2, 7).

1.1.3. SKLADIŠČENJE ŽELEZA

Železo je uskladiščeno v obliki feritina in hemosiderina v jetrih, vranici in kostnem mozgu. **Feritin** je molekula, ki je zgrajena iz apoferitinske ovojnice in kristaliničnega jedra. Omogoča skladiščenje železa v topni in netoksični obliki in hitro sproščanje, ko se pojavijo potrebe po železu. Apoferitinska ovojnica je sestavljena iz 24 proteinskih podenot dveh različnih tipov: L in H. Z različnimi kombinacijami podenot nastanejo izoferitini, ki so specifični za različna tkiva (srce, placenta, tumorske celice). V kristalinično jedro se lahko veže do 4500 Fe^{3+} ionov, običajno pa je vezanih le okoli 2000 ionov ali manj. Železo se v feritinu nahaja v Fe^{3+} obliki, medtem ko se Fe^{2+} ioni pred vstopom v jedro oksidirajo na proteinski ovojnici. Sproščanje železa iz feritina poteka neencimatsko in ga pospešujejo reducirajoče snovi (flavini in močni kelatorji). Feritinske molekule se v celicah razgrajujejo v lizosomih. Sproščeno železo se nato vgradi v nove molekule feritina. Zaloge železa pri moških in ženskah v obliki feritina so različne in znašajo pri moških približno 800 mg, pri ženskah pa le okoli 200 mg.

Manjše količine železa so shranjene v **hemosiderinu**, ki je netopna molekula. Nastane iz deproteiniziranih in agregiranih molekul feritina. Sproščanje železa iz hemosiderina je slabše kot iz feritina. Nahaja se v jetrih, vranici in kostnem mozgu (2, 6, 8).

1.1.4. IZLOČANJE ŽELEZA

Telo nima mehanizma, ki bi uravnavalo izločanje železa. Železo se iz telesa v normalnih okoliščinah izloča z odluščenimi celicami prebavil, kože, urinom in znojem. Pri izgubah obstajajo razlike glede na starost in spol. Ženske tekom menstruacije izgubijo od 15 do 20 mg železa. Z nosečnostjo in porodom ženska izgubi 500 mg železa. V primeru krvavitev pride do večjih izgub kar ima za posledico tudi pomanjkanje železa (3, 5).

1.1.5. KROŽENJE ŽELEZA

Presnova železa poteka skoraj v zaprtem krogu. Dnevno se v organizmu porabi 20 – 25 mg železa. Od tega največ za sintezo hemoglobina v kostnem mozgu. S hrano pridobimo dnevno 1 mg železa, kolikor se ga tudi izloči. Preostanek pa telo pridobi iz odmrlih eritrocitov, ki jih makrofagi fagocitirajo v RES. Železo se nato vezano na transferin vrne v krvni obtok ali se uskladišči. Glavno vlogo pri kroženju ima transferin.

1.2. MOTNJE V PRESNOVI ŽELEZA

1.2.1. POMANJKANJE ŽELEZA

Do pomanjkanja železa v telesu lahko privedejo nekatera fiziološka stanja zaradi povečanih potreb po železu in/ali povečanih izgub (puberteta, nosečnost in porod pri ženskah, krvodajalstvo) (2). Pomanjkanje železa pa je pogosto tudi posledica bolezenskih stanj, ki prizadenejo absorpcijo železa (kronična driska in malabsorpcijski sindrom) in izgube krvi v GIT (tumorji, razjede, hemeroidi) in urogenitalnem traktu (ledvični kamni, tumorji) ter nezadostnega vnosa s hrano. Najprej se izprazniijo zaloge železa, nato se zmanjša transport z železom in na koncu je prizadeta eritropoeza z zmanjšano sintezo hemoglobina. V končni fazi se zaradi pomanjkanja železa razvije anemija, ki je mikrocitna hipokromna in je ena najpogostejših anemij (9).

1.2.2. MOTNJE V PORAZDELITVI IN IZKORIŠČANJU ŽELEZA

Do motenj v porazdelitvi železa pride navadno zaradi kroničnih bolezni (maligni tumorji, kronična vnetja), ki imajo za posledico relativno kopičenje skladiščenega železa ter

pomanjkanje transportnega in funkcionalnega železa. V večini primerov je zmanjšana eritropoetska aktivnost. Izražanje TfR je normalno ali zmanjšano, v primeru hitro rastočih tumorjev pa lahko tudi povečano.

Ob normalnih zalogah in normalni porazdelitvi železa se lahko pojavijo motnje v izkoriščanju železa in vodijo v nastanek mikrocitne ali normocitne anemije. Do teh motenj lahko pride pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo in pomanjkanjem eritropoetina (1).

1.2.3. KOPIČENJE ŽELEZA

Kopičenje železa povzročajo različna stanja zaradi povečane absorpcije železa kar ima za posledico povečanje zalog skladiščnega železa ali pogoste transfuzije in neustrezna terapija z železom. Bolezen imenujemo hemokromatoza, ki je lahko prirojena (primarna) ali pridobljena (sekundarna). Zanja je značilno kopičenje železa in posledično pride do poškodb določenih organov (jeter, srca, trebušne slinavke). Vzrok poškodb so prosti železovi ioni, ki so sposobni tvoriti toksične kisikove radikale (10, 11). Zaradi fagocitoze in oksidativnega stresa so lahko prizadeti tudi granulociti in monociti. Kopičenje železa lahko povzroča tudi aterosklerozo zaradi povečane oksidacije lipoproteinov (2).

1.2.3.1. Prirojene ali primarne hemokromatoze

Primarne hemokromatoze so posledica genskih mutacij, ki vplivajo na delovanje različnih beljakovin, ki sodelujejo v homeostazi železa. Najpogostejše in najbolj raziskane mutacije so v genu *HFE*, ki prizadene vezavo kompleksa Fe - transferin na transferinski receptor in tako povzroči v hepatocitih, RES in v kriptnih celicah lažno stanje sideropenije. To povzroči povečano absorpcijo železa v črevesu in sproščanje železa iz RES - a. Bolezen imenujemo hereditarna hemokromatoza ali HFE hemokromatoza, ki je podrobneje opisana v poglavju 1.4.. Mutacije v genih za druge beljakovine, ki sodelujejo pri uravnavanju količine železa v telesu, so redke in povzročajo ne – HFE hemokromatoze (3).

Preglednica I: Klasifikacija primarnih hemokromatoz (povzeto po klasifikaciji OMIM) (12) (HJV = hemojuvelin, HAMP = hepcidin, TfR 2= transferinski receptor 2, Fe = železo, TfR 1 = transferinski receptor 1, RES = retikuloendotelijski sistem).

Klasifikacija	HFE Tip 1	ne - HFE Tip 2a	ne - HFE Tip 2b	ne - HFE Tip 3	ne - HFE Tip 4
Protein	HFE	hemojuvelin	hepcidin	TfR 2	feroportin
Gen in lokacija	<i>HFE</i> , 6p21.3	<i>HJV</i> , 1q21	<i>HAMP</i> , 19q13.1	<i>TfR 2</i> , 7q22	<i>SLC40A1</i> , 2q32
Funkcija proteina	Interakcija s TfR 1	Ni jasna, uravnavanje izražanje hepcidina	Zmanjšuje sproščanje Fe iz enterocitov	Privzem Fe v hepatocyte	Sproščanje Fe iz enterocitov, makrofagov, hepatocitov
Dedovanje	Avtosomno recesivno	Avtosomno recesivno	Avtosomno recesivno	Avtosomno recesivno	Avtosomno dominantno
Klinični pojav bolezni (desetletje)	4 - 5	2 - 3	2 ali 3	4 ali 5	4 ali 5
Poškodbe organov zaradi kopičenja železa	Jetra, srce, endokrini organi	Jetra, srce, endokrini organi	Jetra, srce, endokrini organi	Jetra, srce, endokrini organi	Jetra, vranica
Celice v katerih se kopiči železo	Parenhimske celice	Parenhimske celice	Parenhimske celice	Parenhimske celice	RES

1.2.3.2. Pridobljena ali sekundarna hemokromatoza

Pri sekundarni hemokromatozi gre za skupino bolezni, katerim je skupno kopičenje železa v RES in kasneje v parenhimskem tkivu. Zaradi neučinkovite eritropoeze ali hemolize se razvije kronična anemija, ki se zdravi s številnimi transfuzijami in železovimi pripravki, kar lahko privede do kopičenja železa, ki je hitro in predvidljivo. Stanje imenujemo hemosideroza in do poškodb tkiv pride le, če preobremenitev z železom traja dlje časa (3).

1.3. KLINIČNI POMEN IN VREDNOTENJE PRESKRBE Z ŽELEZOM V TELESU

1.3.1. DOLOČANJE KONCENTRACIJE ŽELEZA

Določanje koncentracije železa v serumu se nanaša na Fe^{3+} , ki je vezano na transferin. Koncentracija železa v serumu se spreminja tekom dneva in iz dneva v dan. Jutranje koncentracije železa so lahko do 70 % višje kot zvečer (13). Spremembe iz dneva v dan so trikratne glede na normalno vrednost železa in so posledica presnovnih procesov v telesu. Poleg tega obstajajo fiziološke razlike v koncentraciji železa glede na starost, spol, fiziološko stanje preiskovanca, jemanje zdravil. Moški imajo višje koncentracije železa kot ženske verjetno zaradi hormonskih razlik. Androgeni zvišajo nivo železa v plazmi, medtem ko ga estrogeni znižajo. Znižanje železa tekom menstruacije je posledica izgub s krvjo, ne pa zaradi hormonskega vpliva. Jemanje kontracepcijskih tablet zviša koncentracije železa v krvi. Nivo železa se pri ženskah izenači z moškimi v menopavzi. Fiziološko imajo nižje koncentracije železa starejše osebe in ženske. Spremembe v nivoju železa lahko povzročijo fizični in psihični stres (5).

Fiziološko znižano koncentracijo železa pogosto določimo zaradi nezadostnega vnosa s hrano (malnutricija), izgube železa (menstrualni ciklus, krvavitve v GIT, bolezni ledvic) ali zmanjšanega sproščanja iz skladišč (akutne in kronične okužbe, avtoimunske bolezni, revmatoidni artritis).

Zvišane koncentracije železa so posledica hematoloških bolezni, kot so neučinkovita eritropoeza (povečan razpad eritrocitov v kostnem mozgu), povečana razgradnja hemoglobina (hemolitične anemije) in zmanjšana eritropoeza (zaradi zastrupitve s svincem ali zaradi pomanjkanja piridoksina, vitamina B_{12} ali folne kisline). Izplavljanje železa iz skladišč v hepatocitih zaradi jetrne bolezni (ciroza) vodi do zvišanih vrednosti. Pogoste transfuzije in jemanje železovih pripravkov prav tako zviša nivo železa v serumu. Pri hemokromatozi, ki je genetska motnja in je zanjo značilno povečana absorpcija železa in so presežene fiziološke sposobnosti skladiščenja in porabe železa, določimo zvišane koncentracije v serumu (1, 8, 5).

Zaradi sprememb v koncentraciji železa v telesu, ki so posledica dnevnih, fizioloških ali patoloških dejavnikov moramo biti pazljivi pri interpretaciji rezultatov. Določanje

koncentracije železa v serumu kot samostojna preiskava nima klinične vrednosti, zato je potrebno opraviti še ostale preiskave, ki pripomorejo k oceni preskrbe z železom v telesu.

Referenčne vrednosti:

Referenčne vrednosti se razlikujejo glede na uporabljen metodo in reagente. Določene komercialno dostopne metode podcenjujejo ali precenijo vrednosti železa v serumu. Zato se priporoča, da laboratorij postavi svoje referenčne vrednosti (8). V Sloveniji se uporabljajo referenčne vrednosti, ki jih navaja Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (14).

Referenčna vrednost: 10,7 - 28,6 $\mu\text{mol/L}$

V nekaterih strokovnih literaturah podajajo referenčne vrednosti za različne starostne skupine in glede na različno fiziološko stanje, kar je prikazano v spodnji Preglednici II (1).

Preglednica II: Referenčne vrednosti za železo po starosti.

	Starost	Referenčno območje	Enota
Otroci	2 tedna	11 - 36	$\mu\text{mol/L}$
	6 mesecev	5 - 24	$\mu\text{mol/L}$
	12 mesecev	6 - 28	$\mu\text{mol/L}$
	2 - 12 let	4 - 24	$\mu\text{mol/L}$
Ženske	25 let	6,6 - 29,5	$\mu\text{mol/L}$
	40 let	4,1 - 24,0	$\mu\text{mol/L}$
	60 let	7,0 - 26,7	$\mu\text{mol/L}$
Nosečnice	12 teden	7,6 - 31,6	$\mu\text{mol/L}$
	9 mesecev	4,5 - 24,0	$\mu\text{mol/L}$
	6 mesecev po porodu	2,9 - 26,9	$\mu\text{mol/L}$
Moški	25 let	7,2 - 27,7	$\mu\text{mol/L}$
	40 let	6,3 - 30,1	$\mu\text{mol/L}$
	60 let	7,2 - 21,5	$\mu\text{mol/L}$

1.3.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJE CELOTNE VEZALNE SPOSOBNOSTI ZA ŽELEZO (TIBC, angl. total iron binding capacity)

Z določanjem TIBC pridobimo podatek o količini železa, ki se lahko veže na transferin in predstavlja indirektni način za določanje transferina. Normalno je zasedenih le 30 % vezalnih mest na transferinu in tako ima serum vedno rezervno kapaciteto za vezavo (8).

Znižane vrednosti TIBC izmerimo kadar je zmanjšana koncentracija transferina (jetrna ciroza, hemokromatoza) in pri bolezni ledvic, ko pride do povečanih izgub transferina. Kronična vnetja in nekatera maligna obolenja, ki jih ne spremlja pomanjkanje železa lahko znižajo vrednosti TIBC v serumu.

Zvišane vrednosti po navadi izmerimo kadar je pospešena sinteza transferina zaradi pomanjkanja železa. Gre za kompenzacijo, da telo zagotovi zadostno količino vezavnih mest za železo in se uporabi vso železo, ki je telesu na razpolago. Nekatera zdravila (oralni kontraceptivi), ki vplivajo na presnovo v jetrih lahko zvišajo vrednosti TIBC. Zvišana koncentracija je tudi na začetku nosečnosti (15).

Referenčna vrednost: 49,2 - 75,2 $\mu\text{mol/L}$ (14)

1.3.3. DOLOČANJE KONCENTRACIJE TRANSFERINA

Transferin je glavna prenašalna beljakovina železovih ionov v telesu. Sintetizira se v jetrih in po elektroforezni ločitvi beljakovin v serumu se nahaja v področju β_1 – globulinov. Transferin je skupina različnih izotransferinov. Vse oblike imajo sposobnost vezave železovih ionov in imajo podobne imunološke značilnosti (2). Kapaciteta prenosa železa po krvi je odvisna od količine transferina v telesu. Koncentracija transferina se spreminja glede na koncentracijo železa (15).

Transferin je negativni reaktant akutne faze. Znižane koncentracije v serumu zaznamo ob prisotnosti vnetnih in malignih obolenj. Njegova sinteza je zmanjšana pri kronični jetrni bolezni in malnutriciji, do povečanih izgub pa pride pri nefrotskem sindromu in enteropatijah. Zelo nizke koncentracije transferina določimo pri kongenitalni atransferinemiji, za katero je značilna mikrocitna hipokromna anemija in hemosideroza v srcu in jetrih (12).

Določanje koncentracije transferina je uporabno pri diferencialni diagnostiki anemij in za spremljanje zdravljenja. Pri pomanjkanju železa je koncentracija transferina zvišana, ampak je manj nasičen z železom. Če se anemija razvije zaradi motenj v vgrajevanju železa v eritrocite, je nivo transferina normalen ali znižan, čeprav je popolnoma nasičen. Pri prekomerni količini železa je koncentracija transferina normalna, čeprav je lahko nasičen od 55 do 90 %. Zvišane koncentracije transferina se pojavijo tudi v nosečnosti in

pri jemanju estrogenov. Transferin se v laboratorijih lahko določa z imunokemičnimi metodami ali se indirektno izračuna iz vrednostih za železo in TIBC:

$$\text{Transferin (mg/L)} = 0,70 \times \text{TIBC } (\mu\text{g/L}) \quad (\text{enačba 1})$$

$$\text{TIBC } (\mu\text{g/L}) = 1,43 \times \text{transferin} \quad (\text{enačba 2})$$

S tem izračunom se koncentracija transferina preceni za 16 – 20 %, ker se predpostavlja, da je vso železo v plazmi vezano na transferin. Ko nasičenost transferina presega 50 % (v primeru hereditarne hemokromatoze) se nekaj železa veže na ostale proteine (albumin) (5, 8).

Referenčne vrednosti: 2,0 - 3,8 g/L (14)

>60 let: 1,6 - 3,4 g/L (8)

1.3.4. IZRAČUN NASIČENOSTI (SATURACIJE) TRANSFERINA (TfS)

Z izračunom nasičenosti transferina (TfS) določimo železo, ki je vezano na transferin, ne pa tudi nespecifično vezano železo na druge beljakovine. Vsaka transferinska molekula lahko veže največ dva Fe^{3+} iona, kar ustreza 1,4 mg železa na 1g transferina (2). Normalno je približno ena tretjina transferina v serumu nasičena z železom. Koncentracija transferina v plazmi je uravnavana glede na vsebnost železa v tkivih (hepatociti). Na ta način se uravnava tudi TfS. Ko pride do pomanjkanja zalog železa in tkiva ne dobijo potrebnega železa, se kompenzatorno poveča sinteza transferina. To ima za posledico zmanjšano TfS, ki je pokazatelj za pomanjkanje transportnega železa.

Največ železa (80 %) se porabi za eritropoezo, zato je ob pomanjkanju prizadeta njena aktivnost. Znižanje TfS povzročajo še jetrne bolezni (hepatitis, alkoholizem), kongenitalna atansferinemija, povečano jemanje železovih pripravkov in transfuzija krvi. Če je pomanjkanje funkcionalnega železa posledica kronične bolezni (kronična vnetja ali maligni tumorji) se zmanjša sinteza transferina in železo se ne sprošča iz zalog. V tem primeru je TfS normalna. Zvišano TfS (> 50 %) povzroča kopičenje železa (hemokromatoza) (1, 8).

Za izračun TfS potrebujemo koncentracijo železa in TIBC izmerjeno v istem serumu. Enačba za izračun nasičenosti transferina (2, 9, 15):

$$\text{TfS (\%)} = \frac{\text{koncentracija Fe v serumu } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}\right) \times 100}{\text{koncentracija TIBC v serumu } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}\right)} \quad (\text{enačba 3})$$

Za izračun TfS lahko uporabimo koncentracijo transferina in železa izmerjeno v istem serumu (1, 2, 9):

$$\text{TfS (\%)} = \frac{\text{koncentracija Fe v serumu } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}\right) \times 3,98}{\text{koncentracija Tf v serumu } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} \quad (\text{enačba 4})$$

Referenčna vrednost: 15 - 45 %

1.3.5. DOLOČANJE KONCENTRACIJE FERITINA

Feritin vsebuje 15 - 20 % železa in je pomembna beljakovina pri njegovem skladiščenju. Nahaja se v skoraj vseh organih, največ ga je v jetrih, vranici in kostnem mozgu. Majhne količine feritina, ki preidejo v kri so sorazmerne s količinami v tkivih. Serumski feritin je glikoziliran in vsebuje majhne količine železa. Koncentracija feritina v serumu daje boljši vpogled na stanje železa v telesu, kot pa sama koncentracija železa. Določanje koncentracije feritina v serumu je zamenjava za invazivne metode, kot so biopsija kostnega mozga in jeter za ugotavljanje zalog železa (2).

Serumske koncentracije feritina pri odraslih od 20. do 50. leta starosti so v območju 20 - 300 µg/L. Od pubertete do srednjih let (≤ 50 let) imajo moški višje koncentracije feritina kot ženske iste starosti. Vrednosti feritina se izenačijo v pomenopavzi in referenčni interval je širši. Otroci imajo nižje koncentracije feritina kot odrasli (1).

Pri pomanjkanju železa koncentracija feritina pade zelo hitro (< 15 µg/L), veliko pred spremembami v koncentraciji hemoglobina in železa. Merjenje serumske koncentracije feritina zelo pripomore k zgodnjemu odkrivanju pomanjkanja železa (15).

Zvišane koncentracije feritina v serumu kažejo na kopičenje železa ali so posledica drugih bolezni. Sem spadajo kronične bolezni: jetrne bolezni, revmatoidni artritis, srčne bolezni, številna maligna obolenja (limfomi, levkemije, rak dojk, nevroblastom). Pri kopičenju

železa je koncentracija feritina $> 400 \mu\text{g/L}$. Zvišane koncentracije feritina lahko povzroči nekroza tkiv, in sicer zaradi sprostitve železa iz poškodovanih celic. Zato je potrebno rezultate interpretirati glede na celotno klinično sliko (1, 8).

Referenčne vrednosti: moški: 15 - 200 $\mu\text{g/L}$, ženske : 12 - 150 $\mu\text{g/L}$ (14)

Preglednica III: Referenčne vrednosti za feritin po starosti (1):

	Starost	Referenčno območje	Enota
Otroci	6 mesecev do 15 let	7 - 142	$\mu\text{g/L}$
Odrasli	20 - 65 let	Moški: 34 - 310 Ženske: 22 - 112	$\mu\text{g/L}$
	65 - 90 ženske	13 - 651	$\mu\text{g/L}$
	65 - 87 moški	4 - 665	$\mu\text{g/L}$

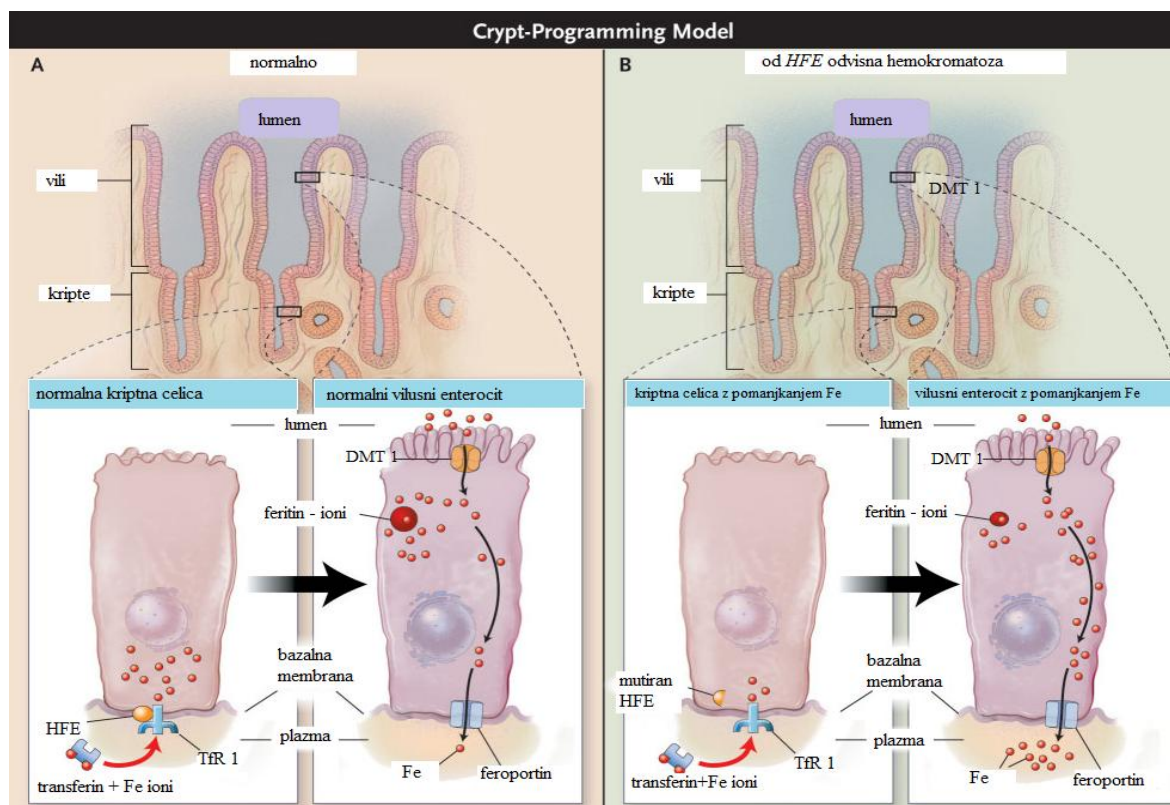
1.4. HEREDITARNA HEMOKROMATOZA (HH)

Prvi primer bolnika s hereditarno hemokromatozo, ki je imel jetrno cirozo, sladkorno bolezen in pigmentacijo kože je leta 1865 opisal Trousseau. Leta 1889 je hemokromatozo definiral Recklinghausen in bolezen označil kot prekomerno kopičenje železa. Sheldon je leta 1935 pojasnil, da gre za avtosomno recesivno dedno bolezen. Potek in dedovanje je leta 1976 odkril Simon s sod.. Poročal je o povezavi med človeškim levkocitnim antigenom (HLA) - A3 in HLA - B14 antigeni z idiopatsko hemokromatozo, kar kaže, da se gen za HH nahaja blizu poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) na kromosomu 6 p. Leta 1996 je Feder s sod. kloniral gen, ki je odgovoren za večino primerov hemokromatoz in ga poimenoval *HFE* (8, 16, 17).

1.4.1. GEN ZA HFE

Gen *HFE* kodira transmembranski protein HFE, ki je strukturno podoben molekulam MHC razreda I. Nahaja se v jetrih in črevesu, kjer poteka glavna presnova železa in v manjši meri v možganih (8). HFE se veže z β_2 - mikroglobulinom, nastane kompleks, ki tekmuje za vezavo na transferinski receptor 1 (TfR 1) s transferinom (slika 2).

TfR1 je izražen na površini celic in uravnava privzem železa v notranjost celice. Molekula HFE se veže tudi na TfR 2, ki se izraža na površini hepatocitov, vendar na drugo vezavno mesto kot transferin. HFE in transferin neodvisno povečata izražanje TfR 2 in HFE poveča afiniteto za vezavo transferina na TfR 2 in tako poveča privzem železa v notranjost celice. Znano je, da kopičenje železa v hepatocitih ne zmanjšuje izražanja TfR 2 na površini celic (12, 13, 16, 18, 19, 20).



Slika 2: Prikaz normalne absorpcije železa (A) in absorpcije železa pri HFE odvisni hemokromatozi (mutacija C282Y) (B) (13).

Normalne kriptne celice niso v stiku s svetlino črevesa, zato sprejemajo informacije pretežno preko krvi in uravnavaajo absorpcijo železa glede na potrebe v telesu. Železovi ioni vezani na transferin se vežejo na TfR 1, ki stopi v interakcijo z molekulo HFE. Železovi ioni se tako prenesejo v notranjost enterocita in tako kriptne celice uravnavaajo izražanje prenašalnih beljakovin (DMT 1) zrelega absorptivnega enterocita (A). Ob prisotnosti mutacije C282Y v genu *HFE* ne pride do interakcije med HFE in TfR 1, kar ima za posledico, da se železovi ioni, vezani na transferin, ne vstopijo v notranjost enterocita. Zaradi tega se na zrelem absorptivnem enterocitu poveča absorpcija železa iz svetline črevesa (B). (Fe = železo, DMT 1 = divalentni metalni transporter 1, TfR 1 = transferinski receptor 1)

1.4.2. MUTACIJE V GENU *HFE* IN PREVALENCA HH

Hereditarna hemokromatoza je dedna presnovna motnja, ki je posledica mutacije v genu *HFE*. Najpogostejša mutacija v genu *HFE* je C282Y, ki povzroči zamenjavo tirozina s cisteinom na mestu 282 v proteinu ter poškoduje disulfidno povezavo, ki je potrebna za normalno interakcijo z β_2 - mikroglobulinom na površini celic. Alelna frekvenca mutacije je 0,05 pri Kavkazijcih, 0,01 pri Hispanicah in manj kot 0,0067 pri Afroameričanih (8, 10, 11). Homozigote C282Y so odkrili pri več kot 90 % obolelih s primarno hemokromatozo v Severni Evropi in pri več kot 80 % obolelih iz Severne Amerike. Prevalenca mutacije C282Y pri HH pada iz severa proti jugu Evrope (21). Najvišja prevalenca je v Veliki Britaniji (96 %) in najmanjša v Italiji (64 %) in Grčiji (39 %).

Druga najpogostejša mutacija je H63D na mestu 63, ki povzroči zamenjavo histidina z aspartatom. Mutacija vpliva na interakcijo med *HFE* in transferinskim receptorjem, kar ima za posledico prekomerno kopičenje železa v celici. Pogostost mutacije pri Kavkazijcih je še enkrat bolj pogosta kot pojavnost mutacije C282Y. Mutacija H63D poveča tveganje za razvoj lažje oblike hemokromatoze in bolezen se redko razvije tudi če gre za homozigotno obliko (8, 10).

Manj pogosta mutacija v genu *HFE* povzroči zamenjavo serina s cisteinom na mestu 65 (S65C), ki povzroča lažjo obliko hemokromatoze. Študije o prevalenci mutacije S65C so pokazale alelnu pogostost v razponu 1,6 - 5,5 % pri Kavkazijcih (16).

Za HH zbolijo homozigoti C282Y/C282Y in heterozigoti C282Y/H63D in C282Y/S65C. Ostale redke mutacije v genu *HFE* so: V53M, V59M, H63H, Q127H, Q283P, P168X, E168Q, E168X IN W169X. Posledice teh redkih mutacij še niso raziskane, prav tako ni znana njihova prevalenca.

Prevalenca mutacij v Sloveniji

V študiji, ki je bila opravljena na zdravi slovenski populaciji so ugotovili naslednjo alelnu frekvenco: 3,6 % C282Y, 12,8 % H63D in 1,8 % S65C. Homozigotna oblika mutacije C282Y je bila ugotovljena v 0,16 %, sestavljenih heterozigotov C282Y/H63D je bilo 0,5 %. Približno 1 % slovenske populacije je C282Y homozigotov ali sestavljenih heterozigotov C282Y/H63D in C282Y/S65C, ki imajo zvečano tveganje za razvoj HH. Pogostost mutacij C282Y, H63D in S65C, ki so jo opazili pri Slovencih je primerljiva s pogostostjo, ki so jo opazili drugod po Evropi (22).

1.4.3. KLINIČNA SLIKA HEREDITARNE HEMOKROMATOZE

Za hereditarno hemokromatozo je značilno počasno, progresivno kopičenje železa v različnih organih. Klinični znaki se pri moških izrazijo običajno med 55. in 60. letom starosti, pri ženskah pa 10 let kasneje zaradi fizioloških procesov (redne menstruacije, nosečnost, dojenje) in v lažji obliki. Zgodnji znaki bolezni so nespecifični (kronična utrujenost, slabost, bolečine v trebuhu in sklepih), zato se bolezen ne odkrije na začetku (3). Vsi klinični zapleti so posledica povečane absorpcije železa in posledično kopičenja v različnih organih (jetra, srce, trebušna slinavka in koža). Do poškodbe tkiv pride zaradi reaktivnih kisikov spojin (ROS) in peroksidacije lipidnih membran, ki jo katalizirajo železovi ioni. Najbolj pogosto so prizadeta jetra, hepatomegalija je prisotna pri več kot 95 % simptomatskih bolnikov (16). Fibroza jeter se zaradi kopičenja železa razvije v cirozo, kar predstavlja tveganje za razvoj jetrnoceličnega raka. Alkoholizem, virusni hepatitis C in steatoza zaradi debelosti še dodatno povečajo razvoj ciroze. Oksidativni stres v hepatocitih lahko zmanjša aktivnost uroporfirinogen dekarboksilaze in vodi v razvoj porfirije cutanea tarda (23, 24). Nalaganje železa v srcu povzroči kongestivno srčno odpoved, ki se pojavi po 40. letu starosti. Pogoste so tudi aritmije. Prizadetost trebušne slinavke se kaže kot sladkorna bolezen tipa 2 zaradi fibroze pankreasa in propadanja celic B. Večina bolnikov ima dele kože obarvano temneje (bronasti diabetes) ali sivo. Vzrok za obarvanje je zvišanje melanina v koži, nalaganja hemosiderina in povečano število melanocitov ob stanjšanju epidermisa. Hemokromatozo spremlja še primarni hipotiroidizem zaradi kopičenja železa v ščitnici, kar spremljata fibroza in limfocitna infiltracija. Pri obolelih pride še do impotence, izgube libida ter pri ženskah do zmanjšane rodnosti in amenoreje (3, 16, 19). Osteoartritis ali osteoartroza je pogost klinični znak pri HH, ki pomaga pri odkrivanju pacientov. Klinični potek artritisa ni jasen pri HH, vendar naj bi kopičenje železa prispevalo k povečanemu tveganju za bolečine v sklepih (25).

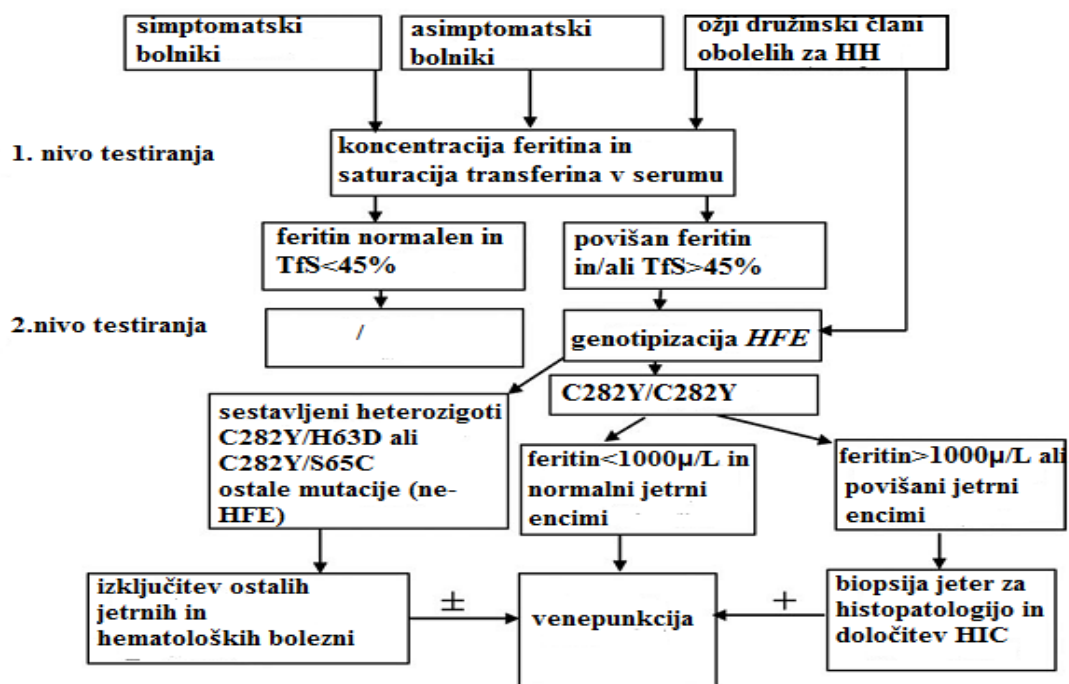
1.4.4. DIAGNOSTIKA HEREDITARNE HEMOKROMATOZE

Danes z uporabo biokemičnih testov in z genskim testiranjem lahko odkrijemo HH celo preden se pojavijo klinični znaki. Na prvem nivoju testiranja se v sklopu biokemičnih parametrov določata serumska koncentracija feritina in TfS. Zvišana TfS (> 45 %) kaže na zvišano količino železa v plazmi in je zgodnji označevalec za odkrivanje HH.

Koncentracija feritina v serumu odraža patološko kopičenje železa v organih. Vrednosti nad 200 µg/L pri ženskah in nad 370 µg/L pri moških govorijo za HH (3). Koncentracija feritina ima tudi napovedno vrednost za poškodbo jeter. Ko je vrednost nad 1000 µg/L je najverjetneje prisotna fibroza (12, 13, 19). Ob vrednotenju rezultatov je potrebno pomisliti še na druga stanja pri katerih lahko določimo zvišano TfS in zvišane vrednosti feritina v serumu (glej poglavje 1.3.). Ostale bolezni ločimo od hemokromatoze z ustreznimi laboratorijskimi preiskavami.

Drugi nivo testiranja za diagnostiko HH se izvede v primeru zvišane TfS in serumske koncentracije feritina ter vključuje gensko analizo s katerimi ugotavljamo mutacije v genu *HFE* in ostalih genih (*TfR 2*, *HJV*, *HAMP*, *SLC40A1*) (16). Najprej ugotavljamo prisotnost mutacije C282Y in nato še mutaciji H63D in S65C. Diagnozo za HH lahko potrdimo, če določimo homozigote C282Y/C282Y in sestavljene heterozigote z bialelno mutacijo C282Y/H63D ali C282Y/S65C. Ob potrditvi HH pri posamezniku je potrebno opraviti gensko testiranje še pri ožjih družinskih članih. Najprej pregledamo sestre in brate. Pri homozigotih in heterozigotih testiramo tudi partnerje. Če je partner tudi homozigot ali heterozigot se testira tudi otroke. Otroke testiramo po 10. letu starosti in ob pozitivnem rezultatu pričnemo tudi zdraviti. Če z genskimi testi ne odkrijemo od HFE odvisne hemokromatoze, posameznika testiramo na prisotnost mutacij še v ostalih genih, ki povzročajo ne - HFE hemokromatoze (12, 19).

Pred genotipizacijo HFE mutacij se je za potrditev HH uporabljala jetrna biopsija. Z jetrno biopsijo ugotavljamo stopnjo jetrne bolezni, če je vrednost feritina > 1000 µg/L. Biopsija jeter ni indicirana pri C282Y homozigotih, ki so mlajši od 40 let z normalnimi jetrnimi testi in je serumska koncentracija feritina < 1000 µg/L (3). Nedavno sprejeti diagnostični kriteriji za HH pri jetrni biopsiji vključujejo pozitivno obarvanje železa v hepatocitih, koncentracija železa v hepatocitih (HIC) > 80 µmol/g suhe teže in indeks železa v hepatocitih (HII) > 1,9 (normalno < 1,0), ki se izračuna iz HIC (µmol/L) / starost (leta). HII dobro korelira z genskimi analizami, vendar je manj občutljiv (8, 12).



Slika 3: Shematski prikaz diagnostike hereditarne hemokromatoze (20).

Zadnja leta se za oceno poškodb jeter uporabljajo manj invazivne tehnike. Prisotnost in stopnjo nakopičenega železa lahko določimo z magnetno resonanco (MR). Za oceno HIC z magnetno resonanco so ugotovili dobro specifičnost in občutljivost (19). V uporabo prihajajo tudi označevalci jetrne fibroze (γ - glutamil transferaza, α - 2-makroglobulin, haptoglobin, apolipoprotein A1, celotni bilirubin, hialuronska kislina, aminoterminalni propeptid kolagen tip III, tkivni inhibitor metaloproteinaze (TIMP - 1) (12).

1.4.5. ZDRAVLJENJE HEREDITARNE HEMOKROMATOZE

Cilj zdravljenja HH je odstraniti odvečno železo iz telesa in vzdrževati njegove normalne vrednosti. Venepunkcija (flebotomija) je varna, učinkovita in poceni oblika zdravljenja. Z venepunkcijo 1 enote krvi (500 mL) odstranimo približno 200 do 250 mg železa. Bolniki s HH imajo 25 do 50 g odvečnega železa in zato potrebujejo veliko število venepunkcij dokler koncentracija feritina ne pade pod 50 µg/L (< 10 µg/L (3)). Takrat preidemo na vzdrževalne venepunkcije. Zdravljenje traja dosmrtno (19). Klinični znaki kot so slabost, utrujenost, pigmentacija kože, bolečine v trebuhu in sladkorna bolezen se izboljšajo ob venepunkcijah. Do izboljšanj ne pride pri hipogonadizmu, bolečinah v sklepih in cirozi jeter. Hipogonadizem in sladkorna bolezen je potrebno posebej zdraviti (12). Bolnikom se

svetuje dietna prehrana, ki naj bo uravnotežena in z manj železa. Odsvetuje se pitje alkohola, ki poveča absorpcijo železa v črevesu. Priporoča se pitje ruskega čaja, ki kelira železo v prebavilih. Ko se pri bolniku razvije anemija, se venepunkcije ne morejo več izvajati in takrat pričnemo z zdravljenjem s kelirajočimi agensi, ki imajo visoko afiniteto za železo. Železo odstranjujejo iz celičnega hemosiderina in feritina ter ga izplavljajo iz telesa preko urina. Kelatorji imajo neugodno farmakokinetiko zato se jih aplicira parenteralno (3, 12).

1.5. OSTEOPOROZA IN OSTEARTROZA

Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, ki jo označujeta zmanjšana količina kostne mase in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva. Oboje vodi do povečane lomljivosti kosti. Tipični osteoporotični zlomi so zlom zapestja, vretenc in kolka. Zlomi zapestja so pogosti med 50. in 60. letom, zlomi vretenc med 60. in 70. letom, zlomi kolka, ki predstavljajo najhujši zaplet osteoporoze, pa po 70. letu starosti. Zlomi kosti so posledica količinskega zmanjšanja kostnine in strukturnih sprememb kosti: trabekule se tanjšajo, fenestrirajo in nato izginejo, prostori med trabekulami pa se večajo. Mikrofrakture se zaradi upočasnenih remodelacijskih procesov v starosti ne popravljajo več pravočasno in popolno. Zato pride do zloma že ob majhnem padcu ali neprimerni obremenitvi. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je definirala osteoporozo na osnovi zmanjšanja mineralne kostne gostote (MKG) za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso (Preglednica IV) (3).

Preglednica IV: Definicija osteoporoze na osnovi meritev mineralne kostne gostote (MKG).

T - VREDNOST	DEFINICIJA
< - 2,5 + zlomi	huda oz. napredovala osteoporoza
< - 2,5	osteoporoza
od -2,5 do - 1	osteopenija
>- 1	normalna MKG

Za merjenje MKG se najpogosteje uporablja dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (DEXA, angl. Dual - energy X - ray absorptiometry). Pri tej metodi se uporablja snop žarkov dveh energij, ki ga usmerimo skozi preiskovani del telesa. Merimo lahko maso in gostoto celotnega sklepa, v praksi pa največkrat merimo maso in gostoto ledvenih vretenc (MKG-LS), kolka (MKG-TOT) in vratu stegenice (MKG-FN). Kostno maso izrazimo kot mineralno kostno gostoto (MKG) v g/cm^2 ali kg/m^2 , saj s površinsko gostoto deloma zmanjšamo vpliv velikosti kosti. Izmerjeno vrednost MKG izrazimo tudi kot T - vrednost (3).

Osteoartroza je raznolika sklepna bolezen, ki se razvije zaradi različnih vzrokov ter prizadene enega ali več sinovijskih sklepov okončin, hrbtenico ali oboje. Bolezen se kaže s spremembami na hrustancu, subhondralni kosti, sinoviji, ligamentarnem in nevromišičnem aparatu. Zoženje sklepnega prostora, tvorbo kostnih izrastkov, subhondralno sklerozo in kostne ciste vidimo z rentgenskim slikanjem. Poanatomsko in biokemično dokažemo subhondralne mikrofrakture, motnje presnove in delovanja hondrocitov, spremembe in izgubo osnovnih sestavin hrustanca. Pri osteoartrozi se pojavljajo nespecifični znaki: bolečina, okorelost, zadebeljen in/ali razoblikovan sklep, omejena gibljivost in krepite. Osteoartroza lahko prizadene vse sklepe, vendar so nekateri bolj pogosto prizadeti kot drugi. Najpogosteje so prizadeti sklepi v roki, kolenu, kolku, hrbtenici in stopalu. Pri kolku je lahko prizadet zgornji in medialni del sklepa ali zelo redko celoten sklep (3, 26). Ločimo primarno ali idiopatsko obliko in sekundarno osteoartrozo. Primarno obliko povzročajo dedni dejavniki, spol, starost, hormonsko stanje, debelost, klimatske spremembe in prehrana. Sekundarna oblika se razvije zaradi prirojenih ali razvojnih nepravilnosti, po poškodbah in vnetjih sklepov, endokrinoloških in presnovnih boleznih ali pri prekomernih fizičnih obremenitvah (27).

1.5.1. POVEZAVA MED KOPIČENJEM ŽELEZA IN KOSTNO PRESNOVO

Kopičenje železa, ki se pojavi pri hemokromatozi povzroča poškodbe tkiv in organov. Presežek železa, ki se ne more uskladiščiti in se nalaga v različnih tkivih ima toksičen učinek. Toksičnost železa temelji na Fenton in Haber - Weissovi reakciji, kjer je železo sposobno tvoriti reaktivne kisikove spojine (ROS), ki povzročajo poškodbe DNA, lipidno

peroksidacijo, spremembe proteinov. ROS lahko povzroči oksidativni stres, kar povzroča kronična vnetja, ishemijo organov in nevrodegenerativne motnje (28, 29). Podroben opis o oksidativnem stresu in o vplivu na kosti je opisan v diplomski nalogi Petrovič Maje, poglavje 1.3. (30).

Eksperimenti *in vivo* na živalskih modelih so pokazali, da kopičenje železa zmanjšuje MKG. Zavira aktivnost osteoblastov in sintezo kostnine in ne deluje zaviralno na resorpcijo kosti. Resorpcija poraste v prisotnosti hipogonadizma (31). Zanj je značilno pomanjkanje androgenov in estrogenov v plazmi, kar povzroči motnje v presnovi kosti. Zaradi hitrejše resorpcije in zmanjšane tvorbe kostnine pride do izgube kostne mase (1). Razvoj in zorenje osteoblastov je pod vplivom CBF - $\alpha 1$, ki inducira izražanje specifičnih genov za osteoblaste. Zaviranje aktivnosti osteoblastov vodi v zmanjšano mineralizacijo kosti, osteoporozo in osteopenijo. Zarjou in sodelavci so s pomočjo *in vitro* raziskav ugotovili, da je prišlo do inhibicije aktivnosti osteoblastov ob dodatku železa, ki je večinoma vplival na indukcijo H podenote feritina in na feroooksidazno aktivnost (32). Yamasaki in Hagiwara sta prav tako na kultiviranih celicah podgan *in vitro* ugotovila, da kopičenje železa povzroča osteoporozo z inhibicijo proliferacije in diferenciacije osteoblastov (33).

V nekaterih raziskavah so osteopenijo in osteoporozo opazili pri 25 - 50 % bolnikih s hemokromatozo in tveganje za zlome ocenili na več kot 20 %. V študiji kjer so ocenjevali MKG in spremembo kosti pri moških s HH so opazili zmanjšanje MKG, ki je bilo bolj izrazito pri MKG-FN kakor pri MKG-LS, kar kaže na večji vpliv kopičenja železa na kortikalne kosti (34). V nasprotju s temi ugotovitvami so Valenti in sod. (31) opazili večje znižanje MKG-LS v primerjavi z MKG-FN, kjer so imeli vključene tudi ženske preiskovanke. Obe študiji potrjujeta, da kopičenje železa samo po sebi vpliva na patogenezo in na razvoj osteoporoze.

Znano je, da je hipogonadizem pogost zaplet pri HH. Pri hipogonadizmu je pospešena kostna aktivnost in resorpcija kar vodi v zmanjšanje kortikalne in trabekularne kostnine in poslabša potek osteoporoze, vendar je malo verjetno, da povzroča zmanjšanje MKG pri HH. Pri HH so pogosto prizadeta jetra, kar vodi v cirozo. Vpliv ciroze na kosti je težko oceniti zaradi prisotnosti številnih dejavnikov. Pri preiskovani skupini, ki je vključevala 38 moških preiskovancev, Guggenbuhl in sod. niso odkrili nobene povezave med MKG in cirozo jeter. Višje vrednosti feritina so imeli pacienti s cirozo in hipogonadizmom. Za

koncentracijo železa v hepatocitih (HIC), ki je dober pokazatelj za kopičenje železa so našli negativno korelacijo z MKG (34). Povezavo med zvišano koncentracijo celokupne alkalne fosfataze (ALP) in znižano MKG ter povezavo med koncentracijo feritina in celokupno ALP so odkrili tudi Valenti in sod. (31). V teh primerih so odkrili porast izoencima kostno specifične ALP in ne jetrno specifične ALP. Povišane koncentracije kostno specifične ALP so v povezavi s pospešeno izgubo kostne mase (31).

Za osteoartrozo, ki se razvije zaradi hemokromatoze, je značilna hondrokalciinoza (nalaganje kristalov kalcijevega pirofosfata v tkivu) in nalaganje hemosiderina v sinoviju. Najbolj so prizadeti sklepi rok. Progresivni poliartritis lahko prizadene kolena, zapestje in kolke (13). Za HH značilna osteoartroza, ki se kaže z bolečino v metakarpofalangealnem sklepu (sklep med dlanjo in prstom) in povezava s serumskim feritinom ni bila najdena pri homozigotni mutaciji C282Y (35).

2. NAMEN DELA

Železo ima pomembno vlogo v celični presnovi. Za ustrezno preskrbo organizma z železom je odgovornih več mehanizmov, ki uravnavajo njegovo absorpcijo, transport, skladiščenje in kroženje. Ob porušeni presnovi železa se lahko pojavijo različna bolezenska stanja zaradi motenj v porazdelitvi in izkoriščanju, pomanjkanja ali kopičenja železa.

Kopičenje železa, ki je posledica hereditarne hemokromatoze nastane zaradi mutacij v genu *HFE*. Najpogostejši vzrok so mutacije: C282Y, H63D in S65C. Bolezen se deduje avtosomno recesivno in zanjo je značilno počasno in progresivno kopičenje železa v različnih organih zaradi povečane absorpcije. Bolezen se najprej kaže z nespecifičnimi znaki, kasneje pa so prizadeta jetra, srce, trebušna slinavka in koža. Železo ima negativen učinek na kostno presnovo, in sicer zavira aktivnost osteoblastov in sintezo kostnine, kar vodi v osteopenijo in osteoporozo. Zaplet hereditarne hemokromatoze je tudi osteoartraza.

Namen magistrske naloge bo oceniti vpliv preskrbe z železom na kostno presnovo pri bolnikih z osteoporozo in osteoartrazo. V ta namen bomo:

- Pri 116 preiskovancih z osteoporozo in osteoartrazo izmerili biokemične kazalce preskrbe z železom (železo, TIBC, feritin in nasičenost transferina) s spektrofotometričnimi in imunokemičnimi metodami.
- Preiskovancem bomo iz polne krvi izolirali genomsko DNA in s hidrolizirajočimi sondami ter reakcijo PCR v realnem času genotipizirali mutacije C282Y, H63D in S65C v genu *HFE*.
- Z ustreznimi statističnimi metodami bomo primerjali preskrbo z železom in porazdelitev genotipov pri obeh skupinah preiskovancev. Ugotavljali bomo tudi vpliv genotipov na preskrbo z železom in MKG.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 116 preiskovancev, ki so bili napoteni na Oddelek za travmatologijo Splošne bolnišnice Celje za zamenjavo kolčnega sklepa zaradi osteoporoznega zloma vratu stegenice (N = 83) ali osteoartroze (N = 33). Za preiskovance, ki so bili vključeni v raziskavo nismo imeli podatka ali imajo hereditarno hemokromatozo.

3.2. MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE

Preiskovancem je bila diagnoza postavljena 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 (MK-TOT), vratu stegenice (MKG-FN) in področja ledvene hrbtenice (MKG-LS).

3.3. DOLOČANJE SERUMSKIH PARAMETROV

Vsem preiskovancem je bila odvzeta kri v Splošni bolnišnici Celje in serum je bil do uporabe hranjen pri – 80 °C. V diagnostičnem laboratoriju Zdravstvenega doma Ljubljana (enota Center) smo izmerili koncentracije naslednjih parametrov: železo, TIBC, feritin in izračunali TfS. Merjenje smo izvedli na avtomatiziranem biokemičnem analizatorju Dimension RxL Max, proizvajalca Siemens. Princip metode za merjenje koncentracije železa in TIBC je spektrofotometrija, za merjenje koncentracije feritina pa imunokemijska metoda (»sendvič« test). Pred merjenjem biokemičnih parametrov je bila izmerjena interna notranja kontrola za normalne in zvišane vrednosti s kontrolnim materialom proizvajalca. Vsaka metoda je bila kalibrirana po navodilih z ustreznim kalibratorjem.

3.3.1. PRINCIP METODE ZA MERJENJE ŽELEZA V SERUMU

V kislem mediju sprostimo Fe^{3+} ione iz kompleksa s transferinom. V prisotnosti reducirajoče snovi (npr. askorbinska kislina) Fe^{3+} reduciramo v Fe^{2+} . Fe^{2+} tvori modro obarvan kompleks s kromogenom (Ferene[®] - dinatrijeva sol 5, 5'(3-(2-piridil)-1,2,4triazin-5,6-diil)-bis-2- furansulfonske kisline). Absorbanco kompleksa merimo bikromatsko (600, 700 nm) in je premosorazmerna s koncentracijo železa v vzorcu (36).

3.3.2. PRINCIP METODE ZA MERJENJE TIBC V SERUMU

Serumu dodamo prebitek Fe^{3+} ionov, ki zasedejo prosta mesta na transferinu. Pri bazičnih pogojih (pH 8,6) se lahko le nevezano Fe^{3+} reducira do Fe^{2+} v prisotnosti askorbinske kisline in v nadaljevanju tvori obarvan kompleks s Ferene[®]. V kislem mediju (pH 4,5) se železo, ki je vezano na transferin sprosti in se reducira do Fe^{2+} ob prisotnosti askorbinske kisline. Fe^{2+} tvori obarvan kompleks s Ferene[®]. Porast absorbance pri znižanju pH iz 8,6 na pH 4,5 merimo bikromatsko (600, 700 nm) in je premosorazmerna koncentraciji železa, ki je vezano na transferin v serumu oziroma TIBC (37).

3.3.3. PRINCIP METODE ZA MERJENJE FERITINA V SERUMU

Serum inkubiramo z delci kromovega dioksida na katerega so vezana monoklonska protitelesa, ki so specifična za feritin. Zmesi je dodan še konjugat z monoklonskimi protitelesi, ki so označena z β – galaktozidazo in se specifično veže na feritin na drug epitop. Nastane kompleks delci/feritin/konjugat. Nevezan konjugat odstranimo z magnetno separacijo in spiranjem. Kompleks se veže s kromogenim substratom (CPRG-klorofenol rdeče- β -d-galaktopiranozid). Hidroliza CPRG povzroči nastanek kromofora CPR. Koncentracija feritina v serumu je direktno proporcionalna stopnji spremembe barve zaradi nastanka CPR, ki ga merimo pri 570/770 nm (38).

3.3.4. IZRAČUN NASIČENOSTI TRANSFERINA (TfS)

TfS smo izračunali po enačbi potem, ko smo izmerili koncentraciji za železo in TIBC v istem serumu.

$$\text{TfS (\%)} = \frac{\text{koncentracija železa v serumu } (\mu\frac{\text{mol}}{\text{L}})}{\text{koncentracija TIBC v serumu } (\mu\frac{\text{mol}}{\text{L}})} \times 100$$

Reagenti in oprema

- analizator Dimension RxL Max, Siemens, Nemčija
- IRON Flex[®] reagent cartridge (LOT: GB2034), Siemens Dimension
- IBCT Flex[®] reagent cartridge (LOT: DA1328), Siemens Dimension
- FERR Flex[®] reagent cartridge (LOT: CA2133), Siemens Dimension
- kontrolni material: Monitrol 1 in 2 (lot: TLM: 1211-1 in TLM: 1211-2), Siemens Dimension
- nastavki za majhne volumne SSC (Short sample cups), Siemens

3.4. IZOLACIJA GENOMSKE DNA

DNA smo izolirali iz levkocitov periferne venske krvi odvzete s K₃EDTA kot antikoagulant z reagenčnim kompletom FlexiGene DNA kit. Najprej smo vse vzorce razdelili glede na volumen polne krvi v epruveti. Izolacijo smo nato izvedli po priporočenem postopku glede na volumen polne krvi (39). Pred začetkom izolacije delovno površino in pipete, ki smo jih uporabili očistimo s 3 % hipokloritom. Pripravimo 70 % etanol in označimo centrifugirke in plastične epruvete s pokrovčkom. Iz hladilnika vzamemo vzorce in jih odtalimo v vodni kopeli pri 37 °C ter jih nato postavimo na led do uporabe.

Princip metode: K polni krvi dodamo lizirni pufer FG 1, da celice liziramo. Zmes nato centrifugiramo, odlijemo in dobimo peletko, ki vsebuje celično jedro in mitohondrije. Peletko nato raztopimo in inkubiramo v denaturacijskem pufru FG 2, ki vsebuje kaotropne snovi in Qiagen proteazo. Tako odstranimo proteine. DNA nato oborimo z dodatkom 100 % izopropanola in ponovno centrifugiramo. Supernatant odlijemo in dodamo 70 % etanol, da speremo izolat. Po centrifugiranju odlijemo supernatant in DNA posušimo ter jo raztopimo v hidratacijskem pufru FG 3 (39).

Posebnost: Za uspešno izolacijo smo priporočeni postopek proizvajalca optimirali. Postopek izolacije za večje volumne je enak, kot pri majhnih volumnih. Potrebno je bilo spremeniti centrifugalni pospešek in čas centrifugiranja.

Preglednica V: Priporočeni volumni reagentov za izolacijo genomske DNA iz polne krvi.

Reagent	Volumen polne krvi (mL)					
	2	4	5	6	7	8
Pufer FG 1 (mL)	5,0	10,0	12,5	15,0	17,5	20
Pufer FG 2 (mL)	1,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Qiagen proteaza (μL)	10	20	25	30	35	40
100 % izopropanol (mL)	1,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
70 % etanol (mL)	1,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Pufer FG 3 (mL)	0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8

Postopek:

- v centrifugirke pipetiramo FG 1
- kri premešamo z obračanjem in odpipetiramo v centrifugirko k FG 1
- centrifugirke zapremo in premešamo z obračanjem (5 x)
- centrifugiranje: 2 mL krvi: 5 minut pri 2000 x g pri 21 °C
4, 5 mL krvi: 8 minut pri 2500 x g pri 21 °C
6, 7, 8 mL krvi: 12 minut pri 2700 x g pri 21 °C
- supernatant po centrifugiranju previdno odlijemo v posodo za odpadno kri in centrifugirke obrnemo na čisto papirnato brisačo. Pri tem pazimo, da peletka ostane v centrifugirki
- v vsako centrifugirko dodamo FG 2 in Qiagen proteazo. Centrifugirke zapremo in močno premešamo na vrtnčastem mešalu dokler peletka ni popolnoma homogenizirana
- centrifugirke premešamo z obračanjem in jih postavimo v vodno kopel ter inkubiramo 10 minut pri 65 °C
- dodamo 100 % izopropanol in mešamo toliko časa dokler DNA precipitat ne postane viden

- ## Reagenti in oprema

- reagenčni komplet Flexigene DNA kit (Qiagen), ki vsebuje:
 - pufer FG 1 (Flexigene lysis pufer)
 - pufer FG 2 (Flexigene denaturation pufer)
 - Qiagen proteaza: liofilizirano Qiagen proteazo raztopimo v pufru FG 3 (1,4 mL)
 - pufer FG 3 (Flexigene hydration pufer)
- 100 % izopropanol (Merck)
- 70 % etanol: pripravimo iz 100 % etanola in ultra čiste vode
- 3 % hipoklorit

- polavtomatske pipete za različne volumne (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)

- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- centrifugirke, 15 in 50 mL (Sarstedt, Nemčija)
- vodna kopel (Biosan Water Bath-termostat WB 4MS)
- centrifuga (Eppendorf – Centrifuge 5804 R)
- vrtničasto mešalo – Vortex (Biosan BioVortex V1)
- sterilne vatrane palčke
- posoda za odpadno kri

3.5. VREDNOTENJE IZOLIRANIH VZORCEV DNA

ELEKTROFOREZA

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na ločevanju nukleinskih kislin v električnem polju na ustreznem nosilcu. Nabiti delci potujejo v električnem polju glede na naboj in velikost. Negativno nabita DNA potuje proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi) (40). Elektroforezo smo izvedli na 2 % agaroznem gelu, saj je agarozni gel porozen in omogoča ločevanje tudi velikih molekul DNA. Na gelu se bodo različno veliki in različno nabiti delci med seboj ločili v obliki lis. Za lažjo detekcijo DNA dodamo fluorescenčno barvilo SYBER[®] Safe.

PRIPRAVA 2 % AGARozNEGA GELA

V erlenmajerico natehtamo 1,5 g agaroze in dodamo 75 mL 1xTAE pufru. Erlenmajerico stariramo in jo pokrijemo z urnim steklom. Premešamo s kroženjem in v mikrovalovni pečici segrevamo zmes dokler tekočina ni bistra in brez mehurčkov. Erlenmajerico postavimo nazaj na tehtnico in dodajamo destilirano vodo, da bi nadomestili izparelo tekočino. V digestoriju dodamo 7,5 µL SYBER[®] Safe barvila ter premešamo z vrtenjem. Pripravimo nosilec za vlivanje gela z vstavljenim glavničkom (30 žepkov) za tvorbo žepkov v gelu. Raztopino nato vlijemo v kadičko ter počakamo, da se gel strdi. Nato odstranimo glavniček z nosilca, gel vzamemo ven in ga prenesemo v plastično vrečko. Po potrebi shranimo v hladilniku pri $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IZVEDBA ELEKTROFOREZE

Vse vzorce na kratko premešamo na vrtnčastem mešalu in nato še centrifugiramo, da se vsa tekočina zbere na dnu plastične epruvete. Pripravljen agarozni gel potopimo v elektroforezno kadičko, da je povsem pokrit s pufrom 1 x TAE. Na parafilm s polavtomatsko pipeto naneseemo 2 μ L označevalca dolžin (marker III) in mu primešamo 2 μ L vzorca ter vse skupaj naneseemo v žepke v agaroznem gelu. V en žepk na gelu vnesemo samo marker III. Ko napolnimo vse žepke, pokrijemo kadičko in sistem povežemo z električnim tokom. Elektroforeza traja 25 minut pri napetosti 90 V. Po končani elektroforezi izklopimo vir napetosti in gel vzamemo iz kadičke ter ga slikamo.

SLIKANJE ELEKTROFOREZNEGA GELA

Slikanje elektroforeznega gela izvedemo v komori G: BOX (SYNGENE). Gel položimo na ploščo, da je čim bolj ravno. Na računalniku izberemo program Gene Snap from Syn Gene in nastavimo nastavitve: osvetlitev (upper white), velikost slike (1,38 MPixel) in filter (Short wave band pass). Slikanje gela:

- pri osvetlitvi izberemo »Transluminator«
- pri filtrih izberemo EtBr/UV
- nastavimo čas »series captures«, kjer nastavimo želeno število slik (10) in čas osvetlitve (200 ms).

Izberemo najboljšo sliko gela ter podatke shranimo. Po končanem delu gel vzamemo iz komore in ga odvržemo v posebni odpad.

Reagenti in oprema

Reagenti:

- agarosa (Agarose for routine use, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- 1 x TAE pufer: pripravimo z 1:50 redčenjem 50 x TAE pufra (sestavine: 242,0 g Tris baze, 57,1 g očetne kisline, 100 mL 0,5M Na₂EDTA in dopolnimo do 1000 mL z ultra čisto vodo)
- SYBER[®] Safe (Invitrogen)
- označevalec dolžin (marker III), Boehringer Mannheim GmbH

- destilirana voda

Aparature in pribor:

- tehtnica Exacta 300 EB (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- erlenmajerica
- urno steklo
- merilni valj
- mikrovalovna pečica Optiquick Compact Y52, Moulinex
- polavtomatska pipeta (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipeto (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- nosilec za vlivanje gela
- glavniček za tvorbo žepkov v gelu
- kadička za elektroforezo Wide Mini Sub Cell GT (Biorad Laboratories, ZDA)
- usmernik TITAN Plus (Helena Laboratories Corp., ZDA)
- usmernik Power Pac 300 (Biorad Laboratories, ZDA)
- usmernik Power Pas Basic (Biorad Laboratories, ZDA)
- parafilm
- komora G: BOX (SYNGENE)

3.6. MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI IZOLIRANE DNA

Koncentracijo in čistost izolirane DNA smo izmerili s pomočjo UV/VIS spektrofotometrije v vseh vzorcih. Izmerili smo absorbanco pri valovni dolžini 260 in 280 nm. Koncentracijo izolirane DNA smo določili z merjenjem absorbance pri 260 nm, kjer absorbirajo nukleinske kisline. Čistost DNA smo določili iz razmerja A_{260}/A_{280} , ki mora biti od 1,7 do 1,9.

Pred merjenjem vse vzorce premešamo na vrtnčastem mešalu in nato centrifugiramo, da se vsa tekočina zbere na dnu plastične epruvete. Merjenje koncentracije in čistosti izoliranih vzorcev DNA izvedemo po priporočenih postopkih na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (41).

PRIPRAVA VZORČNIH RAZTOPIN DNA

Raztopine z izolirano DNA smo glede na koncentracije nukleinskih kislin redčili s pufrom FG 3 iz kompleta Flexigene DNA kit (Qiagen) do končnega volumna 20 μL . Nato smo t.i. delovnim raztopinam ponovno izmerili koncentracije s spektrofotometrom Nanodrop ND - 1000. Tako pripravljene delovne raztopine smo na osnovi izmerjenih koncentracij redčili do končne koncentracije 10 ng/ μL . Za redčenje smo uporabili ultračisto vodo. Končne raztopine vzorčnih DNA smo pripravili v mikrotitrskih ploščicah z 96 vdolbinicami.

Reagenti in oprema

Reagenti:

- izolirani vzorci DNA
- pufer FG3 iz reagenčnega kompleta Flexigene DNA kit (Qiagen), (Flexigene hydration pufer)
- ultračista voda

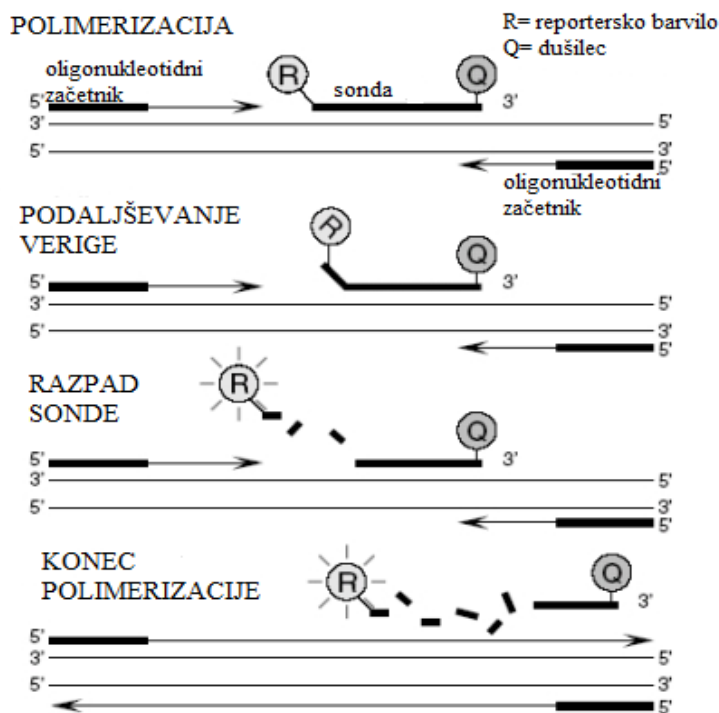
Aparature in pribor:

- polavtomatska pipeta (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- vrtnčasto mešalo – Vortex (Biosan BioVortex V1)
- spektrofotometer Nanodrop ND – 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA)
- mikrotitrne ploščice z 96 vdolbinicami (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)

3.7. GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI

PCR v realnem času je kvantitativna metoda in je nadgradnja klasičnega PCR. Metoda omogoča sočasno pomnoževanje in detekcijo. Detekcija produktov PCR temelji na merjenju fluorescence, ki jo oddajajo s fluorofoori označeni oligonukleotidi (sonde). Za genotipizacijo naših vzorcev uporabimo hidrolizirajoče sonde kjer se izkorišča 5' – eksonukleazna aktivnost Taq DNA polimeraze, ki med procesom PCR sondo razgradi. Za detekcijo signala uporabljamo dva fluorofora (donorskega in akceptorskega), katerih

ekscitacijski in emisijski spekter se prekrivata. Če sta fluorofora dovolj blizu ekscitacija donorskega barvila povzroči emisijo svetlobe, ki ekscitira akceptorsko barvilo, ki pa emitira svetlobo drugačne valovne dolžine ali v novejših izvedbah energijo odda v obliki toplote. V reakcijsko zmes damo dve sondi, ki sta izbrani tako, da je vsaka komplementarna enemu alelu. Ena sonda je označena z barvilom VIC, druga z barvilom FAM. Sonda, ki se ne prilega, se odlepi, odziv fluorescence dobimo od sonde, ki se popolnoma prilega tarčnemu odseku DNA (42, 43, 44).



Slika 4: Princip detekcije produktov PCR s hidrolizirajočimi sondami.

3.7.1. PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI

Priprava reakcijske zmesi mora potekati v čistem okolju, da se izognemo kontaminaciji. Zato smo reakcijsko zmes pripravili v delovni komori. Delovni pribor in komoro smo najprej očistili s 3 % hipokloritom in vse skupaj osvetljevali 30 minut z UV - svetlobo.

Vzorčne raztopine DNA smo do uporabe shranili v hladilniku pri $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, reagenti so bili shranjeni v zamrzovalniku pri $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred uporabo smo reagente odmrznili in jih premešali ter na kratko centrifugirali. Sonde smo zaščitili pred svetlobo z aluminijasto folijo. V delovni komori smo pripravili najprej reakcijsko zmes brez vzorčnih raztopin

DNA, jo premešali in nanegli na mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinicami. Nato smo na ploščico nanegli še vzorčno raztopino DNA in ploščico pokrili z optično folijo ter jo centrifugirali pri 2100 obratih/minuto 5 minut.

Preglednica VI: Priprava reakcijske zmesi za genotipizacijo.

Reagent	Volumen (μL) za en vzorec
Ultračista voda	2,94
Solis 5x	1,0
Sonde 40x	0,0625
Vzorec DNA (C=10 ng/μL)	1,0
Končni volumen	5

Ploščico smo nato prenesli v ciklični pomnoževalnik Light Cycler® 480 real - time PCR system, kjer se izvede pomnoževanje in detekcija produktov pri določenih pogojih, ki so opisani v Preglednici VII.

Preglednica VII: Pogoji reakcije PCR v realnem času.

Stopnja reakcije	T(°C)	Čas (min)	Število ciklov
Pre-inkubacija	95	15	1
Prileganje in podaljševanje	60	1	40
Ohlajanje	40	0,5	1



Reagenti in pribor

Reagenti:

- vzorčne raztopine DNA
- ultra čista voda
- Solis 5x (master mix, Biodyne, qPCR mix rox)
- Sonde TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), za HFE 63 (rs1799945), številka reagenta: C_1085600_10

- Sonda TaqMan[®] SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), za HFE 65 (rs 1800730), številka reagenta: C_1085599_20
- Sonda TaqMan[®] SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), za HFE 282 (rs 1800562), številka reagenta: C_1085595_10

Aparature in pribor:

- polavtomatske pipete za različne volumne (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- avtoklavirani nastavki za pipete (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- avtoklavirane plastične epruvete s pokrovčkom, 0,5 in 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinicami (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija)
- optična folija (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija)
- delovna komora z UV – lučko (UV-CLEANER, Biosan)
- mini centrifuga, vrtnčasto mešalo combiSpin FVL – 2400 N (Biosan)
- ciklični pomnoževalnik LightCycler[®] 480 real – time PCR systems (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija)
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

3.8. STATISTIČNE METODE

Statistično analizo podatkov smo izvedli s pomočjo programa SPSS/PASW Statistics 17.0. Preiskovance smo glede na diagnozo razdelili na dve skupini, in sicer skupini preiskovancev z osteoporozo in osteoartrozo.

Normalnost porazdelitve spremenljivk smo na osnovnih podatkih oziroma njihovih logaritmiranih vrednostih preverili s Kolmogorov – Smirnovim in v primeru manj kot 50 preiskovancev s Shapiro - Wilksvim testom.

Razlike v parametrih med skupinama smo preverili s t - testom in testom Mann – Whitney. Razlike smo iskali v starosti, koncentraciji železa, TIBC, feritinu, nasičenosti transferina, indeksu telesne mase (ITM), MKG na treh mestih meritve in genotipu. Skladnost skupin v frekvencah spola smo preverili s testom χ^2 . Test χ^2 smo uporabili tudi za ugotavljanje razlik v porazdelitvi genotipov med skupinama.

S koeficientom korelacije po Pearsonu smo ugotavljali **povezanost med dvema spremenljivkama**: med starostjo in železom, TIBC, feritinom, nasičenostjo transferina ter MKG na treh mestih meritve. Nadaljnje nas je zanimala še povezanost med železom, TIBC, feritinom in nasičenostjo transferina z MKG na treh mestih meritve posamezno.

Za stopnjo tveganja smo postavili $\alpha = 0,05$. V primeru $p > 0,05$ smo sprejeli ničelno hipotezo. Če je bila vrednost p manjša od stopnje tveganja smo sprejeli alternativno hipotezo.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. OPIS PREISKOVANIH SKUPIN

V raziskavo smo vključili 116 preiskovancev, ki so bili sprejeti na Oddelek za travmatologijo v Splošni bolnišnici Celje za zamenjavo kolčnega sklepa zaradi zloma vratu stegenice ali osteoartroze. V skupini preiskovancev (N = 116) je bilo 31 moških in 85 žensk, ki so bili stari od 49 do 93 let. Preiskovance smo na podlagi kliničnih podatkov razdelili v dve skupini: preiskovanci z osteoporozo (N = 83) in preiskovanci z osteoartrozo (N = 33). S t - testom in testom Mann - Whitney v primeru, da porazdelitev ni bila normalna, smo skupini med seboj primerjali glede na starost, železo, TIBC, feritin, TfS, ITM, MKG. S testom χ^2 pa smo ugotavljali razliko v frekvencah spola. V Preglednici VIII so prikazani povprečne vrednosti meritev in rezultati statistične analize (p). Vsi izmerjeni podatki so podani v Prilogi 4 do 7 po skupinah preiskovancev.

Preglednica VIII: Opis preiskovanih skupin (ITM = indeks telesne mase, MKG-TOT = mineralna kostna gostota kolka, MKG-FN = mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG-LS = mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc, TIBC = angl. total iron binding capacity, N = število preiskovancev).

	OSTEOPOROZA	OSTEOARTROZA	p
Starost (leta)	79,5 ± 7,4 (N = 83)	68,9 ± 9,5 (N = 33)	< 0,0001***
Spol (moški/ženske)	15/68 (N = 83)	16/17 (N = 33)	< 0,0001**
Železo (μmol/L)	9,0 ± 5,1 (N = 81)	4,9 ± 2,0 (N = 26)	< 0,0001*
TIBC (μmol/L)	37,2 ± 8,5 (N = 81)	43,0 ± 6,6 (N = 26)	0,002*
Feritin (μg/L)	291,8 ± 264,8 (N = 81)	212,7 ± 138,2 (N = 26)	0,137*
Nasičenost transferina (%)	25,7 ± 16,2	11,6 ± 4,8	< 0,001*

	(N = 81)	(N = 26)	
ITM (kg/m ²)	26,8 ± 4,6 (N = 73)	29,2 ± 4,9 (N = 33)	0,005***
MKG-FN (kg/m ²)	0,605 ± 0,107 (N = 56)	0,811 ± 0,174 (N = 28)	< 0,0001*
MKG-LS (kg/m ²)	0,886 ± 0,185 (N = 60)	1,009 ± 0,219 (N = 33)	0,001*
MKG-TOT (kg/m ²)	0,676 ± 0,137 (N = 56)	0,928 ± 0,202 (N = 28)	< 0,0001*

*t – test, ** test χ^2 , *** test Mann – Whitney

Rezultati primerjav so pokazali, da se skupini statistično razlikujeta po vseh parametrih, razen pri koncentraciji feritina. Skupini sta se razlikovali po starosti, ITM in MKG na vseh treh mestih meritve. Rezultati so bili pričakovani, saj se osteoporozni zlomi vratu stegenice pogosteje pojavljajo pri starejših. Osteoartroza kolčnega sklepa zaradi česar je potrebna zamenjava sklepa se pojavlja prej. Skupini sta se statistično razlikovali tudi po frekvenci spola. Število osteoporotičnih zlomov je v vseh starostnih obdobjih vsaj enkrat večje pri ženskah kakor pri moških kar vidimo iz podatka, da je v skupini osteoporoznih preiskovancev več žensk. V skupini osteoartroznih preiskovancev je število žensk in moških izenačeno. Osteoartroza prizadene oba spola, vendar naj bi se pogosteje pojavljala pri moških v širokem starostnem obdobju. Povprečna vrednost ITM je bila pri osteoporoznih preiskovancih nižja, saj so posamezniki z osteoporozo lažji od osteoartrotičnih posameznikov. Telesna teža je tudi eden izmed dejavnikov tveganja za razvoj osteoartroze. MKG na vseh treh mestih merjenja je bila višja pri skupini osteoartroznih preiskovancev (3).

Statistični rezultati so pokazali razliko med skupinama v koncentraciji železa, TIBC in TfS. Koncentracija železa je bila v skupini preiskovancev z osteoatrozo nižja. V telesu se železo zniža ob prisotnosti akutnih in kroničnih vnetnih procesih. Pri osteoartrozi je prisotno vnetje sinovije zaradi razgradnje hrustanca, kar lahko povežemo z našimi rezultati. Prisotnost vnetnega procesa bi lahko preverili z določanjem sedimentacije eritrocitov (SR) in C - reaktivnim proteinom (CRP), vendar parametra nismo vključili v našo raziskavo. Številne študije so dokazale povezanost med nastankom in prisotnostjo

osteartroze z zvišano koncentracijo CRP (27). Višje vrednosti TIBC pri osteoartroznih preiskovancih so verjetno posledica nižjih vrednosti železa. Gre za kompenzacijo, da telo zagotovi zadostno količino vezavnih mest za železo in se uporabi vso železo, ki je telesu na razpolago. Preiskovanci z osteoporozo imajo nižje vrednosti TIBC. Pri obeh skupinah pa so povprečne vrednosti za železo (10,7 - 28,6 $\mu\text{mol/L}$) in TIBC pod referenčnim območjem (49,2 – 75,2 $\mu\text{mol/L}$). Povprečna vrednost za TfS je višja pri skupini z osteoporozo (je pa v okviru referenčne vrednosti), saj imajo tudi višje vrednosti železa. Pri skupini z osteoartrozo je povprečna vrednost za TfS pod referenčnim območjem (15 - 45 %). Znižana TfS je posledica pomanjkanja zalog železa in ker tkiva ne dobijo potrebno železo se kompenzatorno poveča sinteza transferina. Znižane vrednosti TfS kažejo na pomanjkanje transportnega železa v telesu.

4.2. PRIMERJAVA BIOKEMIČNIH PARAMETROV MED SKUPINAMA PREISKOVANCEV GLEDE NA SPOL

Rezultati statistične analize so nam pokazali, da skupini nista uravnoteženi po spolu. Zato smo med seboj primerjali biokemične parametre glede na spol in skupino preiskovancev. V Preglednici IX so podane povprečne vrednosti meritev za posamezen parameter in statistični rezultati (p). Za primerjavo biokemičnih parametrov glede na spol v posamezni skupini smo uporabili t - test za parametre, ki so se normalno porazdeljevali in test Mann - Whitney za nenormalno porazdelitev.

Preglednica IX: Povprečne vrednosti biokemičnih parametrov glede na spol in skupino preiskovancev (Ž = ženske, M = moški, TIBC = angl. total iron binding capacity).

	Spol	OSTEOPOROZA	OSTEOARTROZA	p
Starost (leta)	M	76,1 $\pm$ 8,8	68,1 $\pm$ 8,4	0,020*
	Ž	79,9 $\pm$ 7,2	69,71 $\pm$ 10,5	<0,0001**
Železo ($\mu\text{mol/L}$)	M	10,3 $\pm$ 8,2	4,7 $\pm$ 1,7	0,016*
	Ž	8,8 $\pm$ 4,4	5,2 $\pm$ 2,3	0,004**
TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	M	36,7 $\pm$ 8,0	43,7 $\pm$ 6,0	0,012*
	Ž	37,3 $\pm$ 8,7	42,4 $\pm$ 7,2	0,060*

Feritin ($\mu\text{g/L}$)	M	$404,6 \pm 334,1$	$188,5 \pm 85,9$	0,031*
	Ž	$270,2 \pm 246,6$	$236,9 \pm 176,4$	0,539*
Nasičenost transferina(%)	M	$27,9 \pm 16,2$	$10,8 \pm 3,6$	0,002*
	Ž	$25,3 \pm 15,0$	$12,4 \pm 5,8$	0,001*

*t –test, ** test Mann – Whitney

Statistično značilne razlike smo zaznali pri vseh parametrih, razen pri feritinu med preiskovankami. Moški so bili v obeh skupinah preiskovancev v povprečju mlajši od žensk.

Povprečne vrednosti za železo so pri obeh skupinah preiskovancev pod referenčnim območjem ($10,7 - 28,6 \mu\text{mol/L}$), ki velja za odraslo zdravo populacijo. Če upoštevamo referenčne vrednosti za ženske in moške iz Preglednice II, ki so podane glede na starost, so preiskovanci z osteoporozo (moški in ženske) v referenčnem območju (ženske > 60 let: $7,0 - 26,7 \mu\text{mol/L}$ in moški > 60 let: $7,2 - 21,5 \mu\text{mol/L}$). Preiskovanci z osteoartrito imajo povprečne vrednosti za železo pod referenčnim območjem za starostno skupino nad 60 let. Statistična analiza podatkov je pokazala, da se moški preiskovanci med seboj razlikujejo v koncentracijah feritina, medtem ko med preiskovankami ni razlik. Povprečne vrednosti feritina pri moških in ženskah v skupini z osteoporozo so nad referenčnim območjem (moški: $15 - 200 \mu\text{g/L}$ in ženske: $12 - 150 \mu\text{g/L}$), ki so podane za odraslo zdravo populacijo. V skupini preiskovancev z osteoartrito imajo samo preiskovanke povprečje feritina zvišano. Če pa upoštevamo referenčno območje za feritin glede na starostno obdobje (Preglednica III) so povprečne vrednosti vseh preiskovancev v podanem območju (ženske $65 - 90$ let: $13 - 651 \mu\text{g/L}$, moški $65 - 87$ let: $4 - 665 \mu\text{g/L}$). Koncentracija feritina v krvi predstavlja količino železa v tkivih. Zvišane vrednosti v serumu so lahko posledica kopičenja železa ali drugih bolezni (jetrne bolezni, revmatoidni artritis, srčne bolezni, maligna obolenja). V starosti pride do kopičenja železa, saj telo nima mehanizma, ki bi odstranjeval odvečno železo. Znano je, da koncentracija serumskega feritina hitro naraste pri ženskah po menopavzi. Ženske po menopavzi tudi pogosto zbolijo za pomenopavzno osteoporozo. Ob tem se postavlja hipoteza, da s starostjo povezano kopičenje železa v kostnem tkivu pri pomenopavznih ženskah lahko igra pomembno vlogo pri patogenezi osteoporoze, kar je pa potrebno še podrobno raziskati (45). Do zvišanih koncentracij feritina in/ali TfS vodi tudi uživanje alkohola, ki zmanjša izražanje hepcidina v jetrih in poveča absorpcijo železa iz hrane (11).

4.3. UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI MED STAROSTJO IN BIOKEMIČNIMI PARAMETRI TER MINERALNO KOSTNO GOSTOTO

S testom korelacije smo želeli ugotoviti moč linearne povezave med dvema spremenljivkama. Ker so se naše spremenljivke normalno porazdeljevale, smo uporabili test korelacije po Pearsonu (Preglednica X).

Preglednica X: Korelacija med starostjo in biokemičnimi parametri ter mineralno kostno gostoto glede na skupino preiskovancev (MKG-TOT = mineralna kostna gostota kolka, MKG-FN = mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG-LS = mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc, TIBC = angl. total iron binding capacity).

Spremenljivka1	Spremenljivka 2	OSTEOPOROZA		OSTEOARTROZA	
		Pearsonov koeficient (r)	p	Pearsonov koeficient (r)	p
Starost (leta)	Železo ($\mu\text{mol/L}$)	0,308	0,005	0,267	0,188
	TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	-0,077	0,495	-0,128	0,532
	Feritin ($\mu\text{g/L}$)	-0,016	0,884	-0,204	0,317
	Nasičenost transferina (%)	0,321	0,003	0,346	0,084
	MKG-FN (kg/m^2)	-0,401	0,002	-0,159	0,419
	MKG-LS (kg/m^2)	-0,018	0,891	0,132	0,465
	MKG-TOT (kg/m^2)	-0,411	0,002	-0,275	0,156

Statistično značilno povezavo med spremenljivkama smo zaznali le pri skupini preiskovancev z osteoporozo, in sicer pozitivno korelacijo med starostjo in koncentracijo železa ($r = 0,308$, $p = 0,005$) ter TfS ($r = 0,321$, $p = 0,003$). Negativna korelacija pa se je pokazala med starostjo in mineralno kostno gostoto na dveh mestih meritve: MKG-FN ($r = -0,401$, $p = 0,002$) in MKG-TOT ($r = -0,411$, $p = 0,002$). Rezultati niso presenetljivi, saj se MKG znižuje s starostjo in preiskovanci z osteoporozo so prestali zamenjavo kolčnega sklepa. Korelacije med starostjo in MKG pri skupini preiskovancev z osteoartrozo nismo našli, saj za to bolezen ni značilno zmanjšanje kostne mase.

4.4. UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI MED BIOKEMIČNIMI PARAMETRI IN MINERALNO KOSTNO GOSTOTO

V nadaljevanju nas je zanimalo, če železo, TIBC, feritin in TfS korelirajo z mineralno kostno gostoto kar je prikazano v Preglednici XI. V ta namen smo uporabili test korelacije po Pearsonu.

Preglednica XI: Korelacija med železom, TIBC, feritinom, nasičenostjo transferina in mineralno kostno gostoto (MKG-TOT = mineralna kostna gostota kolka, MKG-FN = mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG-LS = mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc, TIBC = angl. total iron binding capacity).

Spremenljivka 1	Spremenljivka 2	OSTEOPOROZA		OSTEOARTROZA	
		Pearsonov koeficient(r)	p	Pearsonov koeficient(r)	p
Železo (μmol/L)	MKG-FN (kg/m ²)	0,020	0,882	-0,540	0,011
	MKG-LS (kg/m ²)	0,176	0,181	-0,351	0,079
	MKG-TOT (kg/m ²)	0,007	0,958	-0,494	0,023
TIBC (μmol/L)	MKG-FN (kg/m ²)	0,424	0,001	-0,189	0,413
	MKG-LS (kg/m ²)	0,278	0,033	-0,168	0,413
	MKG-TOT (kg/m ²)	0,277	0,041	-0,149	0,519
Feritin (μg/L)	MKG-FN (kg/m ²)	-0,243	0,074	0,127	0,536
	MKG-LS (kg/m ²)	-0,144	0,278	-0,004	0,987
	MKG-TOT (kg/m ²)	-0,184	0,179	0,138	0,551
Nasičenost transferina (%)	MKG-FN (kg/m ²)	-0,121	0,380	-0,458	0,037
	MKG-LS (kg/m ²)	0,700	0,600	-0,258	0,203
	MKG-TOT (kg/m ²)	-0,086	0,532	-0,463	0,350

Korelacije med koncentracijo železa in MKG na treh mestih meritve pri skupini preiskovancev z osteoporozo nismo ugotovili. Valenti in sodelavci so v raziskavi v katero so vključili 87 pacientov s HH ugotovili povezavo med kopičenjem železa in znižanjem MKG-LS. Za oceno železa v telesu so preiskovancem izmerili koncentracijo feritina v

serumu, izračunali TfS ter opravili biopsijo jeter, vendar niso ugotovili povezave z železom (31). Zanimivi so rezultati statistične analize pri skupini preiskovancev z osteoartrozo, in sicer negativna korelacija med železom in MKG. Statistično značilno povezavo smo ugotovili med železom in MKG-FN ($r = -0,540$, $p = 0,011$) in MKG-TOT ($r = -0,494$, $p = 0,023$). Skupina z osteoartrozo ima nižje vrednosti železa in povezavo z MKG lahko razložimo, da tudi zmanjšane količine železa lahko vpliva na presnovo, saj železo sodeluje kot kofaktor encimov, ki sodelujejo pri sintezi kosti, v 25 OH vitamin D hidroksilazi, pri aktivaciji vitamina D in absorpciji kalcija (46). Pomanjkanje železa iz hrane zmanjšuje serumske koncentracije 1,25 dihidroksikalciferola, inzulinu podobnega rastnega dejavnika (IGF) I in osteokalcina in izločanje urinskega deoksipiridolina, kar so dokazali na živalih Katsumata in sodelavci (47).

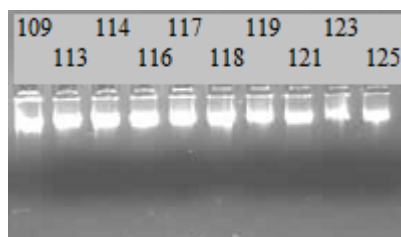
Korelacija med TIBC in MKG na treh mestih meritve pri preiskovancih z osteoporozo je pozitivna in statistično značilna. V skupini z osteoporozo je bilo 68 pomenopavznih žensk in so bile stare od 57 do 93 let. Pomenopavzna osteoporozo je okarakterizirana z porušenim ravnotežjem med kostno resorpcijo in tvorbo. Za pomenopavzo je značilno zmanjšanje spolnih hormonov. Yang in sodelavci so v *in vitro* raziskavi na kultiviranih mišjih celicah testirali hipotezo ali kopičenje železa ob zmanjšanju estrogena povzroča pomenopavzno osteoporozo. Ugotovili so, da lahko anorgansko železo, proteina transferin in feritin inhibirajo aktivnost ALP v osteoblastih in s tem zavirajo kostno tvorbo (48). Povezavo med MKG in transferinom bi bilo potrebno podrobneje raziskati. Zanimiv je obraten trend negativne korelacije med TIBC in MKG, ki se je pokazala pri preiskovancih z osteoartrozo, vendar povezava ni bila statistično značilna.

Korelacija med feritinom in MKG na treh mestih meritve pri skupini preiskovancev z osteoporozo je bila negativna, vendar ne statistično značilna. Prav tako pri skupini preiskovancev z osteoartrozo ni korelacije med feritinom in MKG. Prav tako ni statistično značilne korelacije med TfS in MKG-LS in MKG-TOT. Enako so ugotovili Guggenbuhl in sodelavci v raziskavi, kjer so vključili samo moške preiskovance s HH, ki pa so bili mlajši (povprečna starost $47,2 \pm 9,4$ let) (34). Statistično značilno korelacijo smo določili med TfS in MKG-FN ($r = -0,458$, $p = 0,037$) pri preiskovancih z osteoartrozo.

4.5. IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Ker je bil eden naših ciljev genotipizacija, smo izvedli izolacijo genomske DNA iz 102 vzorcev polne krvi večjih volumnov z reagenčnim kompletom Flexigene DNA kit. Postopek izolacije smo izvajali po navodilih proizvajalca, vendar se po opisanem postopku levkocitna peletka ni oblikovala. Obstajala je možnost, da postopek izolacije ne bo uspešen in iz vzorcev ne bomo pridobili DNA, ki bi jo uporabili za genotipizacijo. Zato smo s preizkušanjem vzorcev, ki jih nismo uporabili v naši raziskavi, postopek optimirali. Kot priporoča proizvajalec, smo v ta namen povečali centrifugalni pospešek in podaljšali čas centrifugiranja za določen volumen polne krvi. Po optimiranju postopka je bila izolacija uspešna pri vseh vzorcih.

Uspešnost izolacije DNA vseh vzorcev smo preverili z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu. Zanimala nas je fragmentiranost izolatov DNA, ki smo jih obarvali s fluorescenčnim barvilom SYBER[®] Safe in jih detektirali v obliki lis na gelu (Slika 5).



Slika 5: Elektroforeza izoliranih vzorcev DNA na 2 % agaroznem gelu.

Pri vseh vzorcih so lise dobro vidne in zbite, kar kaže, da DNA ni fragmentirana in je bila izolacija uspešna. Intenziteta lise nam pove kolikšna je količina DNA.

Za genotipizacijo potrebujemo zadostno količino DNA, ki mora biti ustrezne kvalitete. Koncentracijo in čistost izoliranih vzorcev smo določili s pomočjo spektrofotometra. Na osnovi razmerja med absorbanco pri $\lambda = 260$ in $\lambda = 280$ nm smo ocenili čistost izolata za katero je priporočljivo območje 1,7 - 1,9 (39). Rezultati izolacije so zbrani v Prilogi 1. Dva vzorca (št. vzorca 187, 330) nista ustrezala priporočilom za čistost izolata, vendar smo se odločili vse vzorce uporabiti za genotipizacijo.

4.6. UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI MUTACIJ V GENU *HFE*

Za ugotavljanje pogostosti mutacij v genu *HFE* smo uporabili vse vzorce (N = 102) iz katerih smo uspešno izolirali genomsko DNA. Genotipizacijo smo izvedli s pomočjo hidrolizirajočih sond Taqman®. V genu *HFE* smo ugotavljali prisotnost treh mutacij, in sicer C282Y, H63D in S65C.

Vse vzorce smo predhodno redčili na koncentracijo 10 ng/μL, ki je optimalna koncentracija DNA za izvedbo genotipizacije. Sestava reakcijske zmesi za genotipizacijo in pogoji za PCR v realnem čas so bili že predhodno določeni in jih ni bilo potrebno optimirati. Pri treh vzorcih je bila reakcija PCR neuspešna. Po vsej verjetnosti je bila koncentracija DNA v vzorčni raztopini nizka ali je prišlo do napake pri pipetiranju vzorcev. Za te vzorce smo PCR ponovili pri spremenjenih pogojih, in sicer povečali smo volumen dodane vzorčne raztopine z DNA. Po tem je bila reakcija PCR uspešna.

V celotni skupini preiskovancev smo za mutacijo C282Y določili 95 (93,1 %) normalnih homozigotov, 7 (6,7 %) heterozigotov in nobenega mutiranega homozigota. Za mutacijo S65C smo določili 100 (98,0 %) normalnih homozigotov in 2 (2 %) heterozigota ter nobenega mutiranega homozigota. Pri mutaciji H63D smo določili 72 (70,6 %) normalnih homozigotov, 27 (26,5%) heterozigotov in 3 (2,9 %) mutiranih homozigotov. Preglednica XII prikazuje frekvence genotipov v preiskovanih skupinah.

Preglednica XII: Frekvence (%) posameznih genotipov v genu *HFE* v preiskovanih skupinah (N = število preiskovancev).

	GENOTIP	C282Y (%)	S65C (%)	H63D (%)
Osteoporoza (N = 69)	Normalni homozigoti	95,7 (N = 66)	97,1 (N = 67)	69,6 (N = 48)
	Heterozigoti	4,3 (N = 3)	2,9 (N = 2)	27,5 (N = 19)
	Mutirani homozigoti	/	/	2,9 (N = 2)
Osteoartroza (N = 33)	Normalni homozigoti	87,9 (N = 29)	100 (N = 33)	72,7 (N = 24)
	Heterozigoti	12,1 (N = 4)	/	24,2 (N = 8)
	Mutirani homozigoti	/	/	3,0 (N = 1)

S testom χ^2 nismo dokazali statistično značilne razlike med opazovano genotipsko frekvenco, ki smo jo dobili pri eksperimentalnem delu, in pričakovano gensko frekvenco, ki smo jo izračunali po Hardy – Weinbergovem načelu. Načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja. Načelo velja za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer se osebki naključno razmnožujejo, ni selekcije vzorcev, dodatnih mutacij in migracij (49). Pri mutaciji S65C v skupini preiskovancev z osteoartrozo opazovane in pričakovane frekvence niso v skladu z Hardy – Weinbergovem načelom, saj smo določili le normalne homozigote. Za ostale preučevane mutacije lahko zaključimo, da se porazdeljujejo v skladu s Hardy - Weinbergovim ravnotežjem. Za celotno skupino preiskovancev smo izračunali še frekvenco mutiranega alela, ki je za mutacijo C282Y 3,4 %, za mutacijo H63D 27,9 % ter za mutacijo S65C 1,0 %. Število alelov in alelne frekvence za posamezne genotipe so prikazane v Preglednici XIII.

Preglednica XIII: Število alelov in alelne frekvence v preiskovanih skupinah.

C282Y	OSTEOPOROZA		OSTEOARTROZA	
Alel	Število alelov	Alelna frekvenca (%)	Število alelov	Alelna frekvenca
C	135	97,8	62	93,9
Y	3	2,2	4	6,1
skupaj	138	100	66	100
S65C	Število alelov	Alelna frekvenca (%)	Število alelov	Alelna frekvenca (%)
S	136	98,5	66	100
C	2	1,5	0	0
skupaj	138	100	66	100
H63D	Število alelov	Alelna frekvenca (%)	Število alelov	Alelna frekvenca (%)
H	115	83,3	56	84,8
D	23	16,7	10	15,2
skupaj	138	100	66	100

S testom χ^2 smo preverili ali je med skupinama preiskovancev razlika v alelnih frekvencah. Rezultati statistične analize so pokazali, da med skupinama preiskovancev ni razlik v alelnih frekvencah.

V raziskavi, ki so jo izvedli na slovenski populaciji so določili podobne frekvence genotipov. V raziskavo so vključili 1282 zdravih, naključno izbranih preiskovancev iz vseh regij Slovenije. Vključili so tudi kontrolno pozitivno skupino z 21 preiskovanci, ki so imeli potrjeno HH. V raziskavi je bilo 934 moških (povprečna starost $40,4 \pm 10$ let) in 384 žensk (povprečna starost $39,7 \pm 9,6$ let) (22). Za mutacijo C282Y so določili 92,9 % normalnih homozigotov, 6,9 % heterozigotov in 0,16 % mutiranih homozigotov. Za mutacijo S65C so določili 96,3 % normalnih homozigotov, 3,7 % heterozigotov in nobenega mutiranega homozigota. Za mutacijo H63D so določili 76,8 % normalnih homozigotov, 20,9 % heterizogotov in 2,3 % mutiranih homozigotov.

Za hereditarno hemokromatozo zbolevajo homozigoti C282Y/C282Y in sestavljeni heterozigoti z bialelno mutacijo C282Y/H63D ali C282Y/S65C. V naši skupini preiskovancev smo določili enega preiskovanca (št. vzorca 318) z bialelno mutacijo C282Y/H63D iz skupine z osteoartrozo in nobenega primera s homozigotno mutacijo C282Y/C282Y. Preiskovancu z bialelno mutacijo C282Y/H63D smo določili koncentracijo železa $4,10 \mu\text{mol/L}$ in feritina $192 \mu\text{g/L}$ ter TfS 7,80 %. Glede na izmerjene koncentracije ne moremo potrditi, da ima HH. Trem preiskovancem smo določili genotip H63D/H63D (št. vzorcev 107, 109 in 309) in tudi pri njih nismo določili zvišanih koncentracij železa, feritina in TfS. V raziskavi, ki so jo izvedli Sham in sodelavci (50) so ugotavljali povezavo med genotipsko in fenotipsko izraženo HH. V raziskavo so vključili 61 pacientov, ki so imeli diagnosticirano HH. Ugotovili so, da se lahko kopičenje železa pojavi tudi v odsotnosti homozigotne mutacije C282Y in je posledica mutacije v drugem genu, ki sodeluje pri homeostazi železa. Raziskava tudi dokazuje, da lahko pri posameznikih obstajajo genotipske in fenotipske razlike. Fenotipsko izražanje bolezni je različno in nekateri oboleli za HH nimajo genotipskih značilnosti (50). Povezavo med mutacijo v genu *HFE* in tveganjem za zamenjavo kolka ali kolena zaradi osteoartroze so ugotavljali Yuanyuan in sodelavci. V raziskavi so med seboj primerjali skupino preiskovancev z mutacijo C282Y in skupino preiskovancev brez mutacije. Ugotovili so, da imajo posamezniki z mutacijo C282Y večje tveganje za zamenjavo enega ali obeh kolčnih sklepov. Pri sestavljenih heterozigotih C282Y/H63D niso ugotovili povečanega tveganja za zamenjavo kolka ali kolena (51).

4.6.1. UGOTAVLJANJE RAZLIK V PORAZDELITVI GENOTIPOV MED SKUPINAMA PREISKOVANCEV

Za ugotavljanje razlik v porazdelitvi genotipov med skupinama preiskovancev smo uporabili test χ^2 . Ugotovljene in pričakovane vrednosti ter rezultati statistične analize (p) so prikazane v Preglednici XIV.

Preglednica XIV: Ugotovljene in pričakovane vrednosti genotipov v preiskovanih skupinah (1 = normalni homozigoti, 2 = heterozigoti, 3 = mutirani homozigoti).

Genotip C282Y		1	2	3	N	p
OSTEOPOROZA	ugotovljena vrednost	66	3	/	69	0,301
	pričakovana vrednost	64,3	4,7	/		
OSTEOARTROZA	ugotovljena vrednost	29	4	/	33	
	pričakovana vrednost	30,7	2,3	/		
Genotip S65C						
OSTEOPOROZA	ugotovljena vrednost	67	2	/	69	0,822
	pričakovana vrednost	67,6	1,4	/		
OSTEOARTROZA	ugotovljena vrednost	33	0	/	33	
	pričakovana vrednost	32,4	0,6	/		
Genotip H63D						
OSTEOPOROZA	ugotovljena vrednost	48	19	2	69	0,940
	pričakovana vrednost	48,7	18,3	2,0		
OSTEOARTROZA	ugotovljena vrednost	24	8	1	33	
	pričakovana vrednost	23,3	8,7	1,0		

Rezultati statistične analize so pokazali, da med skupinama ni razlik v porazdelitvi genotipov. Pri genotipu C282Y in S65C smo pri izračunu upoštevali Yatesovo korekcijo.

4.7. UGOTAVLJANJE POVEZANOSTI GENOTIPOV Z BIOKEMIČNIMI PARAMETRI

Za HH je značilno kopičenje železa v telesu, kar odkrijemo z določanjem koncentracije za železo, TIBC, feritin in izračunom TfS v serumu. Posamezniki, ki so mutirani homozigoti ali heterozigoti naj bi imeli višje vrednosti izmerjenih parametrov zaradi mutacije v genu *HFE*. Zato nas je zanimalo, ali obstaja med genotipskimi podskupinami statistično značilna razlika v vrednostih za železo, TIBC, feritin in TfS. Na ta način in s statistično analizo najbolje ocenimo vpliv mutacije. Statistično analizo smo izvedli s t - testom v primeru normalne porazdelitve parametrov in testom Mann - Whitney, če se parameter ni porazdeljeval normalno. Ker je frekvenca mutiranih homozigotov v primeru mutacije H63D nizka, smo združili podskupini heterozigotov in mutiranih homozigotov. V Preglednicah XV do XVII so prikazane povprečne vrednosti biokemičnih parametrov glede na genotip in skupino preiskovancev ter rezultati statistične analize (p).

Preglednica XV: Povprečne vrednosti za železo, TIBC (angl. total iron binding capacity), feritin in nasičenost transferina za mutacijo C282Y (1 = normalni homozigoti, 2 = heterozigoti, N = število preiskovancev).

	Genotip	Železo ($\mu\text{mol/L}$)	TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	Feritin ($\mu\text{g/L}$)	Nasičenost transferina (%)
Osteoporoza	1 (N = 63)	$8,6 \pm 4,8$	$36,6 \pm 8,8$	$303,2 \pm 284,5$	$26,4 \pm 16,3$
	2 (N = 3)	$6,7 \pm 1,1$	$36,2 \pm 15,9$	$291,0 \pm 330,2$	$21,6 \pm 10,9$
	p	0,722*	0,903*	0,513*	0,844*
Osteoartroza	1 (N = 29)	$4,9 \pm 1,2$	$45,1 \pm 5,7$	$216,8 \pm 143,1$	$11,7 \pm 4,9$
	2 (N = 4)	$5,9 \pm 2,5$	$54,9 \pm 3,3$	$164,5 \pm 38,9$	$10,6 \pm 3,9$
	p	0,517*	0,005*	0,866*	0,756*

*t – test

Preglednica XVI: Povprečne vrednosti za železo, TIBC (angl. total iron binding capacity), feritin in nasičenost transferina za mutacijo H63D (1 = normalni homozigot, 2 = heterozigot + mutiran homozigot, N = število preiskovancev).

	Genotip	Železo ($\mu\text{mol/L}$)	TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	Feritin ($\mu\text{g/L}$)	Nasičenost transferina (%)
Osteoporoza	1(N = 48)	$8,1 \pm 4,7$	$36,1 \pm 8,9$	$330,5 \pm 331,1$	$23,9 \pm 15,6$
	2 (N = 21)	$9,8 \pm 4,7$	$38,1 \pm 9,2$	$249,4 \pm 151,4$	$27,6 \pm 17,0$
	p	0,084**	0,393*	0,577*	0,372*
Osteoartroza	1 (N = 24)	$4,9 \pm 2,2$	$42,8 \pm 6,7$	$239,6 \pm 149,1$	$11,6 \pm 4,6$
	2 (N = 9)	$4,9 \pm 1,6$	$43,8 \pm 6,7$	$139,9 \pm 66,3$	$11,7 \pm 5,6$
	p	0,911*	0,738*	0,117*	0,931*

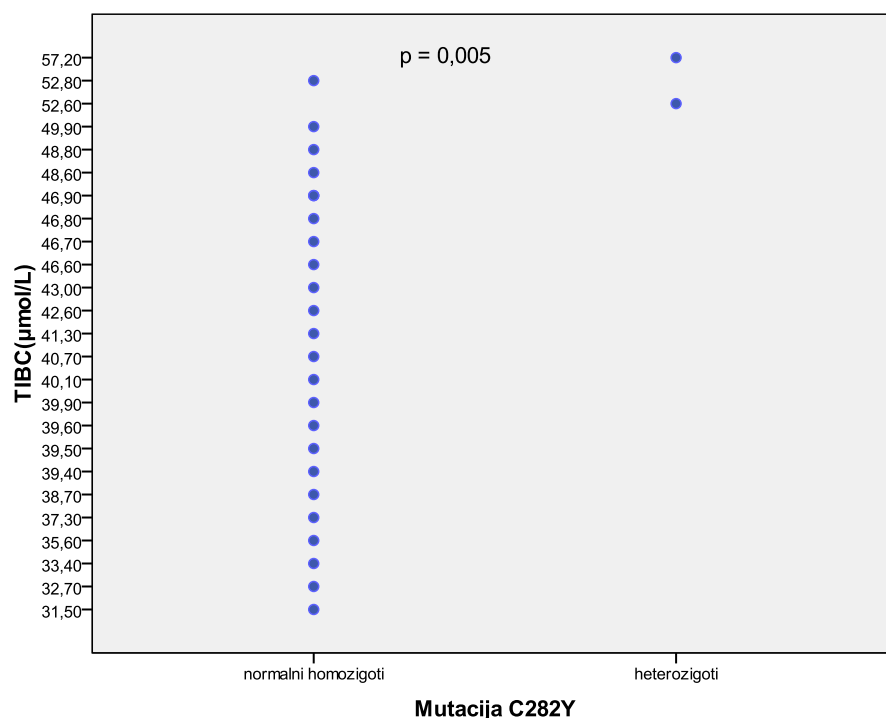
*t – test, **Mann – Whitney test

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti za železo, TIBC (angl. total iron binding capacity), feritin in nasičenost transferina za mutacijo S65C (1 = normalni homozigot, 2 = heterozigot, N = število preiskovancev).

	Genotip	Železo ($\mu\text{mol/L}$)	TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	Feritin ($\mu\text{g/L}$)	Nasičenost transferina (%)
Osteoporoza	1 (N = 67)	$8,7 \pm 4,8$	$36,9 \pm 9,1$	$305,7 \pm 287,5$	$25,3 \pm 16,2$
	2 (N = 2)	$6,8 \pm 2,9$	$31,9 \pm 3,8$	$204,0 \pm 84,9$	$21,9 \pm 11,7$
	p	0,702*	0,432*	0,777*	0,933*

*t - test

Pri mutaciji S65C v skupini preiskovancev z osteoatrozo smo določili le normalne homozigote, zato smo skupino izločili iz statistične analize. Statistično značilno razliko med normalnimi homozigoti in heterozigoti smo določili le v primeru genotipa C282Y (obraten vpliv, kot smo ga pričakovali) pri TIBC v skupini preiskovancev z osteoartrozo. V tem primeru smo izdelali razsevni diagram, ki prikazuje porazdelitev rezultatov med normalnimi homozigoti in heterozigoti (Slika 6).



Slika 6: Porazdelitev vrednosti TIBC med normalnimi homozigoti in heterozigoti pri genotipu C282Y.

Pričakovali smo višje vrednosti biokemičnih parametrov v skupini 2 (heterozigoti in mutirani homozigoti) pri vseh genotipih. Prisotnost mutacije v genu *HFE* povzroča povečano absorpcijo železa, kar posledično vpliva na nivo železa v telesu, ki ga lahko ocenimo s biokemičnimi parametri. Serumski feritin je lahko zvišan ali znižan pri moških in ženskah s homozigotno mutacijo C282Y ter meritev je dokaj nespecifična. Zvišane koncentracije se pojavijo ob vnetjih, jetrnih boleznih in znižane vrednosti ob krvavitvah in malabsorpcijah. Določanje serumskega feritina naj bi bil indirektna meritev za shranjeno železo v telesu (52). Da bi določili vpliv mutacije na omenjene parametre in razliko med homozigotnimi in heterozigotnimi oblikami mutacije, bi bilo potrebno v raziskavo vključiti večje število preiskovancev.

4.8. VPLIV GENOTIPA NA MINERALNO KOSTNO GOSTOTO

Vpliv genotipa na MKG smo ugotavljali pri obeh skupinah preiskovancev s t – testom. V Preglednicah XVIII do XIX so podane povprečne vrednosti za MKG na treh mestih meritve in rezultati statistične analize (p). V statistično analizo smo vključili genotip

C282Y in H63D pri obeh skupinah preiskovancev. Pri genotipu H63D smo združili podskupino mutiranih homozigotov s heterozigoti zaradi nizke frekvence. Genotip S65C smo izključili iz statistične analize zaradi zelo nizke frekvence heterozigotov.

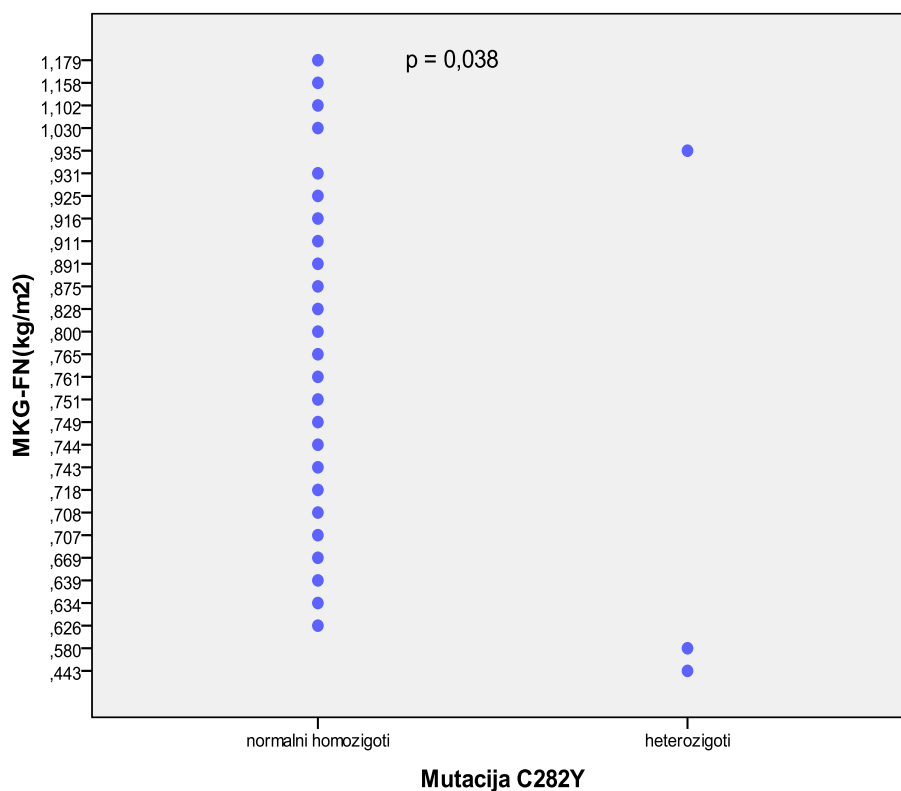
Preglednica XVIII: Vpliv genotipa C282Y na mineralno kostno gostoto (MKG-TOT = mineralna kostna gostota kolka, MKG-FN = mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG-LS = mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc, 1 = normalni homozigot, 2 = heterozigot, N = število preiskovancev).

	Genotip	MKG-FN (kg/m ²)	MKG-LS (kg/m ²)	MKG-TOT (kg/m ²)
Osteoporoza	1 (N = 47)	0,606 ± 0,11	0,897 ± 0,19	0,684 ± 0,14
	2 (N = 2)	0,624 ± 0,03	0,931 ± 0,72	0,709 ± 0,10
	p	0,820	0,808	0,812
Osteoartroza	1 (N = 25)	0,830 ± 0,16	1,036 ± 0,20	0,954 ± 0,18
	2 (N = 3)	0,653 ± 0,25	0,816 ± 0,30	0,713 ± 0,29
	p	0,038	0,058	0,049

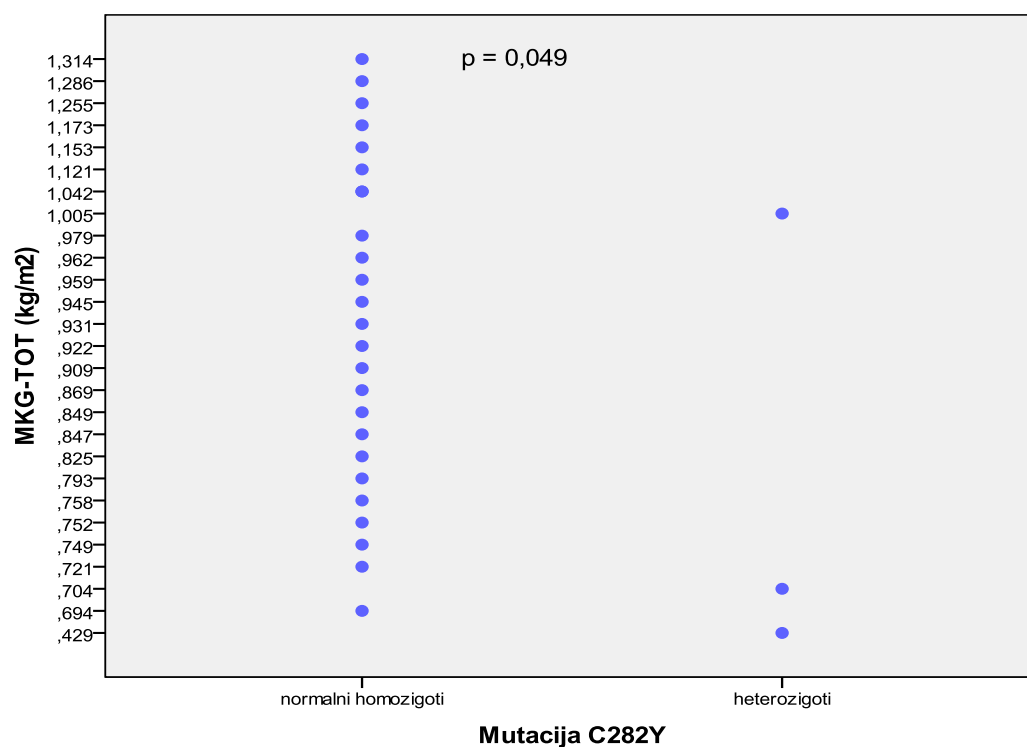
Preglednica XIX: Vpliv genotipa H63D na mineralno kostno gostoto (MKG-TOT = mineralna kostna gostota kolka, MKG-FN = mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG-LS = mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc, 1 = normalni homozigot, 2 = heterozigot + mutirani homozigoti, N = število preiskovancev).

	genotip	MKG-FN (kg/m ²)	MKG-LS (kg/m ²)	MKG-TOT (kg/m ²)
osteoporoza	1 (N = 30)	0,605 ± 0,11	0,881 ± 0,22	0,669 ± 0,14
	2 (N = 19)	0,608 ± 0,11	0,928 ± 0,13	0,709 ± 0,15
	p	0,938	0,409	0,390
osteoartroza	1 (N = 21)	0,797 ± 0,18	1,006 ± 0,24	0,918 ± 0,21
	2 (N = 7)	0,854 ± 0,16	1,020 ± 0,15	0,958 ± 0,21
	p	0,469	0,870	0,662

Rezultati statistične analize so pokazali statistično značilni vpliv genotipa C282Y na MKG-FN ($p = 0,038$) in MKG-TOT ($p = 0,049$) pri preiskovancih z osteoartrozo pri heterozigotih. Povprečne vrednosti za MKG so bile pri heterozigotih nižje kakor pri homozigotih (Slika 7 in 8). Pri genotipu C282Y smo v tej skupini določili le 3 heterozigotne preiskovance in na podlagi tega ne moremo vleči zaključkov, zato bi bilo potrebno vpliv mutacije na MKG preveriti na večjem številu preiskovancev.



Slika 7: Porazdelitev vrednosti MKG-FN (kg/m^2) med normalnimi homozigoti in heterozigoti pri genotipu C282Y.



Slika 8: Porazdelitev vrednosti MKG-TOT (kg/m²) med normalnimi homozigoti in heterozigoti pri genotipu C282Y.

Pri skupini preiskovancev z osteoporozo nismo določili vpliva genotipa C282Y na MKG. Pri genotipu H63D prav tako nismo ugotovili razlik v MKG med normalnimi homozigoti in heterozigoti ter mutiranimi homozigoti.

5. SKLEP

V magistrski nalogi smo ugotavljali preskrbo z železom pri skupini preiskovancev z osteoporozo in osteoartrozo z merjenjem koncentracije železa, TIBC, feritina in TfS v serumu ter povezanost z MKG. V nadaljevanju smo pri vseh preiskovancih ugotavljali pogostost mutacij C282Y, H63D in S65C v genu *HFE* ter vpliv genotipa na MKG. Našo raziskavo zaključujemo z naslednjimi sklepi:

- Preiskovanci z osteoporozo so imeli v primerjavi z preiskovanci z osteoartrozo višje koncentracije železa, feritina in TfS.
- V skupini preiskovancev z osteoporozo smo dokazali pozitivno korelacijo med TIBC in MKG na treh mestih meritve. Pri skupini preiskovancev z osteoartrozo pa smo dokazali negativno povezavo med železom in MKG-FN ($r = -0,540$, $p = 0,011$) ter MKG-TOT ($r = -0,494$, $p = 0,023$). Dokazali smo tudi negativno povezavo med TfS in MKG-FN ($r = -0,458$, $p = 0,037$).
- V celotni skupini preiskovancev smo določili naslednje frekvence mutiranega alela: 3,4 % za mutacijo C282Y, 27,9 % za mutacijo H63D in 1 % za mutacijo S65C. Skupini se med seboj nista razlikovali po porazdelitvi genotipov.
- V skupini preiskovancev z osteoartrozo smo določili vpliv genotipa C282Y na TIBC ($p = 0,005$), MKG-FN ($p = 0,038$) in MKG-TOT ($p = 0,049$).

Zaključujemo, da je med bolniki z osteoporozo in osteoartrozo prisotna razlika v preskrbi z železom, kar lahko vpliva na MKG. Na MKG lahko vpliva tudi genotip, vendar je omejitev naše raziskave majhno število in nehomogena starost preiskovancev.

LITERATURA

1. Thomas L: Clinical Laboratory diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory results, first edition, TH – Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt, Germany, 1998: 215 – 229, 268 – 283.
2. Wick M, Pinggera W, Lehmann P: Iron metabolism, anemias, diagnosis and therapy, fourth edition, Springer – Verlag/Wien, 2000: 1 – 95.
3. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005: 607 – 612, 916 – 925, 1196 – 1197, 1324 – 1374.
4. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM et al: Physiology, fifth edition, Mosby, St. Louise, Missouri, USA, 2004: 610 – 611.
5. Majkić – Singh N: Medicinska biohemija, Društvo medicinskih biohemičara Srbije, 2. Izdaja, Sprint, Beograd, 2006: 224 – 225, 299 – 304.
6. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM et al: Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat genet* 2006; 38 (5): 531 – 539.
7. Guyton AC, Hall JE.: Textbook of medical physiology, ninth edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1996: 430 – 431.
8. Tietz: Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, fourth edition, Elsevier Sanders, St. Louise, Missouri, USA, 2006: 562 – 563, 1186 – 1193, 1483 – 1489, 1814 – 1815.
9. Gobec L: Železo: Zbornik predavanj, Seminar za tehnike laboratorijske medicine, Biografika Bori d.o.o., Ljubljana, 2000.
10. Carmaschella C: Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood* 2005; 106 (12): 3710 – 3717.
11. Weiss G: Genetic mechanisms modifying factors in hereditary hemochromatosis. *Nat Rev, Gastroenterol & Hepatol* 2010; 7 (1); 50 – 58.
12. Alexander J, Kowdley KV: Hereditary hemochromatosis genetics, pathogenesis and clinical management. *Annals of hepatology* 2005; 4 (4); 240 – 247.
13. Pietrangelo A: Hereditary hemochromatosis – A new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; 350 (23); 2383 – 2397.
14. Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo: Vodnik po preiskavah KIKKB; dostopno na internetu aprila 2012: <http://www.kclj.si/kikkb/preiskave.htm>.

15. Prezelj M, Finderle P: Metabolizem železa in novi pogledi v diagnostiki: Zbornik predavanj, Seminar za tehnike laboratorijske medicine, Biografika Bori d.o.o., Ljubljana, 2008.
16. Franchini M, Veneri D: Recent advances in hereditary hemochromatosis. *Annals of hematology* 2005; 84; 347 – 352.
17. Feder Jn, Gnitzke A, Thomas W et al: A novel MHC class I – like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399 – 408.
18. Olynyk JK, Trinder D, Ramm GA et al: Hereditary hemochromatosis in the Post – *HFE* era. *Hepatology* 2008; 48 (3): 991 – 1001.
19. Janssen MCH, Swinkels DW: Hereditary hemochromatosis. *Best Practice & Research Gastroenterology* 2009; 23; 171 – 183.
20. Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV et al: Diagnosis and Management of Hemochromatosis: 2011 Practice guideline by the American association for the study of liver disease. *Hepatology* 2011; 54 (1): 328 – 343.
21. Cazzola M: Novel genes, proteins, and inherited disorders of iron overload: iron metabolism is less boring than thought. *Haematologica* 2002; 87: 115 – 116.
22. Cukjati M, Vaupotič T, Rupprecht R, Čurin – Šerbec V: Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high – throughput genotyping assay. *BMC Med Genet* 2007; 8:69.
23. Ramm GA, Ruddell RG: Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron – induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2005; 25 (4): 433 – 449.
24. Philippe MA, Ruddell RG, Ramm GA: The role of iron hepatic fibrosis: another piece in the puzzle. *World J Gastroenterol* 2007; 13 (35): 4746 – 4754.
25. Sahinbegovic E, Dallos T, Aigner E et al: Musculoskeletal disease burden of hereditary hemochromatosis. *Arthritis & Rheum* 2010; 12 (62): 3792 – 3798.
26. Kumar P, Clark M: *Clinical Medicine*, seventh edition, Elsevier Limited, Spain, 2009: 518 – 529, 561 – 565.
27. Bregar M: Novejša spoznanja na področju etiopatogeneze in zdravljenja primarne osteoartroze. *Zdrav Vestn* 2002; 71: 235 – 239.
28. Jomova K, Valko M: Advances in metal – induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2001; 283: 65 – 87.
29. Papanikolaou G, Pantopoulos K: Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 202: 199 – 211.

30. Petrovič M: Vpliv genetskih delecij *GSTM1* in *GSTT1* na mineralno kostno gostoto. Diplomaska naloga, Ljubljana 2010.
31. Valenti L, Varenna M, Fracanzani AL et al: Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int* 2009; 20: 549 – 555.
32. Zarjou A, Jeney V, Arosio P et al: Ferritin ferroxidase activity: A potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res* 2010; 25 (1): 164 – 172.
33. Yamasaki K, Hagiwara H: Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett* 2009; 191 (2-3): 211 – 215.
34. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF et al: Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int* 2005; 16 (12): 1809 – 1814.
35. Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC et al: Iron-overload-related disease in *HFE* hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 2008; 358 (3): 221 – 230.
36. IRON Flex[®] reagent cartridge, Siemens, 2009.
37. IBCT Flex[®] reagent cartridge, Siemens, 2009.
38. FERR Flex[®] reagent cartridge, Siemens, 2009.
39. Qiagen: Flexigene DNA Handbook, maj 2020.
40. Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T: Molecular cloning, 2nd Ed., A laboratory manual, 1989: 6.19 – 6.3.
41. Nanodrop users manual, dostopno na: [www. nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8,5x11.pdf](http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8,5x11.pdf)
42. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215 - 220.
43. Sambrook J, Russel DW: Molecular Cloning: A laboratory Manual, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 8.18 – 8.25.
44. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al: The real – time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27 (2-3): 95 – 125.
45. Liu G, Men P, Kenner GH, Miller SC: Age associated iron accumulation in bone: Implications for postmenopausal osteoporosis and a new target for prevention and treatment by chelation. *Biometals* 2006; 19 (3): 245 – 251.
46. D'Amelio P, Cristofaro M, Tamone C et al: Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone* 2008; 43 (6): 1010-1015.

47. Katsumata S, Katsumata-Tsuboi R, Uehara M et al: Severe iron deficiency decreases both bone formation and bone resorption in rats. *The journal of nutrition* 2008; 238-243.
48. Yang Q, Jian J, Abramson SB et al: Inhibitory effects of iron on bone morphogenetic protein 2-induced osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res* 2011; 26 (6): 1188-1196.
49. Wikipedia; The free encyclopedia: hardy – Weinberg principle: Dostopno na internetu aprila 2012: http://en.wikipedia.org/wiki/Hardy-Weinberg_principle
50. Sham RL, Ou CY, Cappuccio J et al: Correlation between genotype and phenotype in hereditary hemochromatosis: Analysis of 61 cases. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23 (2): 314 – 320.
51. Wang Y, Gurrin LC, Wluka AE et al: HFE C282Y homozygosity is associated with increased risk of total hip replacement for osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2012; 41 (6): 872 – 878.
52. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC et al: Serial serum ferritin measurement in untreated *HFE* C282Y homozygotes in the hemochromatosis and iron overload screening study. *Int J Lab Hematol* 2008; 30 (4): 300-305.

PRILOGE

Priloga 1: Koncentracija in čistost izoliranih vzorcev genomske DNA.

OSTEOPOROZA						OSTEOARTROZA		
št. vzorca	konc DNA	A260/280	št. vzorca	konc DNA	A260/280	št. vzorca	konc DNA	A260/280
67	351,74	1,83	138	330,16	1,73	301	384,97	1,83
74	286,67	1,85	139	264,60	1,84	302	447,36	1,85
75	813,13	1,83	140	259,59	1,82	303	448,27	1,82
77	264,94	1,85	141	370,00	1,83	304	475,91	1,78
79	505,91	1,79	142	516,14	1,71	305	310,49	1,82
80	446,00	1,80	144	641,82	1,85	306	243,88	1,87
81	457,43	1,82	145	428,29	1,80	308	131,61	1,84
82	981,99	1,81	154	496,71	1,78	309	194,41	1,86
85	828,09	1,86	156	350,09	1,85	311	264,39	1,86
88	353,85	1,81	161	289,95	1,85	312	316,71	1,84
89	239,79	1,85	162	389,13	1,80	313	199,46	1,90
90	510,83	1,80	163	641,34	1,82	315	332,28	1,78
91	386,86	1,82	164	313,84	1,85	317	780,30	1,86
92	217,42	1,81	165	818,42	1,85	318	456,69	1,85
94	1547,65	1,85	169	204,35	1,77	319	287,83	1,88
95	418,02	1,84	170	435,75	1,81	320	437,33	1,85
97	367,94	1,84	171	232,31	1,85	322	848,17	1,87
106	414,53	1,81	173	352,41	1,85	323	328,11	1,83
107	790,38	1,85	174	373,74	1,80	324	403,03	1,85
109	284,36	1,82	175	381,76	1,84	325	311,18	1,87
113	324,07	1,83	176	211,73	1,88	327	530,84	1,81
114	351,93	1,82	179	1033,82	1,84	328	381,94	1,85
116	181,74	1,85	181	256,27	1,85	330	1082,20	1,66
117	366,44	1,83	182	242,49	1,85	331	280,76	1,86
118	467,91	1,81	183	865,21	1,77	332	317,81	1,83
119	426,04	1,82	184	541,07	1,79	333	326,09	1,84
121	145,55	1,86	185	252,03	1,82	334	445,57	1,83
123	889,59	1,87	186	474,22	1,82	335	403,88	1,85
125	548,38	1,81	187	68,78	1,58	336	299,43	1,86
126	187,32	1,85	188	427,12	1,82	337	988,08	1,86
128	667,39	1,85	189	219,54	1,82	338	232,66	1,86
129	514,14	1,81	190	842,51	1,83	339	509,20	1,86
133	217,62	1,84	191	274,32	1,85	340	70,90	1,77
135	684,35	1,80	192	185,14	1,77			
136	396,27	1,80						

Priloga 2: Zbrani genotipi za preiskovance z osteoporozo; normalni homozigot je označen z »1«, heterozigot je označen z »2«, mutiran homozigot je označen s »3«.

št. vzorca	H63D	S65C	C282Y	št. vzorca	H63D	S65C	C282Y
67	1	1	1	138	1	1	1
74	2	1	1	139	1	1	1
75	2	1	1	140	1	1	1
77	1	1	1	141	2	1	1
79	1	1	1	142	2	1	1
80	1	1	1	144	1	1	1
81	1	1	1	145	1	1	1
82	2	1	1	154	1	1	1
85	1	1	1	156	1	1	2
88	2	1	1	161	1	1	1
89	1	1	1	162	1	1	1
90	1	1	1	163	2	1	1
91	1	2	1	164	1	2	1
92	1	1	1	165	1	1	1
94	1	1	1	169	1	1	1
95	1	1	1	170	1	1	1
97	2	1	1	171	1	1	1
106	2	1	1	173	2	1	1
107	3	1	1	174	1	1	1
109	3	1	1	175	1	1	1
113	1	1	2	176	1	1	1
114	1	1	1	179	2	1	1
116	2	1	1	181	2	1	1
117	2	1	1	182	1	1	1
118	1	1	1	183	1	1	1
119	1	1	1	184	1	1	1
121	1	1	1	185	1	1	1
123	1	1	1	186	1	1	1
125	1	1	1	187	1	1	1
126	2	1	1	188	1	1	2
128	2	1	1	189	1	1	1
129	2	1	1	190	2	1	1
133	1	1	1	191	2	1	1
135	1	1	1	192	1	1	1
136	1	1	1				

Priloga 3: Zbrani genotipi za preiskovance z osteoartrozo; normalni homozigot je označen z »1«, heterozigot je označen z »2«, mutiran homozigot je označen s »3«.

št. vzorca	H63D	S65C	C282Y	št. vzorca	H63D	S65C	C282Y
301	1	1	1	323	1	1	1
302	1	1	1	324	1	1	1
303	1	1	1	325	1	1	1
304	1	1	1	327	1	1	1
305	2	1	1	328	1	1	2
306	1	1	1	330	1	1	1
308	2	1	1	331	1	1	1
309	3	1	1	332	1	1	1
311	1	1	1	333	2	1	1
312	1	1	1	334	1	1	1
313	1	1	2	335	2	1	1
315	1	1	1	336	1	1	1
317	1	1	1	337	2	1	1
318	2	1	2	338	1	1	2
319	1	1	1	339	2	1	1
320	1	1	1	340	1	1	1
322	2	1	1				

Priloga 4: Spol, starost, izmerjene vrednosti za železo, TIBC, feritin in nasičenost transferina za skupino z osteoporozo (Ž = ženske, M = moški).

št. vzorca	Spol	Starost (leta)	Železo (μmol/L)	TIBC (μmol/L)	Feritin (μgl/L)	Nasičenost transferina(%)
41	M	62	2,60	39,90	331	6,50
42	Ž	80	17,90	50,40	138	35,50
43	M	85	22,80	39,50	271	57,70
44	Ž	82	18,40	34,80	211	52,90
45	Ž	83	9,90	36,10	125	27,40
49	Ž	80	7,00	48,80	93	14,30
50	Ž	80	3,80	40,30	157	9,40
51	Ž	79	8,90	33,60	242	26,50
54	Ž	79	14,90	39,60	142	37,60
55	Ž	86	3,50	42,40	530	8,30
57	Ž	84	10,20	29,20	371	34,90
61	Ž	84	11,80	33,80	247	34,90
62	Ž	89	18,20	43,00	443	42,30
65	Ž	90	2,80	36,80	57	7,60
67	M	75	29,20	35,80	1258	81,60
74	Ž	70	8,90	38,70	105	23,00
75	M	71	11,60	45,50	219	25,50
77	Ž	74	6,10	22,30	221	27,40
79	Ž	57	6,60	31,90	570	20,70
80	M	71	6,20	34,10	616	18,20
81	Ž	76	7,50	40,50	182	18,50
82	Ž	90	15,30	49,70	460	30,80
85	Ž	87	11,30	17,90	508	63,10
88	M	90	16,80	36,70	96	45,80
89	Ž	80	6,80	41,10	248	16,50
90	Ž	78	6,90	32,50	190	21,20
91	Ž	79	8,80	29,20	264	30,10
92	Ž	88	13,60	45,90	168	29,60
94	Ž	90	14,80	30,00	342	49,30
95	Ž	93	10,60	32,90	79	32,20
97	Ž	87	14,20	32,00	294	44,40
106	M	81	12,90	52,80	74	24,40
107	Ž	83	18,30	41,80	270	43,80
109	Ž	89	6,70	49,40	140	13,60
113	Ž	73	5,80	54,20	48	10,70
114	Ž	71	7,40	37,10	178	19,90
116	Ž	88	12,60	35,30	170	35,70
118	Ž	77	10,00	45,60	142	21,90
119	Ž	79	3,80	34,30	297	11,10

121	Ž	77	7,30	55,10	217	13,20
123	Ž	75	1,80	32,90	288	5,50
125	Ž	73	9,30	22,70	476	41,00
126	Ž	83	7,90	34,30	130	23,00
128	M	80	4,60	24,60	678	18,70
129	Ž	85	3,70	42,90	92	8,60
133	M	73	2,90	39,40	131	7,40
135	Ž	79	12,40	39,00	372	31,80
136	M	78	5,80	33,50	115	17,30
138	Ž	68	8,30	24,80	82	33,50
139	Ž	83	16,70	48,30	304	34,60
140	Ž	72	3,90	44,90	127	8,70
141	Ž	79	10,30	26,10	430	39,50
142	Ž	87	8,90	32,50	335	27,40
145	M	58	7,50	43,60	373	17,20
154	M	86	11,60	19,50	1472	59,50
156	Ž	78	6,50	30,10	158	21,60
161	Ž	67	2,80	36,70	181	7,60
162	Ž	80	7,30	40,30	127	18,10
163	Ž	83	7,20	53,80	155	13,40
164	Ž	74	4,70	34,60	144	13,60
165	M	78	3,30	31,00	431	10,60
169	Ž	79	1,90	38,20	177	5,00
170	Ž	80	12,60	49,20	194	25,60
171	Ž	72	10,60	40,80	90	26,00
173	Ž	90	12,50	39,00	211	32,10
174	Ž	79	6,20	47,50	84	13,10
175	Ž	85	7,50	29,30	580	25,60
176	Ž	75	8,80	51,80	65	17,00
179	Ž	86	15,40	18,80	334	81,90
181	Ž	78	12,90	44,80	138	28,80
182	Ž	80	8,40	36,40	194	23,10
183	Ž	84	2,10	33,00	174	6,40
184	Ž	72	3,50	38,30	1391	9,10
185	Ž	79	5,40	39,40	107	13,70
186	Ž	89	3,70	35,00	659	10,60
187	Ž	73	4,40	28,00	224	15,70
188	M	83	7,90	24,30	667	32,50
189	Ž	84	5,40	34,40	148	15,70
190	Ž	87	9,90	27,20	382	36,40
191	Ž	67	5,80	44,10	281	13,20
192	Ž	81	7,60	30,00	220	25,30

Priloga 5: Spol, starost, izmerjene vrednosti za železo, TIBC, feritin in nasičenost transferina za skupino z osteoartrozo (Ž = ženske, M = moški).

št. vzorca	Spol	Starost (leta)	Železo (μmol/L)	TIBC (μmol/L)	Feritin (μg/L)	Nasičenost transferina(%)
301	Ž	66	2,50	35,60	369	7,00
303	Ž	50	6,50	40,10	281	16,20
304	Ž	78	4,40	31,50	421	14,00
305	M	70	4,80	39,60	186	12,10
306	Ž	83	5,40	48,60	67	11,10
308	Ž	54	4,10	46,70	239	8,80
309	M	56	4,10	38,70	104	10,60
311	M	73	3,40	46,90	60	7,20
312	Ž	75	7,70	52,80	80	14,60
315	M	78	2,30	39,90	294	5,80
317	Ž	59	3,00	49,90	116	6,00
318	M	60	4,10	52,60	192	7,80
319	Ž	71	9,30	43,00	289	21,60
320	M	68	5,20	37,30	272	13,90
322	Ž	70	6,10	48,80	63	12,50
323	M	75	6,70	40,70	124	16,50
324	M	65	2,90	39,50	361	7,30
325	M	79	5,20	39,40	254	13,20
327	Ž	64	1,70	32,70	655	5,20
328	M	66	7,60	57,20	137	13,30
330	Ž	69	5,60	41,30	305	13,60
331	M	72	7,60	46,80	196	16,20
332	M	49	3,10	42,60	122	7,30
333	M	82	3,10	46,60	76	6,70
335	Ž	88	7,80	33,40	119	23,40
336	M	64	4,40	46,90	149	9,40

Priloga 6: Mineralna kostna gostota pri skupini preiskovancev z osteoporozo (MKG-TOT = mineralna kostna gostota kolka, MKG-FN = mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG-LS = mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc).

št. vzorca	MKGfn (kg/m ²)	MKGtot (kg/m ²)	MKGls (kg/m ²)	št. vzorca	MKGfn (kg/m ²)	MKGtot (kg/m ²)	MKGls (kg/m ²)
45	0,603	0,671	0,750	119	0,678	0,537	0,716
50	0,664	0,565	0,803	121	0,734	0,714	0,823
51			0,946	123	0,616	0,700	0,675
54	0,651	0,702	0,600	125	0,528	0,680	0,886
55	0,462	0,548	0,780	126	0,533	0,709	0,974
57	0,681	0,707	0,864	129	0,667	0,752	1,079
61	0,670	0,628	0,942	133	0,740	0,974	0,885
62	0,421	0,493	0,757	135	0,447	0,540	0,625
67	0,789	0,967	1,318	136	0,490	0,500	0,903
74	0,763	0,880	1,028	141	0,487	0,581	0,733
75	0,681	0,772	1,027	142	0,607	0,736	0,942
77			0,498	161	0,653	0,751	0,912
79	0,704	0,746	0,851	162	0,522	0,560	0,748
80	0,695	0,712	0,847	165	0,453	0,679	0,781
81	0,481	0,522	0,607	169	0,521	0,621	1,121
82	0,571	0,537	0,913	170	0,798	0,941	1,461
88	0,442	0,459	0,632	171	0,638	0,728	0,905
89	0,604	0,696	1,129	173	0,655	0,687	0,894
90	0,595	0,707	0,828	174	0,749	0,959	1,004
91			0,875	176	0,791	0,681	0,879
92			1,118	179	0,386	0,402	0,785
94	0,474	0,547	0,765	182	0,591	0,505	0,683
97	0,532	0,581	0,857	183	0,522	0,570	0,601
106	0,714	0,925	1,056	184	0,535	0,542	0,538
109	0,779	0,778	1,105	185	0,607	0,738	1,103
113	0,603	0,640	0,880	186	0,401	0,469	0,779
114	0,678	0,875	1,114	187	0,619	0,678	1,108
116	0,541	0,653	1,136	188	0,644	0,777	0,982
117	0,669	0,785	0,910	191	0,675	0,834	0,974
118	0,545	0,572	0,821	192	0,559	0,658	0,897

Priloga 7: Mineralna kostna gostota pri skupini preiskovancev z osteoartrozo (MKG-TOT = mineralna kostna gostota kolka, MKG-FN = mineralna kostna gostota vratu stegenice, MKG-LS = mineralna kostna gostota predela ledvenih vretenc).

št. vzorca	MKGfn (kg/m ²)	MKGtot (kg/m ²)	MKGls (kg/m ²)	št. vzorca	MKGfn (kg/m ²)	MKGtot (kg/m ²)	MKGls (kg/m ²)
301			1,258	323			1,136
302	1,179	1,255	1,329	324	0,916	1,042	1,116
303	0,765	0,962	0,748	325	0,708	0,793	0,899
304	0,639	0,758	0,793	327	0,744	0,847	0,937
305			0,889	328	0,580	0,704	0,648
306	0,718	0,749	0,764	330	0,751	0,825	0,996
308	0,800	0,945	0,899	331	0,749	0,922	1,094
309	1,158	1,153	1,032	332	0,925	1,173	1,178
311			1,133	333	0,828	0,869	1,239
312	0,707	0,909	1,161	334	0,634	0,694	0,733
313	0,935	1,005	1,034	335	0,761	0,721	1,240
315	1,102	1,314	1,401	336	1,030	1,042	1,305
317	0,931	0,959	1,061	337	0,891	1,286	1,012
318			1,096	338	0,443	0,429	0,487
319	0,743	0,849	0,849	339	0,911	0,979	0,937
320	0,875	1,121	1,306	340	0,669	0,931	0,768
322	0,626	0,752	0,835				