

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA GRUDEN

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA GRUDEN

**VPLIV POLIMORFIZMOV H63D, S65C IN C282Y V GENU *HFE* NA
MINERALNO KOSTNO GOSTOTO**

**INFLUENCE OF POLYMORPHISMS H63D, S65C IN C282Y IN *HFE* GENE ON
BONE MINERAL DENSITY**

Ljubljana, 2013

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

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek, mag. farm. za pomoč in koristne nasvete pri praktičnem in pisnem delu. Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.

Posebno zahvalo posvečam očetu in mami, ki sta me skozi celoten študij spodbujala.

Izjava

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

VSEBINA

POVZETEK.....	I
ABSTRACT.....	II
SEZNAM OKRAJŠAV.....	III
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
1. UVOD.....	1
1.1. KOSTNA PRENOVA	1
1.1.1. BIOKEMIJSKI KAZALCI KOSTNE PREMENE.....	3
1.2. OSTEOPOROZA.....	5
1.3. OSTEOARTRITIS.....	7
1.4. OKSIDATIVNI STRES.....	9
1.4.1. VPLIV ŽELEZA NA KOSTNE CELICE.....	10
1.5. HEREDITARNA (DEDNA) HEMOKROMATOZA.....	13
1.5.1. GEN ZA HFE.....	14
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE.....	17
3.1. PREISKOVANE SKUPINE.....	17
3.2. PRIPRAVA RAZTOPIN DNA VZORCEV.....	17
3.3. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR).....	18
3.3.1. GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI.....	19
3.3.2. PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI IN IZVEDBA PCR - REAKCIJE.....	20
3.3.3. MATERIALI IN OPREMA.....	21
3.4. STATISTIČNE METODE.....	22
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23
4.1. OPTIMIZACIJA POSTOPKA GENOTIPIZACIJE	23
4.2. POGOSTOST POJAVLJANJA POLIMORFIZMOV H63D, S65C IN C282Y V GENU ZA HFE.....	25

4.3. POVEZANOST POLIMORFIZMOV H63D, S65C IN C282Y V GENU ZA HFE Z MKG IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE.....	33
4.3.1. POMENOPAVZNE PREISKOVANKE.....	34
4.3.2. PREMENOPAVZNE PREISKOVANKE.....	39
4.3.3. PREISKOVANKE Z OSTEOARTRITISOM.....	44
4.3.4. MOŠKI PREISKOVANCI.....	46
5. SKLEP.....	48
6. LITERATURA.....	49
PRILOGA	

POVZETEK

Gen *HFE* kodira HFE-protein, ki sodeluje pri absorpciji železa. Polimorfizmi gena *HFE* povzročajo povečano absorpcijo železa in kopičenje le-tega, kar vodi v okvaro različnih organov. Presežek železa v telesu sproži nastanek reaktivnih kisikovih spojin, ki povzročijo znižanje mineralne kostne gostote (MKG). Zaradi tega bi lahko presežek železa vplival tudi na tveganje za razvoj osteoporoze in osteoartroze. V naši raziskavi smo zato želeli ugotoviti, ali obstaja povezava med polimorfizmi H63D, S65C in C282Y v genu *HFE* ter MKG in biokemijskimi kazalci kostne preнове.

V raziskavo smo vključili 679 preiskovancev, ki smo jim izmerili MKG ledvenih vretenc, vratu stegenice in kolka ter koncentracije biokemijskih kazalcev kostne preнове. Preiskovance smo razdelili v štiri skupine: pomenopavzne preiskovanke (n=486), premenopavzne preiskovanke (n=57), preiskovance z osteoartrozo (n=49) in moške preiskovance (n=95). Z genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami smo vzorcem določili genotipe za vsak polimorfizem in s statistično analizo preverili njihov vpliv na MKG in biokemijske kazalce kostne preнове.

Za celotno skupino preiskovancev smo ugotovili naslednje frekvence mutiranega alela: 13,8 % za polimorfizem H63D, 1,7 % za polimorfizem S65C ter 3,1 % za polimorfizem C282Y. Pri pomenopavznih preiskovankah smo za vse tri polimorfizme dokazali statistično značilen vpliv na MKG kolka. Ugotovili smo vpliv vseh treh polimorfizmov na znižanje MKG kolka ($p=0,046$ pri polimorfizmu H63D, $p=0,049$ pri polimorfizmu S65C, $p=0,040$ pri polimorfizmu C282Y). Nadalje smo dokazali statistično značilen vpliv polimorfizma H63D na RANKL ($p=0,048$). Vrednosti RANKL so bile v prisotnosti polimorfizma nižje. Pri premenopavznih preiskovankah smo dokazali statistično značilen vpliv polimorfizma H63D na C-terminalni telopeptid kolagena tipa I (CTX) ($p=0,043$). Heterozigoti so imeli nižje vrednosti kot normalni homozigoti.

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da polimorfizmi gena *HFE* vplivajo na MKG pri pomenopavznih preiskovankah in prispevajo k obolevnosti za osteoporozo. Pri ostalih skupinah, ki so bile po številu preiskovancev bistveno manjše, vpliva polimorfizmov nismo uspeli dokazati. Raziskavo bi bilo zato potrebno razširiti na več preiskovancev.

ABSTRACT

HFE gene encodes the HFE protein, which is involved in iron absorption. *HFE* gene polymorphisms induce excess iron absorption and storage in the body, which causes damage to various organs. Namely, accumulation of iron in the body leads to the formation of reactive oxygen species that have a negative effect on the bone mineral density (BMD) and may thus modify the risk for osteoporosis and osteoarthritis. Therefore, the aim of our research was to find possible association between H63D, S65C and C282Y polymorphisms of the *HFE* gene and BMD and bone turnover markers.

679 patients with measured lumbal spine, femoral neck and total hip BMD as well as the concentrations of biochemical markers of bone turnover were included in the study. The patients were divided in four groups: postmenopausal women (n=486), premenopausal women (n=57), patients with osteoarthritis (n=49) and male patients (n=95). Genotypes of all three *HFE* polymorphisms were determined by using hydrolysis probes and their influence on BMD and bone turnover markers was assessed by statistical analyses.

The whole group of patients presented the following frequencies of mutated allele: 13,8 % for H63D polymorphism, 1,7 % for S65C polymorphism and 3,1 % for C282Y polymorphism. A statistically significant difference in BMD was found in postmenopausal women for all three polymorphisms. We demonstrated that all three polymorphisms cause reduction of hip BMD (p=0.046 for H63D polymorphism, p=0,049 for S65C polymorphism, p=0,040 for C282Y polymorphism). Furthermore, RANKL levels were lower in the presence of H63D polymorphism and (p=0.048). In premenopausal women, a statistically significant influence was found for H63D polymorphism and CTX (p=0.043). Heterozygotes had lower values than normal homozygotes.

On the basis of our results, we can conclude that *HFE* gene polymorphisms exert a certain influence on BMD in postmenopausal women and thus contribute to osteoporosis development. On the contrary, no influence of any polymorphism on BMD could be demonstrated in other groups of patients. Since all these other groups were rather small further studies on larger number of patients should be conducted in the future.

SEZNAM OKRAJŠAV

BALP	kostna alkalna fosfataza
BRU	enota kostne remodelacije
CTX	C-terminalni telopeptid kolagena tipa I
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPYR	deoksipiridinolin
DXA	dvojno energijska rentgenska absorpcijometrija
<i>HFE</i>	gen za humani hemokromatozni protein (angl. Human hemochromatosis protein)
HH	hereditarna hemokromatoza
IL	interlevkin
MKG	mineralna kostna gostota
NTX	N-terminalni telopeptid kolagena tipa I
OC	osteokalcin
OPG	osteoprotegerin
PINP	propeptid kolagena I
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
TNF	dejavnik tumorske nekroze
TRAP	na tartrat odporna kislina fosfataza

KAZALO SLIK

Slika 1: Proces kostne preнове.....	2
Slika 2: Sistem RANKL/RANK/OPG.....	3
Slika 3: Prikaz zdrave in osteoprozne kosti.....	5
Slika 4: Morfološke spremembe sklepnega hrustanca.....	8
Slika 5: Prikaz izvora ROS in glavnih celičnih antioksidantnih poti.....	9
Slika 6: Nastanek hidroksilnega radikala v prisotnosti železa.....	11
Slika 7: Absorpcija železa iz črevesja in transport v kri.....	11
Slika 8: Polimorfizmi gena <i>HFE</i>	14
Slika 9: Princip PCR-reakcije.....	18
Slika 10: Prikaz delovanja PCR v realnem času z uporabo hidrolizirajočih sond.....	19
Slika 11: Primer prikaza rezultatov genotipizacije za polimorfizem H63D.....	23
Slika 12: Primer prikaza rezultatov genotipizacije za polimorfizem S65C: levo – začetni volumni sond, desno – polovični volumni sond.....	24
Slika 13: Primer prikaza rezultatov genotipizacije za polimorfizem C282Y: levo – začetni volumni sond, desno – polovični volumni sond.....	24
Slika 14: Grafični prikaz frekvence genotipov za polimorfizem H63D v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.....	26
Slika 15: Grafični prikaz frekvence genotipov za polimorfizem S65C v posameznih skupinah skupinah in pri vseh preiskovancih	28
Slika 16: Grafični prikaz frekvence genotipov za polimorfizem C282Y v posameznih skupinah skupinah in pri vseh preiskovancih.....	30

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Biokemijski kazalci kostne preнове.....	4
Preglednica II: Definicija osteoporoze na osnovi merjenja MKG z DEXA.....	5
Preglednica III: Volumni reagentov za pripravo reakcijske zmesi za en vzorec.....	20
Preglednica IV: Pogoji reakcije PCR v realnem času.....	21
Preglednica V: Frekvence genotipov za polimorfizem H63D v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.....	25
Preglednica VI: Frekvence genotipov za polimorfizem S65C v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.....	27
Preglednica VII: Frekvence genotipov za polimorfizem C282Y v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.....	29
Preglednica VIII: Alelna frekvenca za polimorfizem H63D v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.....	31
Preglednica IX: Alelna frekvenca za polimorfizem S65C v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.....	31
Preglednica X: Alelna frekvenca za polimorfizem C282Y v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.....	32
Preglednica XI: Srednje vrednosti in standardne deviacije izmerjenih parametrov (ITM – indeks telesne teže).....	34
Preglednica XII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem H63D.....	35
Preglednica XIII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem S65C.....	37
Preglednica XIV: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem C282Y.....	38
Preglednica XV: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem H63D.....	40

Preglednica XVI: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem S65C.....	42
Preglednica XVII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem C282Y.....	43
Preglednica XVIII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri preiskovancih z osteoartritisom za polimorfizem H63D.....	44
Preglednica XIX: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri preiskovancih z osteoartritisom za polimorfizem S65C.....	45
Preglednica XX: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri preiskovancih z osteoartritisom za polimorfizem C282Y.....	45
Preglednica XXI: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških preiskovancih za polimorfizem H63D.....	46
PreglednicaXXII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških preiskovancih za polimorfizem S65C.....	46
PreglednicaXXIII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških preiskovancih za polimorfizem C282Y.....	47

1. UVOD

1.1. KOSTNA PRENOVA

Kosti so zgrajene iz dveh slojev. Zunanja plast se imenuje kortikalna ali kompaktna kostnina. Razporejena je laminarno v tesnih koncentričnih plasteh na zunanjem delu kosti in predstavlja več kot 80 % celotne mase kostnine. Notranjo plast kosti pa sestavlja trabekularna ali gobasta kostnina, ki predstavlja 20 % kostne mase (1, 2).

Biokemično je kost sestavljena iz organskih in anorganskih snovi. Organski del ali osteoid (30 %) predstavlja večinoma kolagen tipa I, kostne celice in mukopolisaharidi. Anorganski del (70 %) predstavljajo pretežno soli kalcija, PO_4^{3-} , Mg^{2+} , HCO_3^- , natrijevi in citratni ioni (1, 2).

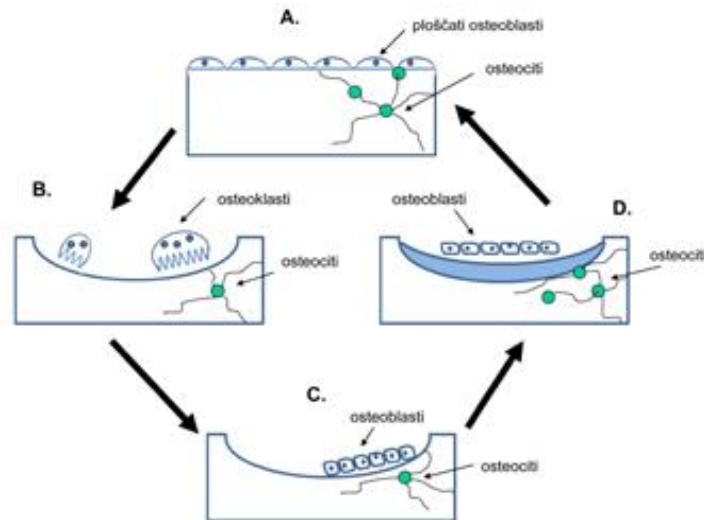
V razvoju, rasti in razgradnji sodelujejo tri vrste celic: osteoblasti, osteociti in osteoklasti.

Osteoblasti so enojedrne celice. Glavna vloga osteoblastov je tvorba in izločanje kolagena in nekolagenskih proteinov kostnega matriksa ter proteinov, ki uravnavajo kostno mineralizacijo. Uravnavajo tudi delovanje osteoklastov, saj izločajo ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika KB (RANKL – angl. receptor activator of nuclear factor KB) in osteoprotegerin (3, 4, 5, 14).

Osteociti so osteoblasti, ki so med tvorbo in mineralizacijo kostnine ostali ujeti v kostnem matriksu. Na površini imajo izrastke, s katerimi se povežejo med seboj in s površino kosti. Osteociti so najštevilčnejše kostne celice in predstavljajo 90–95 % vseh kostnih celic (2, 6).

Osteoklasti so velike večjedrne celice, ki razgrajujejo kostnino. Izražajo receptor RANK (receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika KB), ki po vezavi citokina RANKL sproži diferenciacijo celic v osteoklastno vrsto (2, 6, 8).

Kostnina se neprestano obnavlja v procesu kostne preнове (remodelacije kosti), ki poteka v t. i. enotah kostne premene (BRU). Sestavljata jo dva procesa: razgradnja kostnine z osteoklasti in tvorba nove kostnine z osteoblasti. Pri otrocih gradnja kosti prevladuje nad razgradnjo, pri odraslih med 25 in 35 letom pa sta oba procesa v ravnotežju. V kasnejših letih je razgradnja kostnine intenzivnejša od gradnje (1, 3, 8).



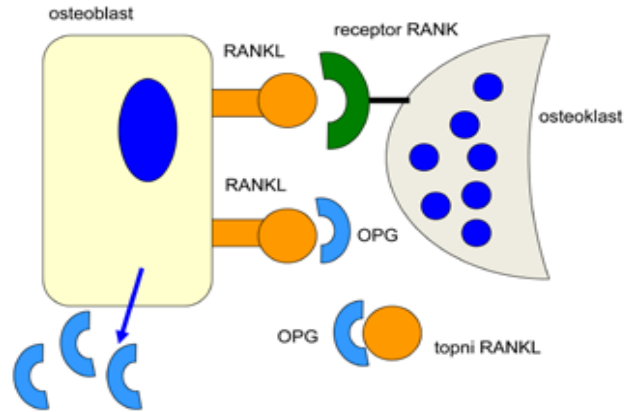
Slika 1: Proces kostne preнове, ki vključuje 4 stopnje: mirovanje in aktivacija (A), razgradnja kostnine (B), preobrat in privabljanje osteoblastov (C) ter gradnjo kostnine in mineralizacijo (D) (16).

Proces kostne preнове poteka v več fazah. V fazi mirovanja se aktivirajo osteoblasti, ki se razmaknejo in razgalijo kostno površino. V fazi razgradnje osteoklasti izdolbejo Howshipovo lakuno, v kateri se ustvari kisel medij in se vanj izločajo številne proteaze, ki razgrajujejo organski matriks. Nato sledi faza preobrata, ko se osteoklasti odmaknejo in vstopijo v apoptozo. Dno lakune očistijo fagociti in ga obložijo s cementno plastjo. Sledi faza gradnje, kjer se tvori osteoid (organski matriks), ki zapolni Howshipovo lakuno in se postopno mineralizira. Površino novonastale kosti prekrijejo neaktivni osteoblasti. Resorpcija kosti poteče v približno treh tednih, tvorba osteoida in mineralizacija pa trajata več mesecev (4, 9).

Kostna prenova je stalen proces, ki poteka celo življenje. Dinamika kostne preнове je odvisna od aktivnosti kostnih celic ter delovanja citokinov in rastnih dejavnikov, ki uravnavajo komunikacijo med osteoblasti in osteoklasti (9).

Uravnavanje kostne preнове

Citokinski sistem RANKL/RANK/OPG je ključen v procesu uravnavanja kostne preнове.



Slika 2: Sistem RANKL/RANK/OPG (16).

RANKL: ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika KB

RANK: receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika KB

OPG: osteoprotegerin

RANKL je protein, ki ga sintetizirajo osteoblasi in se v organizmu nahaja kot transmembranski protein ali v topni obliki. Sproži signale, potrebne za diferenciacijo prekuzorskih monocitno-makrofagnih celic v osteoklaste, prav tako pa je pomemben tudi kot modulator delovanja in preživetja osteoklastov.

RANK je transmembranski protein in se nahaja na površini osteoklastov. Spada v TNF-receptorsko družino in po vezavi RANKL nastane funkcionalen kompleks, ki je pomemben za optimalno osteoklastogenezo, tj. dozorevanje in preživetje osteoklastov.

OPG (osteoprotegerin) je protein osteoblastov. Nahaja se v topni obliki. Ko se OPG veže na RANK-receptor, zavre interakcijo RANK/RANKL in tako prepreči aktivacijo osteoklastov. OPG ima torej osteoprotektivno vlogo (9, 16).

1.1.1. BIOKEMIJSKI KAZALCI KOSTNE PRENOVE

Biokemijski kazalci presnove kosti so stranski produkti gradnje ali razgradnje kostnine in encimi, povezani s tem procesom, ki prehajajo iz okostja v krvni obtok. Biokemijski kazalci gradnje kostnine so: kostna alkalna fosfataza (BALP), osteokalcin (OC) in propeptidi kolagena I., katerih biokemijski kazalci aktivnosti so kazalci razgradnje kostnine: na tartrat rezistentna kisl fosfataza (TRAP), N-terminalni in C-terminalni telo-peptid kolagena I (CTX), hidroksiprolin, piridinolin, deokspiridinolin (DPYR) in katepsin K (15, 16).

Preglednica I: Biokemijski kazalci kostne premene

Kazalci razgradnje kostnine	Kazalci gradnje kostnine
<ul style="list-style-type: none">• Tartrat rezistentna kislja fosfataza• C-terminalni telopeptid (CTX)• N-terminalni telopeptid (NTX)• Hidroksiprolin• Piridinolin• Deoksipiridinolin (DPYR)• Katepsin K	<ul style="list-style-type: none">• Kostna alkalna fosfataza (BALP)• Osteokalcin (OC)• Propeptid kolagena I (PINP)

Kostna alkalna fosfataza (BALP) je izoenzim alkalne fosfataze, ki izhaja iz osteoblastov. V alkalnem pH-ju katalizira hidrolizo organskih monofosfatnih estrov, pri čemer poteče defosforilacija (15, 16).

Osteokalcin (OC) je protein, ki ga izločajo osteoblasti. Sodeluje pri mineralizaciji kosti z vezavo hidroksiapatita (15, 16).

Propeptid kolagena I nastaja iz prokolagena z dolgimi N- in C-terminalnimi propeptidi, ki se odcepljajo. Prokolagen sintetizirajo osteoblasti. Kolagen tipa I vsebuje hidroksilizilpiridinolin in lizilpiridinolin prečne povezave (15, 16).

Na tartrat odporna kislja fosfataza (TRAP) je izoenzim kislje fosfataze. Izhaja iz lizosomov osteoklastov (14, 15).

Hidroksiprolin predstavlja največji delež aminokislin v kolagenu tipa I. Sprošča se pri osteoklastni aktivnosti, ko se kolagen razgrajuje (15, 16).

Piridinolin in deoksipiridinolin sta spremenjena lizinska in hidroksilizinska aminokislinska ostanka, ki stabilizirata kolagenska vlakna s prečnimi povezavami (15, 16).

C- in N-terminalni telopeptidi nastajajo pri razgradnji kolagena tipa I na C- in N-terminalnem koncu ob delovanju kislje fosfataze iz osteoklastov (15, 16).

Prečne povezave kolagena I vezane na N-terminalne telopeptide (NTX) nastajajo pri razgradnji kolagena I na N-terminalnem koncu (15,16).

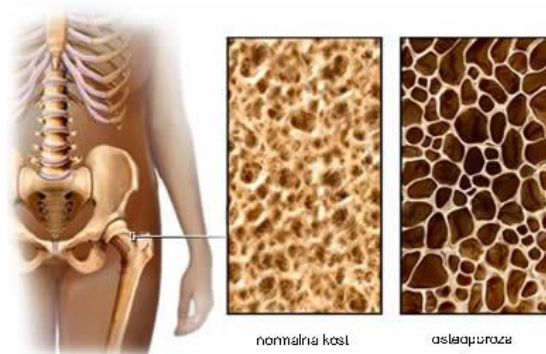
Prečne povezave kolagena I, vezane na C-terminalne telopeptide (CTX), nastajajo pri razgradnji kolagena na C-terminalnem koncu (15, 16).

Biokemijski kazalci kostne premene nam dajejo vpogled v trenutno stanje presnove v kosteh. Njihove koncentracije merimo predvsem pri spremljanju zdravljenja osteoporoze.

Po uspešni terapiji se njihove vrednosti spremenijo v 3 do 6 mesecih po začetku zdravljenja. Strokovni združenji IOF (angl. International Osteoporosis Foundation) in IFCC (angl. International Federation of Clinical Chemistry) sta leta 2010 izdali priporočilo, da se kot referenčna kazalca določata N-terminalni propeptidprokolagena tipa I (PINP) oz. C-terminalni telopeptid kolagen tipa I (CTX) (16).

1.2. OSTEOPOROZA

Osteoporozoza je sistemska degenerativna bolezen kosti. Zanja sta značilni zmanjšanje kostne mase in spremenjena mikroarhitektura kostnega tkiva. Posledica obojega je povečana kostna krhkost in večja občutljivost za zlom. Tipični osteoporotični zlomi so zlom zapestja, vretenc in kolkov (1).



Slika 3: Prikaz zdrave in osteoporozne kosti (11).

Po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) je osteoporozoza zmanjšanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi (t-vrednost). Diagnozo osteoporozoze se postavi z merjenjem MKG z dvojno rentgensko absorpcijometrijo (DEXA) ali na osnovi že dokazanih osteoporotičnih zlomov (1).

Preglednica II: Definicija osteoporozoze na osnovi merjenja MKG z DEXA (16)

MKG – Standardni odklon (T)	Poimenovanje
0 do -1	normalna kostna gostota
-1 do -2,5	osteopenija
pod -2,5	osteoporozoza
pod -2,5 in zlomi	huda osteoporozoza

Etiopatogeneza osteoporoze

V dobi odraščanja je gradnja kosti večja od razgradnje. Do 30. leta starosti dosežemo največjo kostno maso, po 40. letu pa se začne fiziološko zniževanje kostne mase. Pri ženskah po menopavzi je izguba kostne mase večja kot pri moških, ker se količina estrogenov izrazito zmanjša. Estrogeni so namreč močni zaviralci resorpcije kosti. Pri moških je vzrok za razvoj osteoporoze postopno zmanjševanje sekrecije androgenih hormonov. V kasnejših letih se kostna masa manjša še zaradi zvišane koncentracije parathormona, znižane koncentracije kalcitriola in manjše absorpcije kalcija iz črevesja (1).

Dejavniki tveganja

Dejavnike tveganja za razvoj osteoporoze lahko razdelimo na genetske in negenetske.

Genetsko pogojeni dejavniki

Raziskave na dvojčkih in družinah z osteoporozo so pokazale, da dednost pomembno prispeva k pojavu osteoporoze (50–80 %). Študije so dokazale, da je za nastanek in razvoj osteoporoze odgovorno večje število genov, katerih posamezni vplivi pa so majhni (13, 16). Skupine genov, ki potencialno prispevajo k razvoju osteoporoze, so geni, ki kodirajo proteine in encime kostnega matriksa, hormone, rastne dejavnike, citokine in receptorje (13). Kot pomembni so se izkazali geni, ki kodirajo molekule signalne poti RANK/RANKL/OPG in Wnt, saj so dokazali povezanost sprememb v teh genih z MKG (16).

Namen naše študije bo ugotoviti morebitno povezanost polimorfizmov gena *HFE* na MKG, česar do sedaj na tak način še niso proučevali.

Negenetske dejavnike lahko razdelimo na tiste, na katere nimamo vpliva (spol, starost, zgodnja menopavza, rasa, družinska anamneza), in na tiste, na katere lahko vplivamo (nizek indeks telesne mase, kajenje, prekomerno uživanje alkohola, fizična neaktivnost, premajhen vnos kalcija in vitamina D) (12,16).

Oblike osteoporoze

Primarna osteoporoza je samostojna bolezen, ki se pojavi v menopavzi oz. v starosti. Ločimo več vrst primarnih osteoporoz:

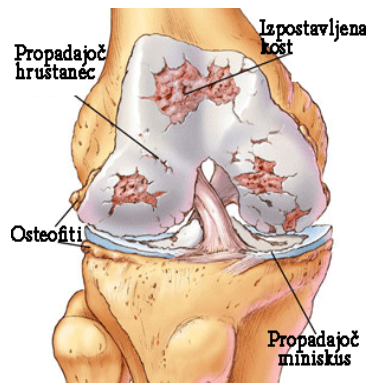
- pomenopavzalna – pojavi se pri ženskah med 50. in 70. letom; vzrok za nastanek je pomanjkanje estrogenov
- senilna – pojavi se v starosti nad 70 let; značilna je tudi za moške, vzrok za nastanek je manjša resorpcija kalcija iz črevesja
- juvenilna– pojavi se v puberteti, nato izzveni; vzrok za nastanek ni poznan
- nosečnostna – pojavi se med nosečnostjo, po porodu izgine; verjetno nastane kot posledica slabše prilagoditve kalciotropnih hormonov

Sekundarna osteoporoza se pojavi kot posledica drugih bolezni (1).

1.3. OSTEOARTROZA

Osteoartroza (OA) je degenerativna bolezen sinovialnih sklepov. Je najpogostejša mišično-skeletna bolezen pri starostnikih nad 65 let. Prizadeti so sklepi kolena in rok ter kolki. Pri OA se poruši normalno ravnovesje razgradnje in sinteze sklepnega hrustanca. Posledica tega je izguba morfologije in funkcije sklepnega hrustanca, skleroza subhondralne kosti ter tvorba subhondralnih cist in kostnih izrastkov. Na koncu so prizadete vse ostale sklepne in ob sklepne strukture: sinovialne membrane ter ob sklepne mišice in kite. Znaki in simptomi so sklepna bolečina, omejena gibljivost sklepov, prisotnost sklepnega izliva zaradi sekundarnega sinovialnega vnetja in oslabeleost ob sklepnih mišic. V poznejši fazi bolezni nastane deformacija sklepa (17).

Sklepni hrustanec je elastično vezivno tkivo, sestavljeno iz kolagenskih vlaken in hondrocitov. Hondrociti predstavljajo 10 % mase hrustanca. Njihova vloga je tvorba kolagena in medceličnine iz proteoglikanov. Proteoglikani vežejo vodo in tako optimalno napnejo kolagensko mrežo, kar da hrustancu čvrstost in elastičnost. Voda predstavlja 80 % mase hrustanca (17, 18).



Slika 4: Morfološke spremembe sklepnega hrustanca (19).

Prvi vidni znaki bolezni so degeneracija in morfološke spremembe sklepnega hrustanca, ki jih spremlja izguba proteoglikanov in vode. Postopoma se hrustanec tanjša, njegova površina postaja vse bolj hrapava, nepravilna, dokler proces ne doseže kosti. Kost odreagira tako, da se tvori kompaktna kostnina. Na sklepnih robovih nastanejo kostni izrastki. V subhondralni kosti nastanejo nekrotični predeli kosti (17, 18).

Ločimo primarno in sekundarno obliko osteoartroze. Pri prvi igrajo pomembno vlogo genetski dejavniki, spol, starost, debelost in prehrana. Sekundarna oblika pa nastane kot posledica drugih stanj in bolezni (18).

Genetski vpliv

V različnih študijah so ugotovili povezavo med osteoartrozo in geni, ki kodirajo kolagen tipa 2 ter proteine ekstracelularnegamatriksa, predvsem osteopontin (18).

V naši raziskavi bomo ugotavljali morebitni vpliv polimorfizmov v genu *HFE* na pojav in razvoj osteoartroze.

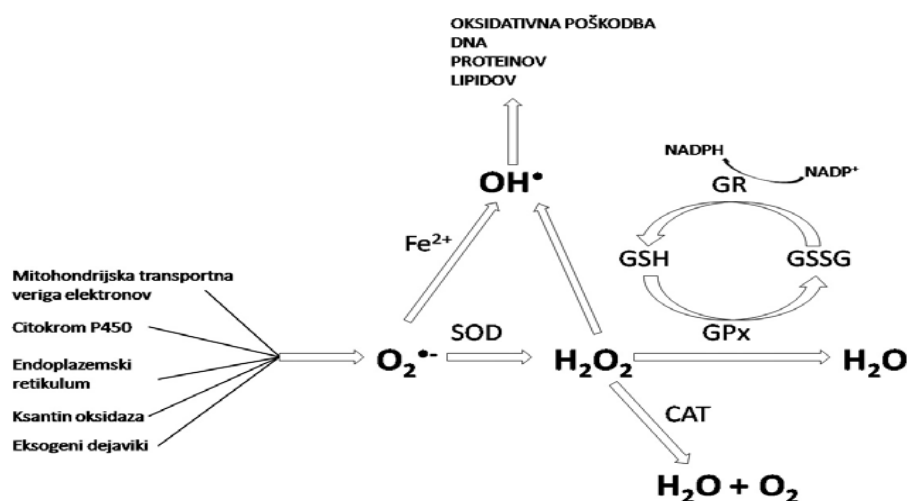
Sklepne bolečine so zelo pogoste pri hemokromatozi. Približno polovica bolnikov občuti prve težave v sklepih. Hemokromatozni artritis je zelo podoben osteoartrozi, le da so pacienti mlajši kot pri primarnem osteoartritisu. Značilna je prizadetost metakarpofalangealnih in proksimalnih interfalangealnih sklepov zapestij in kolen (32).

Nekatere klinične študije potrjujejo neposredno povezavo med kopičenjem železa in poškodbo sklepov. Dokazali so odvisnost med serumsko koncentracijo feritina in pojavnostjo subhondralnega artritisa. Pri drugi študiji so bile v primerjavi z zdravo skupino

koncentracije feritina v sinovialni tekočini povišane pri heterozigotih C282Y ali H63D. Odstranjevanje železa iz sinovialne tekočine je izboljšalo bolečine v sklepah (36).

1.4. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres nastane kot posledica delovanja reaktivnih kisikovih zvrsti – ROS (ang. reactive oxygen species) na celice v organizmu. Med tem procesom se tvorijo tudi prosti radikali. To so atomi, molekule, ioni, ki imajo neparno število elektronov. So zelo reaktivni in nestabilni. Hitro reagirajo z drugimi molekulami in spojinami, ki so v bližini. Vse reaktivne kisikove zvrsti lahko oksidirajo organske molekule v organizmu (21, 22).



Superoksidni anion – O₂^{•-}, vodikov peroksid – H₂O₂, hidroksilni radikal – OH[•], molekularni kisik – O₂, voda – H₂O, superoksid-dismutaza – SOD, katalaza – CAT, glutation-peroksidaza – GPx, glutation-reduktaza – GR, reduciran/oksidiran nikotinamidadenindinukleotid fosfat – NADPH/NADP⁺, reduciran/oksidiran glutation – GSH/GSSG

Slika 5: Prikaz izvora ROS in glavnih celičnih antioksidantnih poti (23).

V organizmu ROS nastajajo normalno zaradi presnovne aktivnosti celic. Če pa jih je preveč, poškodujejo beljakovine, maščobe, DNA in RNA (21, 22).

Hidroperoksidi so bolj stabilni kot radikali, imajo pa še vedno oksidacijsko aktivnost. Najbolj znan hidroperoksid je vodikov peroksid, ki nastane zaradi encimskega odstranjevanja superoksidnega aniona. Ob prisotnosti kovinskih ionov (železa ali bakra) razpade na hidroksilni radikal (OH[•]). Hidroksilni radikal je eden izmed najbolj reaktivnih radikalov. Fentonova reakcija je pomemben način tvorbe hidroksilnega radikala v telesu. Katalizirajo jo železovi ioni, ki povzročajo cepitev vodikovega peroksida na hidroksilni radikal in hidroksilni anion. Hidroksilni radikal nato pritegne vodikov atom, pri čemer

nastaneta nov radikal in voda. Hidroksilni radikali tako povzročajo peroksidacijo biomolekul. Tarčne molekule, ki jih napadajo ROS, so predvsem membranske polinasičene maščobne kisline zaradi velikega števila protonov (lipidna peroksidacija) (22).

Superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$) nastaja v celicah, kjer se porablja kisik (dihalna veriga, fagocitoza, encimske oksidacije). Sam je slabo reaktiven. V protonirani obliki lahko povzroči lipidno proksidacijo. S pomočjo superoksid dismutaze se pretvori v vodikov peroksid in kisik (21).

ROS nastajajo v celici neprestano. Večina kisika, ki ga vdihnemo, celice porabijo za presnovo, preostali kisik pa se pretvori v proste radikale. Veliko ROS nastane tudi zaradi dejavnikov okolja (povečano sevanje, onesnaževanje), neprimernega načina življenja (alkohol, zdravila), zaradi zdravil, poškodb, bolezni ter rentgenskih in UV-žarkov. Posledice povečanega oksidativnega stresa so številne bolezni: srčno-žilne bolezni, presnovne bolezni, rak, nevrodegenerativne bolezni in pospešeno staranje (23).

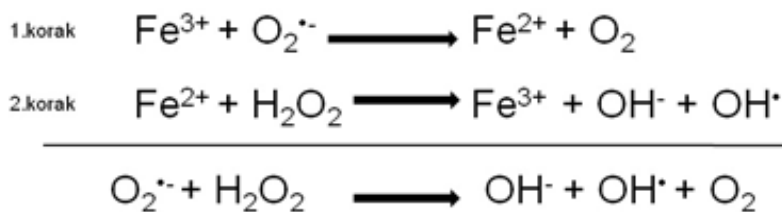
Organizem ima naravni obrambni sistem proti oksidativnemu stresu –antioksidante. V svoji strukturi imajo vsaj en reaktiven vodik, ki se lahko odcepi in veže radikal. Tako nastane nov radikal, ki je bolj stabilen. Obstajajo endogeni antioksidanti, npr. superoksid dismutaza in eksogeni, npr. vitamini (21, 23).

1.4.1. VPLIV ŽELEZA NA KOSTNE CELICE

Železo je esencialni oligoelement. Je sestavni del proteinov in encimov (hemoglobin, katalaze, peroksidaze, NADH dehidrogenaza, sukcinat dehidrogenaza, ribonukleotid reduktaza). Kopičenje železa kot posledica primarne hemokromatoze, večkratnih transfuzij krvi, prevelikega vnosa ali drugih bolezni povzroči poškodbe tkiv in organov (24).

Toksičnost železa

V prisotnosti železa superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$) in H_2O_2 reagirata v Haber-Weissovi reakciji in v naslednjem koraku tvorita hidroksilni radikal (OH^{\bullet}) – Fentonova reakcija. Hidroksilni radikal je zelo reaktiven in reagira blizu nastanka (21, 22).

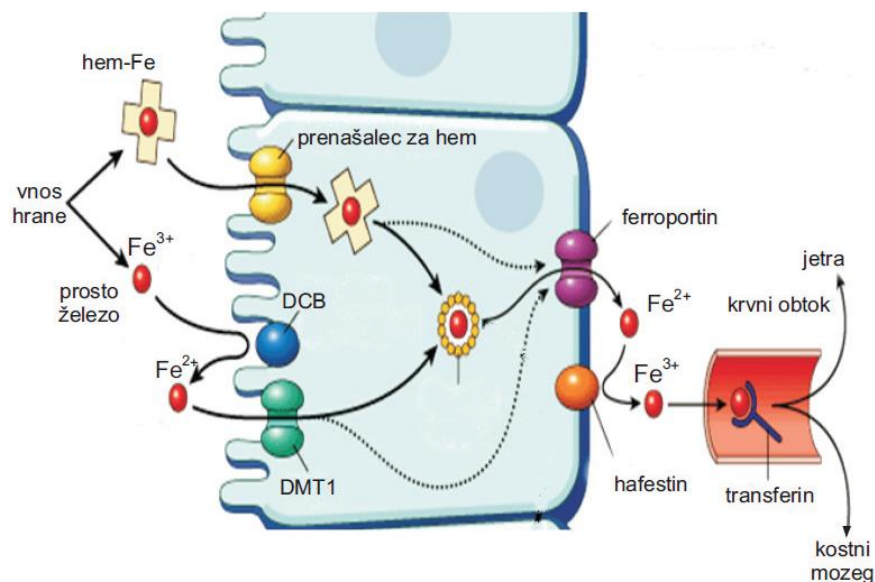


1. korak: Haber-Weissova reakcija. 2. korak – Fentonova reakcija

Slika 6: Nastanek hidroksilnega radikala v prisotnosti železa (23)

Pomen uravnavanja presnove železa

Absorpcija železa večinoma poteka v dvanajstniku, v manjši meri pa tudi v zgornjem delu tankega črevesja. Železo se iz hrane absorbira v obliki hema ali anorganskih soli. Absorbira se samo dvovalentno železo. Encim reduktaza omogoča redukcijo Fe^{3+} v Fe^{2+} . V taki obliki železo s pomočjo prenašalca DMT1 (angl. Divalent metal transporter 1) vstopi v enterocit. Železo, vezano v hem, se absorbira s pomočjo prenašalca HPC1 (angl. Hem carrier protein 1). Iz plazme potuje do eritroblastov, kjer se vgradi v hemoglobin. Ko eritrociti ostarijo, ga makrofagi odstranijo iz hemoglobina. Železo se lahko skladišči v obliki feritina ali s pomočjo feroprotina sprosti v plazmo. V plazmi je večinoma vezan na transferin. Na transferin vezano železo prehaja v celice preko transferinskega receptorja.



Slika 7: Absorpcija železa iz črevesja in transport v kri (prirejeno po 24).

Celokupna masa železa pri odraslem človeku znaša približno 4 g. Pri kronični zastrupitvi z železom, ki je posledica nalaganja železa, se zaloge železa povečajo tudi do 40-krat. V

nasprotju z veliko zmogljivostjo absorpcije in shranjevanja železa ga dnevno izgubimo le okoli 1 mg, in sicer z blatom, urinom in preko kože (24).

Hepcidin ima osrednjo vlogo pri uravnavanju presnove železa. Po svoji strukturi je peptid, njegova sinteza poteka v jetrih. Hepcidin veže in razgradi feroprotein. Tako se zmanjšata absorpcija železa iz črevesja in sproščanje železa iz zalog. Sinteza hepcidina se poveča, če je koncentracija železa visoka, in se zmanjša, če se koncentracija železa zniža. Koncentracija hepcidina je povišana tudi pri okužbah in vnetjih, verjetno kot obrambni mehanizem, da se omeji razpoložljivost železa za mikroorganizme (25).

V različnih študijah so proučevali vpliv nalaganja železa na pojav in razvoj osteoporoze. V študijah, kjer so ugotavljali vpliv polimorfizmov gena *HFE* na MKG, so pokazali, da presežek železa negativno vpliva na MKG. Vse študije so bile zastavljene tako, da so preiskovanci imeli diagnosticirano primarno hemokromatozo in so opazovali, koliko od teh jih ima osteoporozo oz. ali rizični genotip vpliva na MKG. V naši študiji bomo pristopali z druge strani, in sicer nas bo zanimalo, kakšna je pogostost polimorfizmov gena *HFE* v skupinah bolnikov z diagnosticirano osteoporozo ali osteoartrozo in ali so ti polimorfizmi povezani z MKG.

L. Valenti s sodelavci je ugotovil, da presežek železa inhibira delovanje osteoblastov in posledično zmanjša MKG. V študiji s 87 pacienti (moški in ženske) z diagnosticirano hereditarno hemokromatozo so ugotovili, da se je osteoporoza pojavila pri 25 % preiskovancev. Vsem preiskovancem so izmerili kostno gostoto ledvenih vretenc (MKG-LS), 66 % preiskovancev pa kostno gostoto vratu stegnenice (MKG-FN). Zmanjšanje obeh MKG so ugotovili pri 25,3 % preiskovancev. Študija torej dokazuje visoko prevalenco osteoporoze pri pacientih s hereditarno hemokromatozo (26). Po drugi strani pa so v nekaterih študijah ugotovili, da tudi pomanjkanje železa slabo vpliva na MKG pri obeh spolih. Železo je namreč kofaktor encimov, ki sodelujejo v sintezi kolagena (28, 27).

V študijah na miših in celičnih linijah so ugotovili, da kopičenje železa poveča ROS in nekatere vnetne dejavnike (TNF- α , IL-6). Ob dodatku presežka železa osteoblastom so začeli s produkcijo vnetnih mediatorjev, ob sočasnem dodatku antioksidanta pa je bila aktivnost osteoblastov nespremenjena. Zaključili so, da se presežek železa pri miših izraža s kostno razgradnjo, oksidativnim stresom in vnetjem, kar vodi v spremenjeno mikroarhitekturo kosti (28).

V študiji, kjer so ocenjevali MKG pri moških s hereditarno hemokromatozo, so ugotovili zmanjšanje kostne gostote na predelu vratu stegenice (MKG-FN) ter ledvenih vretenc (MKG-LS). Dokazali so večje zmanjšanje MKG-FN. Prav tako so ugotovili, da se je osteoporoza pojavila pri 34,2 % od skupno 38 preiskovancev. Ugotovili so tudi, da so bili moški z osteoporozo starejši. Merili so tudi nekatere biokemijske kazalce kostne prenove (CTX, osteoklacin, BALP), vendar niso dokazali pomembnega znižanja ali zvišanja le-teh. Kar nekaj udeležencev študije je imelo hipogonadizem, kar pomeni, da je bolezen pomemben kofaktor pri zmanjšanju MKG (27). V študiji, kjer so bile udeležene tudi ženske, so ugotovili obratno, in sicer večje zmanjšanje MKG-LS v primerjavi z MKG-FN (26, 30).

Ker višek železa povzroči nastanek oksidativnega stresa, so v nekaterih študijah iskali možnosti, kako le-tega zmanjšati. Kot dobra kelatorja železa sta se izkazala zeleni čaj in laktoferin (29).

1.5. HEREDITARNA (DEDNA) HEMOKROMATOZA

Hereditarna hemokromatoza (HH) je avtosomno recesivna motnja presnove železa in je posledica polimorfizmov gena *HFE*. Najpogostejši, z boleznijo povezani polimorfizmi so C282Y, H63D in S65C. Zbolevalo homozigoti C282Y/ C282Y in sestavljeni heterozigoti C282Y/ H63D ali C282Y/ S65C. Zaradi okvare gena *HFE* pride do povečane absorpcije železa in kopičenja le-tega. Železo se v obliki hemosiderina kopiči predvsem v parenhimskih organih, kot so jetra in pankreas, in povzroči njihovo okvaro (34).

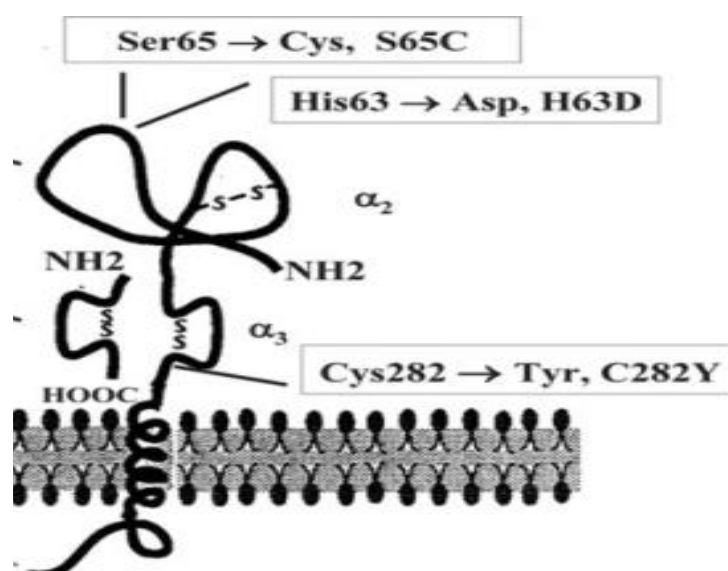
Simptomi boleznii se pojavijo med 50. in 60. letom; pri ženskah kasneje zaradi fiziološke izgube železa (menstrualne krvavitve, nosečnost), ki upočasnijo kopičenje železa. Pri polno razviti boleznii se pojavijo ciroza jeter, sladkorna bolezen in kožne pigmentacije. Diagnoza HH temelji na biokemičnih preiskavah krvi (železo, feritin, nasičenost transferina) in določitvi polimorfizmov gena *HFE*. Bolezen zdravimo z rednimi venepunkcijami in uporabo železovih kelatorjev. Bolnikom se svetuje tudi dietna hrana (34, 35, 37).

HH je najpogostejša genska bolezen s prevalenco 1:300. Čeprav spada med najpogostejše genske bolezni, je njena penetranca nizka (bolezenski znaki se izrazijo le pri določenem odstotku ljudi s polimorfizmom). Najbolj pogosta je pri Severnoevropejcih, zlasti potomcih Keltov. Predpostavlja se, da HH izvira iz Irske izpred 40.000 leti. Ker je takrat

prevladovala hrana, revna z železom, so ljudje s polimorfnimi geni *HFE* imeli prednost, da so iz hrane absorbirali več železa (35). V Evropi je večina HH povezanih s polimorfizmom C282Y (52–96 %), in sicer je največ bolnikov homozigotov C282Y/C282Y. Ti imajo najhujšo obliko bolezni, ki se izraža z izrazitim povišanim železom in posledicami le-tega. Pri sestavljenih heterozigotih C282Y/ H63D ali C282Y/ S65C se ne razvije tako huda oblika bolezni. Najbolj milo obliko bolezni imajo homozigoti H63D/H63D in S65C/ S65C (37).

1.5.1. GEN *HFE*

Gen *HFE* leži na p kraku kromosoma 6. Kodira HFE-protein, ki je transmembranski protein. Po svoji strukturi je podoben proteinom MHC razreda I. Sestavljen je iz 343 AK. Protein ima funkcijo uravnavanja absorpcije železa z interakcijo s transferinskim receptorjem. Tako transferinski receptor kot HFE sta membranska proteina. Po vezavi HFE na transferinski receptor se spremeni konformacija le-tega in kompleks tranferin-železo se težje veže na receptor. Ko je HFE spremenjen zaradi polimorfizmov, se ne more oz. se drugače veže na transferinski receptor, vendar ne more več preprečiti vezave kompleksa transferin-železo na transferinski receptor. Tako pride do prekomerne absorpcije železa in kopičenja le-tega (34, 35).



Slika 8: Polimorfizmi gena *HFE* (36).

Najbolj pogosti polimorfizmi gena *HFE*:

- C282Y – zamenjava adenina z gvaninom v nukleotidu 845, na nivoju aminokislin zamenjava cisteina s tirozinom, rs1800562:G>A
- H63D – zamenjava citozina z gvaninom v nukleotidu 187, na nivoju aminokislin zamenjava histidina s asparaginsko kislino, rs1799945:C>G
- S65D – zamenjava adenina s tirozinom v nukleotidu 193, na nivoju aminokislin zamenjava serina v cistein, rs1800730:A>T

2. NAMEN DELA

Osteoporozna je sistemska bolezen kosti. Zanja je značilno zmanjšanje MKG in spremenjena mikroarhitektura kosti, kar vodi v povečano tveganje za zlome kosti. Osteoartrza je degenerativna bolezen sinovialnih sklepov. Zanja je značilen obraten fenotip kosti, in sicer zvišana MKG vsaj v predelu sklepov. Na pojav in razvoj osteoporozne in osteoartrze imajo močan vpliv genetski dejavniki.

Povečana absorpcija železa zaradi polimorfizmov gena HFE je vzrok za HH. Najpogostejši polimorfizmi gena HFE, povezani s HH, so: C282Y, H63D in S65C. Železo ima negativen učinek na kostno presnovo, saj zavira aktivnost osteoblastov in sintezo kostnine, kar vodi v osteoporozo.

Namen magistrske naloge bo ugotoviti, ali imajo polimorfizmi C282Y, H63D in S65C v genu HFE vpliv na MKG in biokemijske kazalce kostne prenovne ter posledično na pojav osteoporozne in osteoartrze

V ta namen bomo:

- preiskovancem (n=679) izmerili MKG in biokemijske kazalce kostne prenovne,
- v genovski DNA s hidrolizirajočimi sondami in PCR v realnem času določili prisotnost polimorfizmov C282Y, H63D in S65C v genu *HFE*,
- z ustrežno statistično analizo ugotovili, ali obstaja povezava med polimorfizmi C282Y, H63D in S65C v genu *HFE* in MKG ter biokemijskimi kazalci kostne prenovne.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. PREISKOVANCI

V našo raziskavo smo vključili 730 preiskovancev iz UKC Ljubljana – Klinika za edokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, UKC Maribor – Oddelek za endokrinologijo in diabetologijo in SB Celje – Travmatološki oddelek. Preiskovance smo razdelili v naslednje skupine:

- pomenopavzne preiskovanke (zdrave ali osteoporozne)
- premenopavzne preiskovanke
- preiskovanci z osteoartrozo
- moški (zdravi ali osteoporozni)

Preiskovancem so bili odvzeti vzorci krvi, iz katerih so izolirali genomsko DNA in določili koncentracije biokemičnih kazalcev kostne prenove. To so: osteokalcin (OC), osteoprotegerin (OPG), kostna alkalna fosfataza (BALP), C-terminalni telopeptid kolagena tipa I (CTX), ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika kapa B (RANKL) in katepsin K.

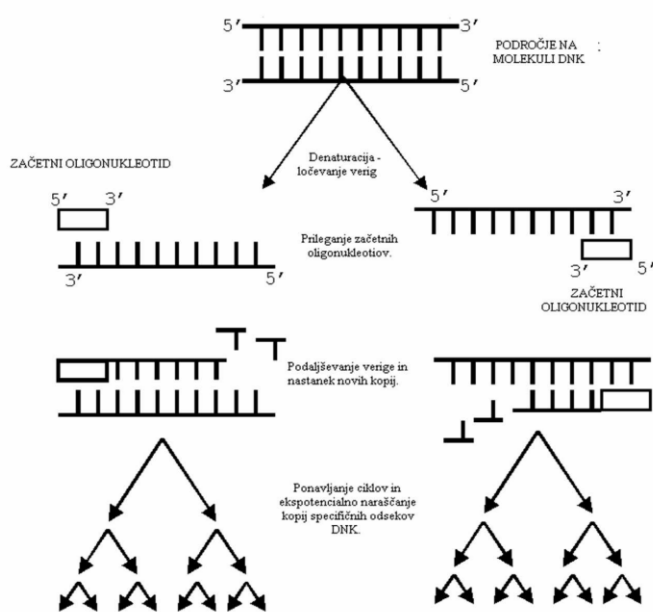
Meritve MKG so opravili s pomočjo DXA metode. Izmerili so MKG kolka (MKG_{tot}), vratu stegenice (MKG_{fm}) in ledvenih vretenc (MKG_{ls}).

3.2. PRIPRAVA RAZTOPIN DNA VZORCEV

Genomska DNA je bila izolirana iz levkocitov polne venske krvi, odvzete z antikoagulantom K₃EDTA. Za izolacijo je bila uporabljena metoda izsoljevanja po Millerju (38).

3.3. VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

PCR je tehnika molekularne biologije, s katero v kratkem času pomnožimo veliko število kopij želenega odseka DNA. Prednost PCR-metode je, da za analizo potrebujemo zelo majhno količino vzorca.



Slika 9: Princip PCR-reakcije (41)

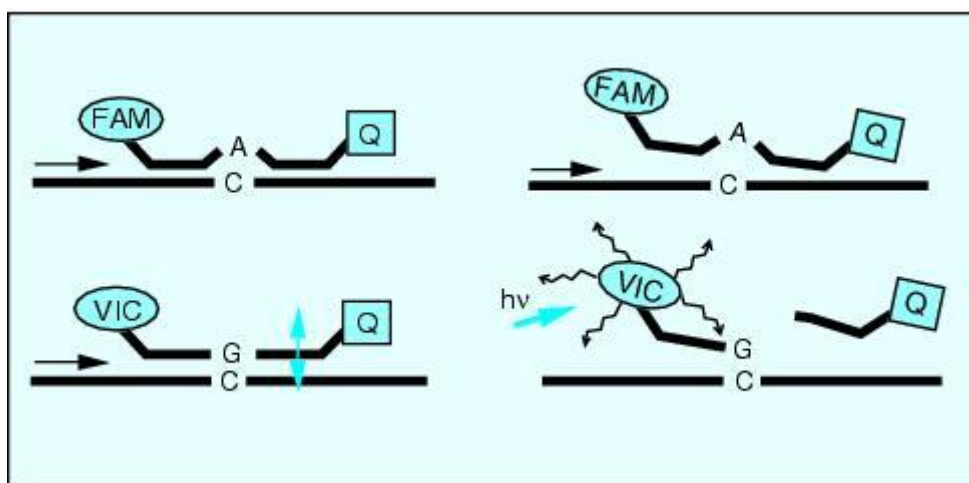
Reakcijsko zmes sestavljajo: izolirana DNA, ki služi kot matrica, dva oligonukleotida začetnika, s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, deoksinukleozid-trifosfati, ki so gradniki nove verige DNA, Mg^{2+} ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA-polimeraza.

Reakcija poteka ciklično, in sicer v 20 do 40 ciklih. Cikel je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja oligonukleotidov začetnikov in izgrajevanja komplementarne verige DNA. Pri denaturaciji z zvišanjem temperature na 94–95 °C razklenemo dvoverižno DNA. Oligonukleotidni začetniki se na razklenjeno enoverižno DNA prilegajo pri temperaturi 40–60 °C. S ponovnim zvišanjem temperature na 72 °C se termostabilna DNA-polimeraza veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri 5' proti 3' izgradi komplementarno verigo DNA. Tako nastala DNA služi kot matrica za izgradnjo DNA v naslednjem ciklu.

Teoretično se število zelenih podvojenih kopij v vsakem ciklu podvoji, kar pa dejansko ne drži. V začetnih ciklih količina produkta narašča eksponentno. V kasnejših ciklih se reakcija upočasni, dokler ne doseže platoja, ko se reakcija ustavi. To predstavlja omejitev konvencionalnega PCR, ker detekcija produkta poteka po končanem pomnoževanju. Zaradi omenjenih omejitev je PCR v realnem času dosti bolj zanesljiv pri kvantifikaciji končnega produkta.

Produkte, dobljene s PCR v realnem času, lahko detektiramo na več načinov. V osnovi ločimo nespecifične in specifične načine detekcije. Med nespecifične načine detekcije spadajo fluorescenčna barvila, ki se nespecifično vežejo v dvovertižno DNA (etidijev bromid, SYBR Green I). Pri specifičnih načinih detekcije uporabljamo s fluorofori označene nukleotide – sonde, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga želimo pomnožiti (39, 40).

3.3.1. GENOTIPIZACIJA S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI



Slika 10: Prikaz delovanja PCR v realnem času z uporabo hidrolizirajočih sond (42).

Hidrolizirajoče sonde dodamo reakcijski zmesi za PCR. Sonde so kratki oligonukleotidi, ki se specifično vežejo na tarčno zaporedje DNA. Na obeh koncih imajo vezana različna fluorofora. Pri intaktni sondi fluorescenco, ki jo emitira reportersko barvilo, vezano na 5' koncu, prepreči drugo barvilo, dušilec, ki je vezano na 3' koncu. V stopnji podaljševanja povzroči 5'-eksonukleazna aktivnost Taq DNA-polimeraze hidrolizo na tarčno zaporedje

vezane sonde. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča. Tako je onemogočeno prestrezanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila poraste in je sorazmerna s količino produkta - PCR.

Genotipizacijo s hidrolizirajočimi sondami uporabljamo za ugotavljanje znanih točkastih sprememb. Gre za homogen, enostopenjski test (39,40).

3.3.2. PRIPRAVA REAKCIJSKE ZMESI IN IZVEDBA PCR - REAKCIJE

Reakcija PCR je občutljiva na kontaminacijo z drugo DNA, zato smo reakcijsko zmes pripravljali v čistem okolju. Najprej smo očistili delovno komoro in ves pribor s 70% alkoholom ter jih pustili pod UV-lučjo 30 minut. V tem času smo odtalili reagente, nastavili program na aparatu za PCR-reakcijo, preračunali volumne reagentov in pripravili vzorce DNA. PCR-reakcijo smo delali s 96 vzorci. Volumne reagentov za en vzorec smo pomnožili s številom vzorcev, ki smo jih genotipizirali. Zaradi izgub, ki nastanejo pri pipetiranju, smo dodali 10% pribitek reagentov. Volumni reagentov za pripravo reakcijske zmesi za en vzorec in za 96 vzorcev z 10% pribitkom so prikazani v preglednici III.

Preglednica III: Volumni reagentov za pripravo reakcijske zmesi za en vzorec

Reagent	1 vzorec (μL)
5x HOT FIREPol [®] Probe qPCR MIX	1,0
H ₂ O	2,9375
Oligonukleotidi začetniki in sonde/40x	0,0625
DNA (10 ng/μL)	1,0
Skupni volumen	5,0

Delali smo po naslednjem protokolu: ugasnili smo UV-luč, reagente prenesli v komoro in vse dobro premešali. S polavtomatskimi pipetami smo odpipetirali ustrezne volumne reagentov v epruvetke, premešali in centrifugirali. Vzorce DNA-raztopin smo centrifugirali 2 minuti pri 1900 obratih na minuto. Vzeli smo ploščico s 384 vdolbinicami in v vsako vdolbinico z reverznim pipetiranjem odpipetirali po 4,0 μL pripravljene reakcijske zmesi. Nato smo z 12-kanalno polavtomatsko pipeto odpipetirali po 1,0 μL raztopine DNA. Po

končanem pipetiranju smo ploščico pokrili s samolepilno folijo in jo centrifugirali 2 minuti pri 1900 obratih na minuto.

Ploščico smo nato vstavili v aparat LIGHT Cycler 480II in zagnali predhodno nastavljen program. Na začetku smo nastavili 15-minutno preinkubacijo. To je faza denaturacije pri 95 °C, znotraj katere se aktivira Taq DNA-polimeraza. Nato sledi faza prileganja in pomnoževanja, ki sestoji iz 40 ciklov, in sicer se izmenično ponavljajo 15-sekundni (pri 95 °C) in 1-minutni intervali (pri 60 °C). Ohlajanje traja 30 sekund pri 40 °C.

Preglednica IV: Pogoji reakcije PCR v realnem času

Stopnja reakcije	T (°C)	Čas	Število ciklov
Pre-inkubacija	95	15 min	1
Prileganje in podaljševanje	95 60	15 sek 1 min	40
Ohlajanje	40	30 sek	1

3.3.3. MATERIALI IN OPREMA

Reagenti, ki smo jih uporabljali za pripravo reakcijske zmesi:

- vzorčne raztopine DNA
- ultra čista voda
- Reagenčni komplet: Taqman SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), za HFE 63 (rs1799945), št. reagenta: C_1085600_10
- Reagenčni komplet: Taqman SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), za HFE 65 (rs1800730), št. reagenta: C_1085599_20
- Reagenčni komplet: Taqman SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), za HFE 282 (rs1800562), št. reagenta: C_1085595_10
- 5x HOT FIREPol® Probe qPCR MIX, SolisByodyne

Pribor in aparature:

- nastavki za pipete (avtoklavirani)
- polavtomatske pipete 0,1 – 10 μL ; 2 - 20 μL ; 20 – 200 μL (Eppendorf, Nemčija)
- 12 – kanalna polavtomatska pipeta 0,1 – 100 μL (Eppendorf, Nemčija)
- epruvice 1,5 mL (avtoklavirane)
- delovna komora
- mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami in samolepilna folija (Roche Applied Science)
- aparat Light cycler 480 II
- mešalnik Vortex – 2 Genie
- centrifuga Tehnica Železniki
- avtoklav

3.4. STATISTIČNE METODE

Rezultate genotipizacije smo statistično obdelali s statističnim programom SPSS for Windows različica 18.0. Vsem skupinam preiskovancev smo za vsak polimorfizem posebej določili frekvence genotipov in preverili, če so v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

Najprej smo s Kolmogorov-Smirnovim testom preverili, če so spremenljivke normalno porazdeljene. Ugotavljali smo, če obstajajo statistično pomembne razlike med srednjimi vrednostmi (medianami) MKG in kazalci kostne prenove pri posameznih genotipih.

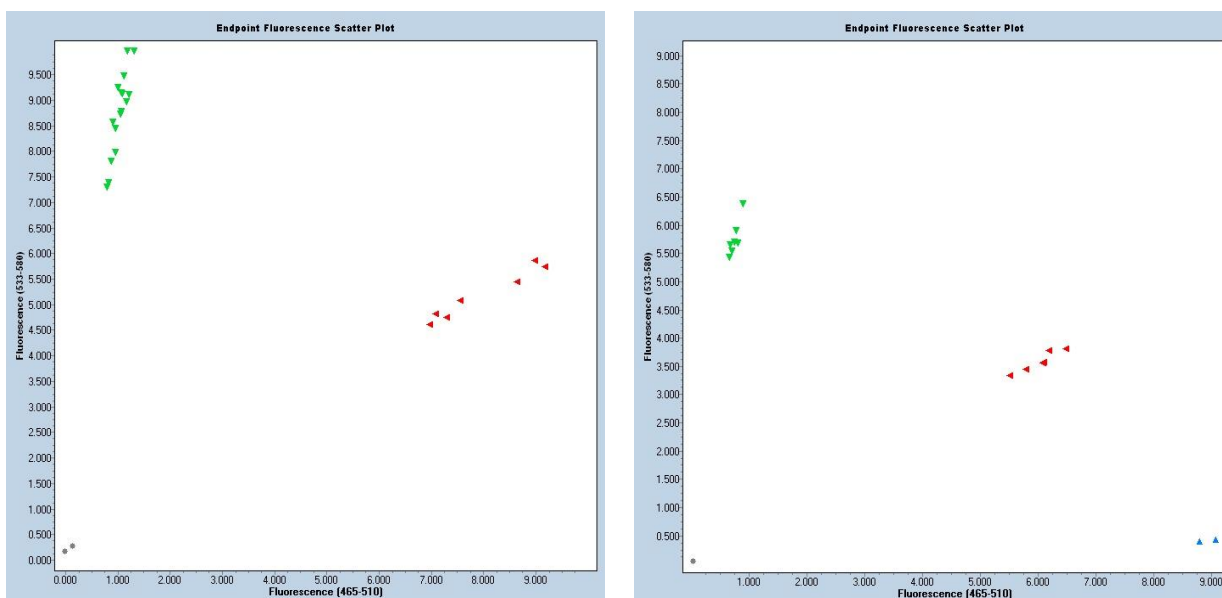
Izvajali smo naslednje teste:

- ANOVA (Analiza variance) – za tri ali več normalno porazdeljenih spremenljivk
- t-test za neodvisne vzorce – za dve normalno porazdeljeni spremenljivki
- Kruskal-Wallis test – za tri ali več nenormalno porazdeljenih spremenljivk
- Mann-Whitney test- za dve nenormalno porazdeljeni spremenljivki

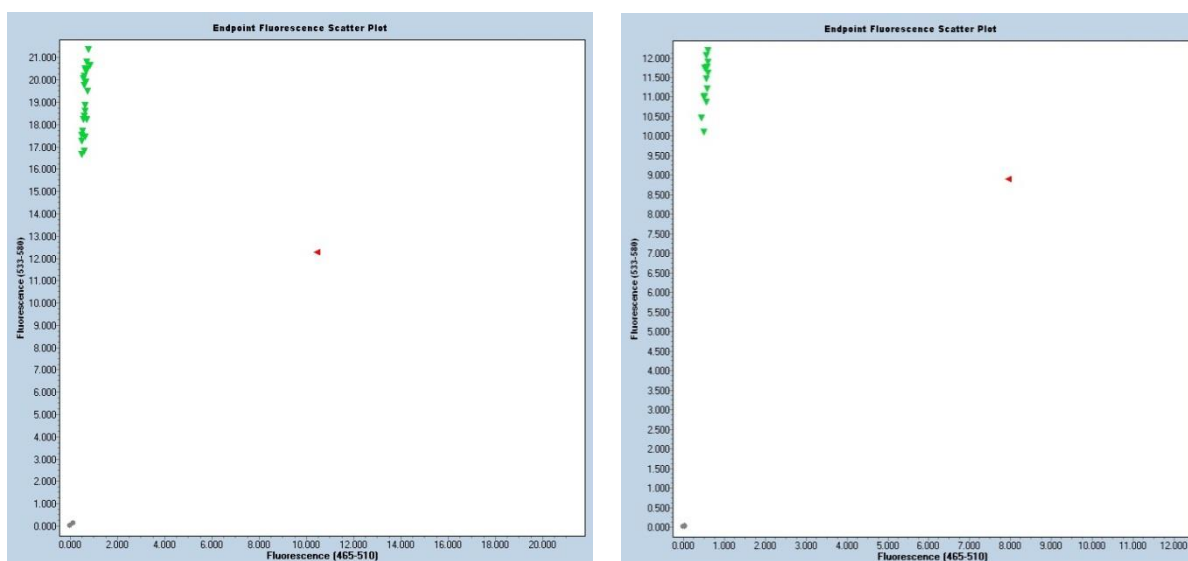
4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. OPTIMIZACIJA POSTOPKA GENOTIPIZACIJE

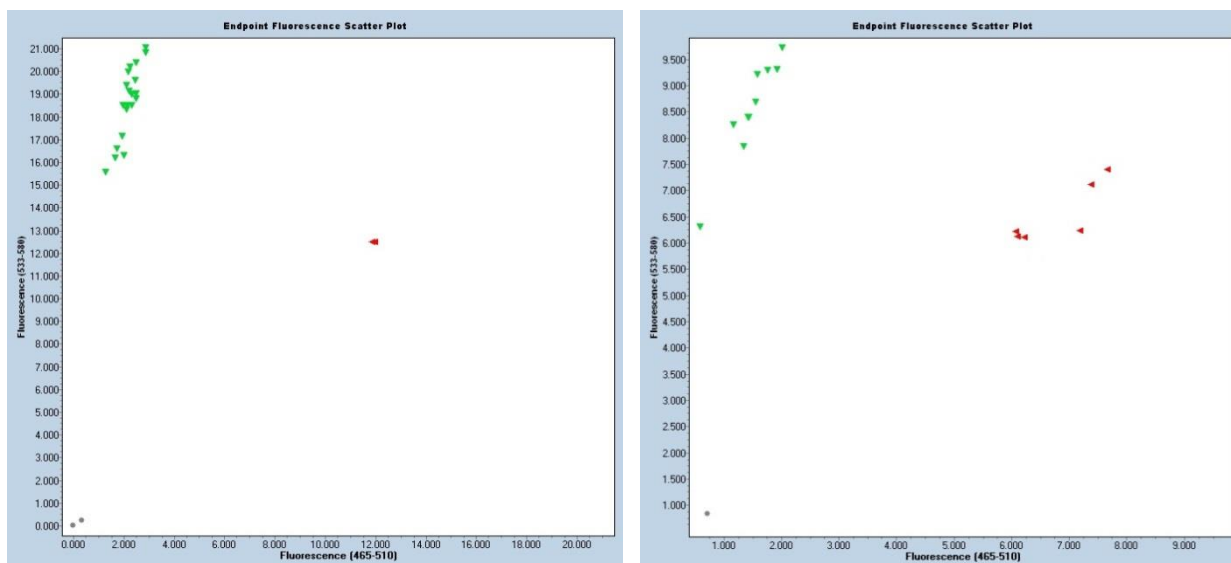
Preiskovancem smo v genomski DNA s hidrolizirajočimi sondami in PCR-reakcijo v realnem času določili genotipe za vsak polimorfizem. Gledali smo, kako je fluorescenca barvila tekem PCR-reakcije porasla. Porast barvila FAM je pomenilo genotip GG pri H63D, TT pri S65C in AA pri C282Y. Porast barvila VIC je pomenilo genotip CC pri H63D, AA pri S65C in GG pri C282Y. Če sta porasli fluorescenci obeh barvil, je to pomenilo prisotnost genotipa CG pri polimorfizmu H63D, AT pri S65C in GA pri C282Y.



Slika 11: Primer prikaza rezultatov genotipizacije za polimorfizem H63D: levo – začetni volumni sond, desno – polovični volumni sond.



Slika 12: Primer prikaza rezultatov genotipizacije za polimorfizem S65C: levo – začetni volumni sond, desno – polovični volumni sond.



Slika 13: Primer prikaza rezultatov genotipizacije za polimorfizem C282Y: levo – začetni volumni sond, desno – polovični volumni sond.

Protokol reakcije, ki ga je predlagal proizvajalec je zajemal 15 minutno začetno denaturacijo pri 94 °C in nato 40-kratno ponovitev cikla pri 60 °C. Reakcijo smo spremenili tako, da smo zmanjšali volumen hidrolizirajočih sond in na račun tega povečali

volumen vode. Genotipi so bili dobro ločeni. Opazili pa smo, da so bile fluorescence barvil nekoliko nižje.

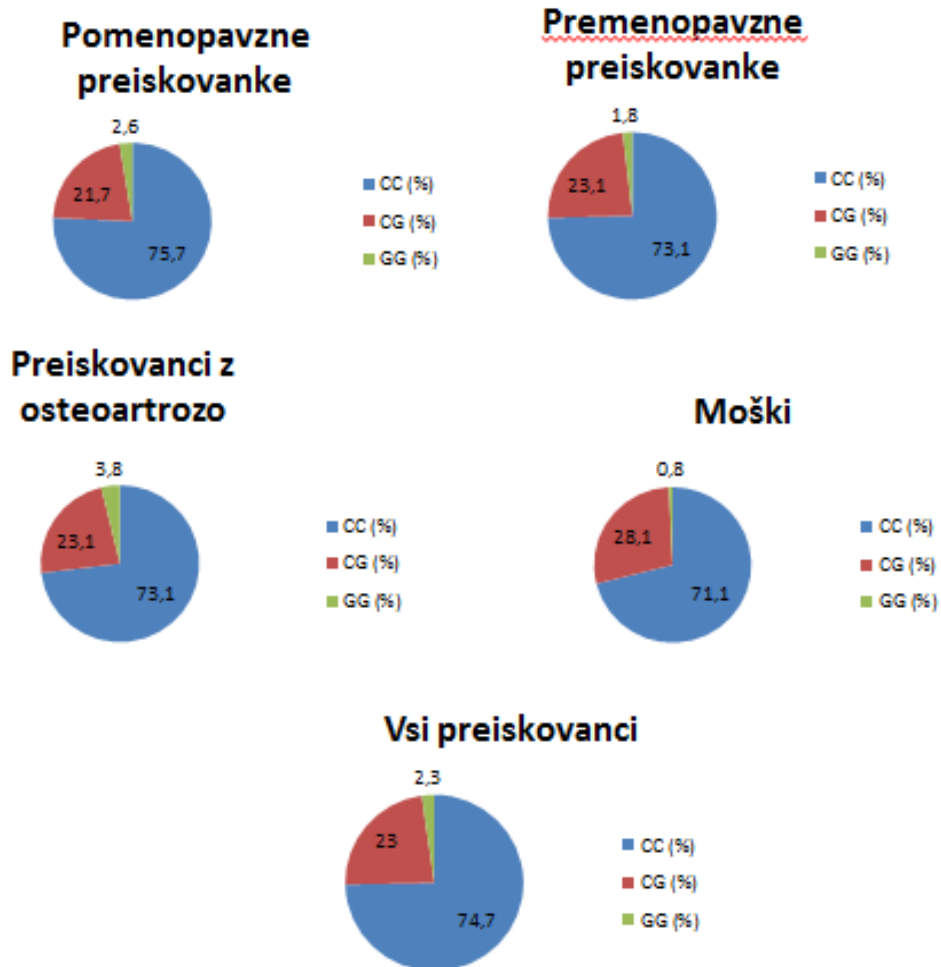
4.2. POGOSTOST POJAVLJANJA POLIMORFIZMOV H63D, S65C IN C282Y V GENU ZA *HFE*

Na osnovi pridobljenih rezultatov smo izračunali frekvence genotipov polimorfizmov H63D, S65C in C282Y v genu za *HFE*. Preiskovance smo razdelili v štiri skupine: pomenopavzne preiskovanke, premenopavzne preiskovanke, preiskovance z osteoartrozo in moške. Frekvence genotipov za posamezne polimorfizme so predstavljene v spodnjih preglednicah.

Preglednica V: Frekvence genotipov za polimorfizem H63D v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih

SKUPINA	CC n (%)	CG n (%)	GG n (%)
pomenopavzne preiskovanke	373 (75,7)	107 (21,7)	13 (2,6)
premenopavzne preiskovanke	43 (75,4)	13 (22,8)	1 (1,8)
preiskovanci z osteoartrozo	38 (73,1)	12 (23,1)	2 (3,8)
moški	91 (71,1)	36(28,1)	1(0,8)
SKUPAJ	545 (74,7)	168 (23,0)	17 (2,3)

Iz preglednice V je razvidno, da se pogostost pojavljanja mutiranega homozigota pri polimorfizmu H63D giblje med 0,8 in 3,8 %. Pri vseh skupinah prevladuje genotip CC (71,1 in 75,7 %). Pri moških smo določili najvišji odstotek heterozigotov.

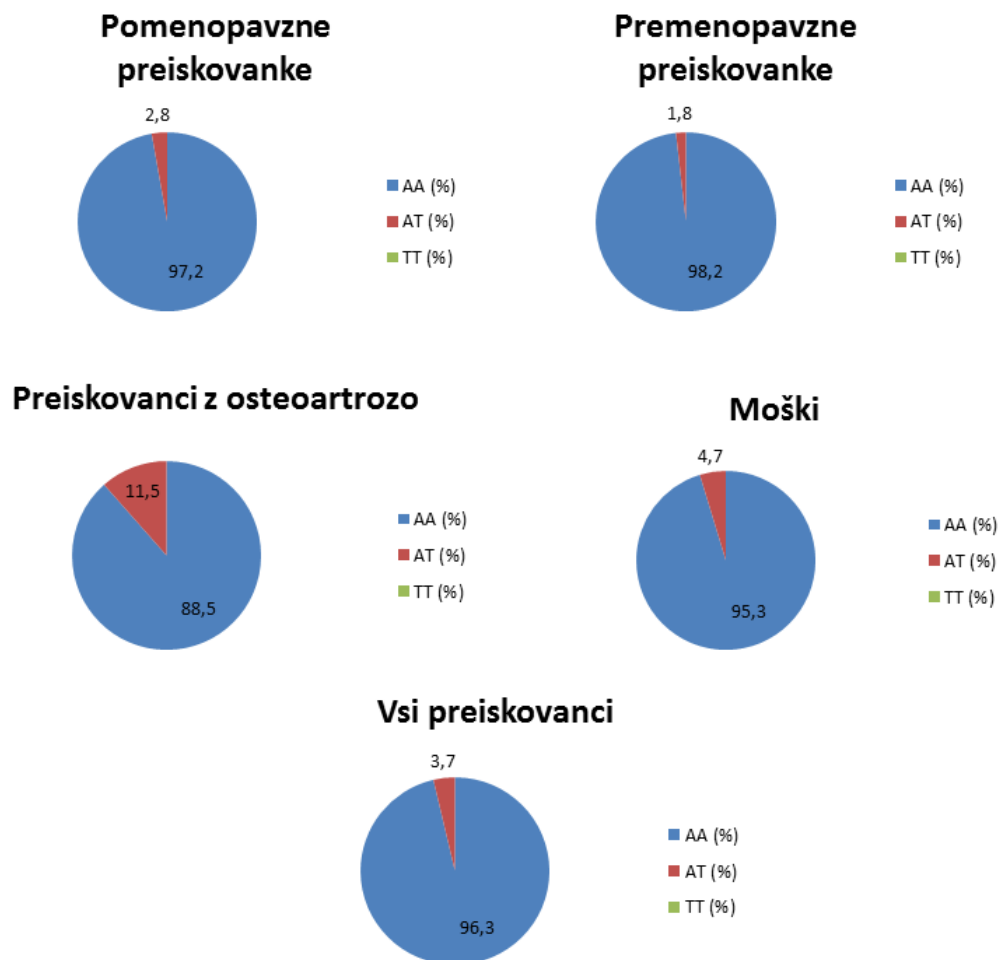


Slika 14: Grafični prikaz frekvence genotipov za polimorfizem H63D v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.

Preglednica VI: Frekvence genotipov za polimorfizem S65C v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih

SKUPINA	AA n (%)	AT n (%)	TT n (%)
pomenopavzne preiskovanke	485 (97,6)	12 (2,4)	0 (0,0)
premenopavzne preiskovanke	56 (98,2)	1 (1,8)	0 (0,0)
preiskovanci z osteoartrozo	46 (88,5)	6 (11,5)	0 (0,0)
moški	122 (95,3)	6 (4,7)	0 (0,0)
SKUPAJ	709 (96,3)	25 (3,7)	0 (0,0)

Preglednica VI prikazuje frekvence genotipov za polimorfizem S65C po skupinah. V tem primeru nismo določili nobenega mutiranega homozigota pri nobeni skupini. Prevladujejo normalni homozigoti (88,5 – 98,2 %). Največ heterozigotov smo določili v skupini preiskovancev z osteoartrozo (11,5 %).

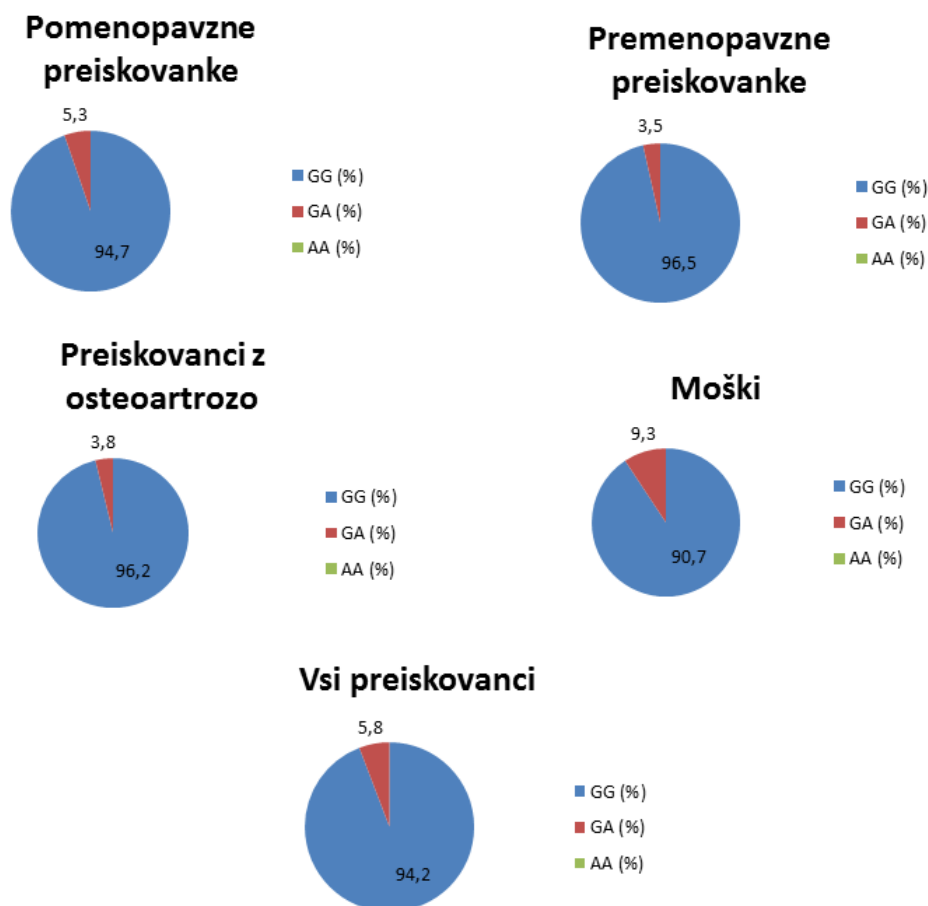


Slika 15: Grafični prikaz frekvence genotipov za polimorfizem S65C v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.

Preglednica VII: Frekvence genotipov za polimorfizem C282Y v posameznih skupinah skupin in pri vseh preiskovancih

SKUPINA	GG n (%)	GA n (%)	AA n (%)
pomenopavzne preiskovanke	466 (94,7)	26 (5,3)	0 (0,0)
premenopavzne preiskovanke	55 (96,5)	2 (3,5)	0 (0,0)
preiskovanci z osteoartrozo	50 (96,2)	2 (3,8)	0 (0,0)
moški	117 (90,7)	12 (9,3)	0 (0,0)
SKUPAJ	688 (94,2)	42 (5,8)	0 (0,0)

Pri polimorfizmu C282Y (preglednica VII) nismo določili nobenega mutiranega homozigota. Največ heterozigotov smo določili pri moških (9,3 %). Prevladuje normalni homozigot pri vseh skupinah (90,7 – 96,2 %).



Slika 16: Grafični prikaz frekvence genotipov za polimorfizem C282Y v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih.

Hardy-Weinbergovo ravnotežje predpostavlja, da v neskončno veliki populaciji, v kateri ne prihaja do naključnih genetskih odmikov in novih mutacij, ostaja relativna frekvenca različnih genotipov (alelov) konstantna skozi generacije. S pomočjo χ^2 -testa smo preverili, če so frekvence genotipov v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Število posameznih frekvenc genotipov smo primerjali s pričakovanim številom in ugotovili, da so vsi trije polimorfizmi v Hardy-Weinbergovem ravnotežju ($p=0,349$ za polimorfizem H63D, $p=0,136$ za polimorfizem S65C in $p=0,180$ za polimorfizem C282Y).

Vsem trem polimorfizmom smo izračunali tudi alelni frekvence, ki so predstavljene v spodnjih preglednicah.

Preglednica VIII: Alelna frekvenca za polimorfizem H63D v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih

SKUPINA	C (%)	G (%)
pomenopavzne preiskovanke	86,5	13,5
premenopavzne preiskovanke	86,0	13,2
preiskovanci z osteoartrozo	84,7	15,3
moški	85,2	14,8
SKUPAJ	86,2	13,8

Preglednica IX: Alelna frekvenca za polimorfizem S65C v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih

SKUPINA	A (%)	T (%)
pomenopavzne preiskovanke	98,8	1,2
premenopavzne preiskovanke	99,1	0,9
preiskovanci z osteoartrozo	94,2	5,8
moški	97,7	2,3
SKUPAJ	98,3	1,7

Preglednica X: Alelna frekvenca za polimorfizem C282Y v posameznih skupinah in pri vseh preiskovancih

SKUPINA	G (%)	A (%)
pomenopavzne preiskovanke	97,4	2,6
premenopavzne preiskovanke	98,2	1,8
preiskovanci z osteoartrozo	98,1	1,9
moški	95,3	4,7
SKUPAJ	96,9	3,1

Frekvenca mutiranega alela je pri naših preiskovancih za polimorfizem H63D znašala 13,8 %, za polimorfizem S65C 1,7 %, za polimorfizem C282Y pa 3,1 %. M. Cukjati je s sodelavci v svoji študiji določil alelne frekvence na slovenski populaciji, in sicer za polimorfizem H63D 12,8 %, S65C 1,7 % in C282Y pa 3,6 % (37). Pri naši raziskavi smo dobili podobne alelne frekvence za vse tri polimorfizme (χ^2 -test; $p=0,542$ za polimorfizem H63D, $p=0,804$ za polimorfizem S65C in $p=0,327$ za polimorfizem C282Y).

4.3. POVEZANOST POLIMORFIZMOV H63D, S65C IN C282Y V GENU ZA *HFE* Z MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN BIOKEMIJSKIMI KAZALCI KOSTNE PRENOVE

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali imajo polimorfizmi H63D, S65C in C282Y v genu *HFE* vpliv na MKG in biokemijske kazalce kostne prenove. Polimorfizmi H63D, S65C in C282Y v genu *HFE* povzročijo, da se železo prekomerno absorbira v črevesju. Koncentracija železa je posledično močno povišana in železo se kopiči v raznih organih in povzroča njihovo okvaro. Prevelike koncentracije železa v organizmu povzročajo nastanek ROS in so vzrok za pojav oksidativnega stresa. V številnih študijah je bilo dokazano, da železo v velikih koncentracijah negativno vpliva na osteoblaste in posledično na zmanjšanje MKG. Biokemijski kazalci presnove kosti so pomemben pokazatelj trenutnih procesov v kosteh.

Naše preiskovance smo razdelili v 4 skupine: pomenopavzne preiskovanke (zdrave in osteoporozne), premenopavzne preiskovanke, preiskovance z osteoartrozo in moške (zdravi in osteoporozni). S tako izbranimi skupinami bomo dobili vpogled vpliva polimorfizmov H63D, S65C in C282Y v genu *HFE* glede na bolezensko stanje (osteoporoza, osteoartroza) oz. spol (ženske, moški).

Za statistično obdelavo smo imeli na voljo vrednosti meritev MKG pri skoraj vseh genotipiziranih vzorcih (genotipizirali smo 730 vzorcev, statistično smo jih obdelali 679). Vrednosti biokemijskih kazalcev kostne prenove so bile na voljo le pri majhnem številu vzorcev. Zato bomo večjo težnjo pri interpretaciji rezultatov namenili statistični analizi MKG.

Genotipom v posameznih skupinah smo izračunali srednje vrednosti oz. mediane MKG in biokemijskih kazalcev kostne prenove ter preverili ali obstajajo statistične razlike med njimi.

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

Preiskovancem smo poleg MKG in biokemijski kazalcev kostne preнове izmerili še naslednje parametre (preglednica XI).

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

Skupina	Pomenopavzne preiskovanke	Premenopavzne preiskovanke	Preiskovanci osteoartrozo	Moški
število	483	56	49	95
Višina (cm)	159,7±6,2	163,9±6,1	164,9±7,2	171,5±6,3
Starost (leta)	64,5±9,5	45,6±4,7	63,7±11,6	68,4±7,1
Masa (kg)	69,4±12,2	65,4±11,6	76,1±14,0	81,0±12,5
ITM	27,2±4,5	24,3±4,0	27,9±4,6	27,5±3,8
Pričetek menopavze (starost)	49,1±4,6	/	/	/
Trajanje menopavze (leta)	12,7±9,1	/	/	/

4.3.1. POMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V raziskavo smo vključili 483 pomenopavznih preiskovank (271 osteoporoznih, 210 zdravih). Z metodo DXA so jim izmerili MKG kolka, vratu stegenice ter ledvenih vretenc. V preglednicah so prikazane srednje vrednosti oz. mediane in rezultati statistične analize vpliva polimorfizmov H63D, S65C in C282Y na MKG in biokemijske kazalce kostne preнове.

Preglednica XII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem **H63D** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N=število preiskovank)

Genotip	CC	CG	GG	p-vrednost
MKGfn* (kg/m ²)	0,661(0,606;0,744) N=364	0,685(0,615;0,766) N=105	0,661(0,593;0,731) N=13	0,270
MKGtot* (kg/m ²)	0,809(0,726;0,894) N=364	0,826(0,719;0,902) N=105	0,705(0,651;0,843) N=13	0,130
MKGls* (kg/m ²)	0,812(0,740;0,955) N=364	0,834(0,759;0,953) N=105	0,924(0,713;1,032) N=13	0,902
RANKL** (pmol/l)	0,300(0,300;0,400) N=41	0,300(0,250;0,350) N=9	/	0,048
OC (μg/l)	14,759±5,924 N=41	15,644±6,232 N=9	/	0,310
CTX (pmol/l)	4120,68 ±1785,52 N=41	5013,56 ±2395,43 N=9	/	0,850
BALP** (μg/l)	10,70 (8,87;13,75) N=41	14,00 (11,65;15,80) N=9	/	0,710
OPG (pmol/l)	4,388±1,039 N=41	4,198±1,238 N=9	/	0,965
Katepsin K**	2,00(0,80;3,80) N=41	1,30(0,75;6,65) N=13	/	0,816

Brez zvezdice –: t-test

*Kruskal-Wallis test

**Mann-Whitney test

S statistično analizo nismo ugotovili vpliva polimorfizma H63D na MKG pri pomenopavznih preiskovankah (vse p-vrednosti so večje od 0,05). Statistično pomembno razliko smo ugotovili pri vrednosti RANKL ($p=0,048$). RANKL je ključni mediator kostne razgradnje v menopavzi. Iz preglednice XII je razvidno, da nismo imeli nobenega mutiranega homozigota za statistično analizo. Heterozigotov je bilo samo 9, zato težko ocenjujemo vpliv polimorfizma H63D na vrednosti RANKL. Rezultat ni v skladu z našimi pričakovanji.

Nato smo združili genotipe in ponovno izvedli statistično analizo. Najprej smo združili heterozigote in mutirane (CG + GG) homozigote. Vpliva polimorfizma H63D na MKG nismo uspeli dokazati. Statistične analize ni bilo možno izvesti pri biokemijskih kazalcih kostne preнове, ker nismo imeli meritev pri mutiranem homozigotu. Potem smo združili normalne homozigote in heterozigote (CC +CG). Statistično značilno razliko smo določili pri MKG_{tot} ($p=0,046$). Mutirani homozigoti imajo nižjo MKG_{tot} (mediana pri CC+CG je $0,812 \text{ kg/m}^2$, pri GG pa $0,705 \text{ kg/m}^2$). Rezultat je v skladu z našimi pričakovanji, saj se v menopavzi železo že kopiči.

Preglednica XIII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem **S65C** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N=število preiskovank)

Genotip	AA	AT	p-vrednost
MKGfn* (kg/m ²)	0,668(0,605;0,749) N=474	0,654(0,572;0,721) N=12	0,275
MKGtot* (kg/m ²)	0,815(0,723;0,894) N=474	0,750(0,635;0,810) N=12	0,049
MKGls* (kg/m ²)	0,814(0,743;0,955) N=474	0,787(0,711;0,982) N=12	0,343
RANKL* (pmol/l)	0,300(0,300;0,400) N=48	0,500(0,300;)/ N=2	0,788
OC* (μ g/l)	13,65(11,80;18,18) N=48	13,80(9,30;)/ N=2	0,335
CTX (pmol/l)	4311,56 \pm 1916,14 N=48	3557,50 \pm 2378,00 N=2	0,444
BALP* (μ g/l)	11,20 (9,11;14,23) N=48	14,36 (9,22;)/ N=2	0,237
OPG (pmol/l)	4,39 \pm 1,07 N=48	3,46 \pm 0,03 N=2	0,214
Katepsin K* (pmol/l)	1,85 (0,75;3,80) N=48	4,05 (2,40;)/ N=2	0,606

Brez zvezdice: t-test

*Mann-Whitney test

Preglednica XIV: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri pomenopavznih preiskovankah za polimorfizem **C282Y** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N=število preiskovank)

Genotip	GG	GA	p-vrednost
MKGfn* (kg/m ²)	0,670(0,608;0,751) N=456	0,632(0,565;0,725) N=28	0,751
MKGtot* (kg/m ²)	0,811(0,723;0,896) N=456	0,758(0,669;0,879) N=28	0,040
MKGls* (kg/m ²)	0,814(0,742;0,957) N=456	0,812(0,751;0,898) N=28	0,151
RANKL* (pmol/l)	0,300(0,300;0,400) N=48	0,350(0,300; /) N=2	0,769
OC* (μ g/l)	13,65(11,80;18,18) N=48	14,30(10,10; /) N=2	0,322
CTX (pmol/l)	4253,23 \pm 1905,17 N=48	4957 \pm 2786,71 N=2	0,825
BALP* (μ g/l)	11,20(9,23;14,45) N=48	11,07(8,74; /) N=2	0,167
OPG (pmol/l)	4,35 \pm 1,09 N=48	4,39 \pm 0,11 N=2	0,900
Katepsin K*	1,95(0,75;3,80) N=48	2,25(1,80; /) N=2	0,432

Brez zvezdice: t-test
*Mann-Whitney test

Združili smo genotipske podskupine pri polimorfizmu S65C (preglednica XIII), ker nismo določili nobenega mutiranega homozigota. S statistično analizo smo pri pomenopavznih preiskovankah ugotovili statistično značilne razlike pri MKG kolka ($p=0,049$). Heterozigoti imajo nižjo MKG_{tot}. Zaključimo lahko, da je vpliv polimorfizma S65C na MKG_{tot} tudi pri heterozigotih. Za statistično obdelavo vrednosti biokemijskih kazalcev kostne preнове, smo imeli malo meritev v primerjavi z meritvami MKG. Pri biokemijskih kazalcih kostne preнове nismo ugotovili statistično pomembnih razlik. Razlike so vidne med medianami koncentracij BALP in katepsina K, vendar so njihove p-vrednosti večje od 0,05.

Tudi pri polimorfizmu C282Y (preglednica XIV) nismo določili nobenega mutiranega homozigota. S statistično analizo polimorfizma C282Y smo ugotovili statistično značilne razlike pri MKG kolka ($p=0,040$). Pri heterozigotih smo ugotovili nižjo MKG_{tot}. Lahko sklepamo, da prisotnost polimorfizmov v heterozigotni obliki tudi prispeva k obolevnosti za osteoporozo. Pri biokemijskih kazalcih kostne preнове nismo ugotovili statistično značilnih razlik med genotipskimi podskupinami.

Pri pomenopavznih preiskovankah smo dokazali vpliv vseh treh polimorfizmov na MKG_{tot}. Pri vseh treh polimorfizmih smo ugotovili nižjo MKG_{tot} bodisi pri mutiranih homozigotih ali pri heterozigotih. Rezultat je pričakovan, ker gre za starejše ženske (povprečna starost je 64,5 let) in so že v menopavzi. Železo se v menopavzi že kopiči in negativno vpliva na MKG.

4.3.2. PREMENOPAVZNE PREISKOVANKE

V raziskavo smo vključili 56 premenopavznih (zdravih) preiskovank. Z metodo DXA so jim izmerili MKG kolka, vratu stegenice ter ledvenih vretenc. V preglednicah so prikazane srednje vrednosti oz. mediane in rezultati statistične analize vpliva polimorfizmov H63D, S65C in C282Y na MKG in biokemijske kazalce kostne preнове.

Preglednica XV: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne prenove pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem **H63D** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N=število preiskovank)

Genotip	CC	CG + GG	p-vrednost
MKGfn (kg/m ²)	0,722 \pm 0,071 N=42	0,791 \pm 0,095 N=15	0,319
MKGtot (kg/m ²)	0,909 \pm 0,081 N=42	0,934 \pm 0,102 N=15	0,305
MKGls (kg/m ²)	0,995 \pm 0,110 N=41	0,987 \pm 0,113 N=15	0,969
RANKL* (pmol/l)	0,300(0,300;0,500) N=41	0,400(0,200;0,650) N=13	0,582
OC* (μ g/l)	8,90(7,40;13,40) N=41	9,90(7,48;14,93) N=13	0,487
CTX* (pmol/l)	2845,00 \pm 1385,34 N=41	1933,31 \pm 1191,17 N=13	0,043
BALP (μ g/l)	8,544 \pm 3,104 N=41	7,511 \pm 3,112 N=13	0,337
OPG (pmol/l)	3,904 \pm 0,879 N=41	3,900 \pm 0,989 N=13	0,530
Katepsin K*	2,00(0,80;9,40) N=41	1,95(0,73;4,95) N=13	0,820

Brez zvezdice: t-test

*Kruskal-Wallis test

Pri statistični analizi smo združili genotipe. Najprej smo združili heterozigote in mutirane homozigote. Vpliva polimorfizma H63D na MKG nismo uspeli dokazati. Statistično pomembno razliko smo določili pri CTX ($p=0,043$). Vrednosti CTX so bile nižje pri heterozigotih in mutiranih homozigotih. CTX je kazalec kostne razgradnje, torej imajo preiskovanke z enim ali dvema aleloma G manj povečan proces razgradnje kosti kot preiskovanke z dvema aleloma C. Tega rezultata nismo pričakovali in ga ne znamo pojasniti. Premenopavzne preiskovanke so relativno mlade ženske (povprečna starost je 45,6 let). Železo se še ne kopiči, torej še nima negativnih posledic. Pri ostalih kazalcih kostne razgradnje nismo uspeli dokazati pomembne statistične razlike. Nato smo združili normalne homozigote in heterozigote. S statistično analizo nismo uspeli dokazati vpliva polimorfizma na MKG. Statistične analize nismo izvedli pri biokemijskih kazalcih kostne preнове, ker nismo imeli vrednosti pri mutiranem homozigotu.

Preglednica XVI: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne preнове pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem **S65C** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N=število preiskovank)

Genotip	AA	AT	p-vrednost
MKGfn (kg/m ²)	0,997 \pm 0,110 N=55	0,640 N=1	/
MKGtot (kg/m ²)	0,917 \pm 0,086 N=55	0,837 N=1	/
MKGls (kg/m ²)	0,781 \pm 0,074 N=55	0,938 N=1	/
RANKL* (pmol/l)	0,300(0,300;0,500) N=53	0,500 N=1	/
OC* (μ g/l)	9,80(7,40;13,85) N=53	11,30 N=1	/
CTX (pmol/l)	2696,68 \pm 1397,75 N=53	2225 N=1	/
BALP (μ g/l)	8,25 \pm 3,09 N=53	11,00 N=1	/
OPG (pmol/l)	3,95 \pm 0,95 N=53	3,63 N=1	/
Katepsin K*	2,00(0,80;6,95) N=53	14,40 N=1	/

Brez zvezdice: t-test

*Kruskal-Wallis test

Pri polimorfizmu S65C pri premenopavznih preiskovankah nismo mogli izvesti statistične analize, ker smo določili samo eden heterozigot. Namesto srednjih vrednosti oz. median smo vpisali izmerjene vrednosti MKG in biokemijskih kazalcev kostne preнове.

Preglednica XVII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev in kazalcev kostne prenovne pri premenopavznih preiskovankah za polimorfizem **C282Y** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, RANKL – ligand receptorja za aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B, OC – osteokalcin, CTX – C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N=število preiskovank)

Genotip	GG	GA	p-vrednost
MKGfn (kg/m ²)	0,775 \pm 0,075 N=52	0,864 \pm 0,043 N=2	0,104
MKGtot (kg/m ²)	0,914 \pm 0,084 N=52	0,975 \pm 0,132 N=2	0,326
MKGls (kg/m ²)	0,955 \pm 0,111 N=52	0,995 \pm 0,097 N=2	0,997
RANKL* (pmol/l)	0,300(0,300;0,500) N=52	0,450(0,300;/) N=2	0,706
OC* (μ g/l)	9,40(7,30;13,93) N=52	11,55(10,00;/) N=2	0,618
CTX (pmol/l)	2748,80 \pm 137,10 N=52	1105,50 \pm 861,96 N=2	0,093
BALP (μ g/l)	8,35 \pm 3,07 N=52	7,02 \pm 4,2 N=2	0,570
OPG (pmol/l)	3,99 \pm 0,92 N=52	2,80 \pm 1,22 N=2	0,068
Katepsin K* (pmol/l)	2,10(0,83;8,48) N=52	1,20(0,30;/) N=2	0,356

Brez zvezdice: t-test

*Kruskal-Wallis test

S statistično obdelavo podatkov nismo uspeli dokazati vpliva polimorfizma C282Y ne na MKG ne na biokemijske kazalce kostne prenovne (vse p-vrednosti so bile večje od 0,05).

Pri premenopavznih preiskovankah prav tako nismo dokazali nobenega mutiranega homozigota pri polimorfizmu C282Y.

V skupini premenopavznih preiskovank nismo uspeli dokazati vpliva nobenega polimorfizma na MKG. Statistično je bila pomembna razlika samo pri polimorfizmu H63D na CTX, pri ostalih biokemijskih kazalcih kostne preнове nismo dokazali vpliva nobenega od preučevanih polimorfizmov.

4.3.3. PREISKOVANCI Z OSTEOARTROZO

V raziskavo smo vključili 49 preiskovancev z osteoartrozo. Z metodo DXA so jim izmerili MKG kolka, vratu stegenice ter ledvenih vretenc. V preglednicah so prikazane srednje vrednosti oz. mediane in rezultati statistične analize vpliva polimorfizmov H63D, S65C in C282Y na MKG.

Preglednica XVIII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri preiskovancih z osteoartrozo za polimorfizem **H63D** (MKG_{fn} – MKG vratu stegenice, MKG_{tot} – MKG kolka, MKG_{ls} – MKG ledvenih vretenc, N=število preiskovancev)

Genotip	CC	CG	GG	p-vrednost
MKG _{fn} (kg/m ²)	0,792 \pm 0,167 N=36	0,729 \pm 0,124 N=11	0,829 \pm 0,058 N=2	0,483
MKG _{tot} (kg/m ²)	0,941 \pm 0,188 N=36	0,855 \pm 0,121 N=11	0,970 \pm 0,204 N=2	0,357
MKG _{ls} (kg/m ²)	0,969 \pm 0,221 N=36	0,822 \pm 0,144 N=11	1,151 \pm 0,333 N=2	0,245

ANOVA

Polimorfizem H63D v genu za *HFE* pri preiskovancih z osteoartrozo ne vpliva na MKG (p-vrednosti so večje od 0,05). Pri tej skupini nismo imeli na voljo vrednosti biokemijskih kazalcev kostne preнове za statistično analizo. Tudi ko smo združevali genotipe za statistično analizo, nismo uspeli dokazati vpliva polimorfizma na MKG.

Preglednica XIX: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri preiskovancih z osteoartrozo za polimorfizem **S65C** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, N=število preiskovancev)

Genotip	AA	AT	p-vrednost
MKGfn (kg/m ²)	0,976 \pm 0,215 N=43	0,823 \pm 0,147 N=6	0,495
MKGtot (kg/m ²)	0,933 \pm 0,173 N=43	0,850 \pm 1,974 N=6	0,291
MKGls (kg/m ²)	0,785 \pm 0,147 N=43	0,736 \pm 0,224 N=6	0,080

T-test

S statistično analizo nismo ugotovili statistično pomembnih razlik posameznih genotipov polimorfizmov S65C na MKG. Pri osteoartroznih preiskovancih pri polimorfizmu S65C nismo uspeli dokazati nobenega mutiranega homozigota.

Preglednica XX: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri preiskovancih z osteoartrozo za polimorfizem **C282Y** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, N=število preiskovancev)

Genotip	GG	GA	p-vrednost
MKGfn (kg/m ²)	0,776 \pm 0,156 N=48	0,957 N=1	/
MKGtot (kg/m ²)	0,919 \pm 0,175 N=48	1,121 N=1	/
MKGls (kg/m ²)	0,955 \pm 0,214 N=48	1,098 N=1	/

Pri polimorfizmu C282Y pri preiskovancih z osteoartrozo nismo mogli izvesti statistične analize, ker smo določili samo enega heterozigota. Namesto srednjih vrednosti oz. median smo zanj vpisali izmerjene vrednosti MKG.

4.3.4. MOŠKI PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 95 moških preiskovancev (27 osteoporoznih in 68 zdravih). Z metodo DXA so jim izmerili MKG kolka, vratu stegenice ter ledvenih vretenc. V preglednicah so prikazane srednje vrednosti oz. mediane in rezultati statistične analize vpliva polimorfizmov H63D, S65C in C282Y na MKG.

Preglednica XXI: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških preiskovancih za polimorfizem **H63D** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, N=število preiskovancev)

Genotip	CC	CG	GG	p-vrednost
MKGfn (kg/m ²)	0,787 \pm 0,147 N=69	0,805 \pm 0,193 N=22	0,841 \pm 0,073 N=4	0,473
MKGtot (kg/m ²)	0,978 \pm 0,155 N=69	1,040 \pm 0,228 N=22	1,002 \pm 0,150 N=4	0,197
MKGls* (kg/m ²)	1,063(0,909;1,160) N=69	1,006(0,931;1,143) N=22	1,221(0,937;1,458) N=4	0,245

Brez zvezdice:ANOVA; *-Mann-Whitney test

Preglednica XXII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških preiskovancih za polimorfizem **S65C** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, N=število preiskovancev)

Genotip	AA	AT	p-vrednost
MKGfn (kg/m ²)	0,787 \pm 0,154 N=89	0,891 \pm 0,162 N=6	0,113
MKGtot (kg/m ²)	0,987 \pm 0,176 N=89	1,091 \pm 0,129 N=6	0,157
MKGls* (kg/m ²)	1,017(0,916;1,160) N=89	1,085(1,028;1,243) N=6	0,228

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

Preglednica XXIII: Srednje vrednosti \pm SD/mediane (25. in 75. percentil) in p-vrednosti statistične analize MKG-jev pri moških preiskovancih za polimorfizem **C282Y** (MKGfn – MKG vratu stegenice, MKGtot – MKG kolka, MKGls – MKG ledvenih vretenc, N=število preiskovancev)

Genotip	GG	GA	p-vrednost
MKGfn (kg/m ²)	0,788 \pm 0,145 N=84	0,836 \pm 0,223 N=11	0,337
MKGtot (kg/m ²)	0,991 \pm 0,172 N=84	1,008 \pm 0,201 N=11	0,760
MKGls* (kg/m ²)	1,063(0,915;1,162) N=84	1,028(0,947;1,209) N=11	0,340

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

Pri moških preiskovancih nismo ugotovili statistično značilnih razlik v MKG med genotipskimi podskupinami polimorfizmov H63D, S65C in C282Y. Pri polimorfizmu H63D smo združevali genotipe in prav tako nismo ugotovili nobene statistično pomembne razlike. Pri polimorfizmih S65C in C282Y nismo določili nobenega mutiranega homozigota. Za statistično obdelavo biokemijskih parametrov kostne preнове nismo imeli podatkov.

5. SKLEP

V magistrskem delu smo ugotavljali vpliv polimorfizmov H63D, S65C in C282Y v genu *HFE* na MKG in biokemijske kazalce kostne preнове. Naša hipoteza je bila, da prisotnost polimorfizmov, ki imajo za posledico nalaganje železa v organizmu, vpliva na MKG in biokemijske kazalce kostne preнове. Posledica bi lahko bila razvoj osteoporoze in osteoartroze.

- Frekvenca mutiranega alela polimorfizma H63D je v naši raziskavi bila 13,8%, polimorfizma S65C 1,7%, polimorfizma C282Y pa 3,1%. V študiji na slovenski populaciji so določili podobne alelne frekvence, in sicer za polimorfizem H63D 12,8%, S65C 1,7%, C282Y pa 3,6% ($p=0,542$ za polimorfizem H63D, $p=0,804$ za polimorfizem S65C in $p=0,327$ za polimorfizem C282Y).
- Pri pomenopavznih preiskovankah smo s statistično analizo ugotovili vpliv vseh treh polimorfizmov na MKG kolka ($p=0,046$ pri polimorfizmu H63D, $p=0,049$ pri polimorfizmu S65C, $p=0,040$ pri polimorfizmu C282Y). Pri vseh teh polimorfizmih smo ugotovili znižanje MKG bodisi pri mutiranih homozigotih ali pri heterozigotih. Statistično pomemben vpliv polimorfizma H63D smo dokazali tudi na RANKL ($p=0,048$).
- Pri premenopavznih preiskovankah nismo uspeli dokazati vpliva nobenega od treh polimorfizmov na MKG. Statistično so bile pomembne razlike pri polimorfizmu H63D na CTX ($p=0,043$). Koncentracije CTX so bile nižje pri heterozigotih. Pri ostalih dveh polimorfizmih nismo ugotovili statistično značilnih razlik na biokemijske kazalce kostne preнове.
- Pri preiskovancih z osteoartrozo in moških preiskovancih nismo ugotovili vpliva polimorfizmov H63D, S65C in C282Y na MKG. Za statistično obdelavo biokemijskih kazalcev kostne preнове pri obeh skupinah nismo imeli podatkov.

Osteoporoza in osteoartroza spadata med multifaktorske bolezni. Na njun razvoj bi lahko delno prispevali tudi polimorfizmi H63D, S65C in C282Y v genu *HFE*. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da polimorfizmi gena *HFE* vplivajo na MKG pri pomenopavznih preiskovankah in prispevajo k obolevnosti za osteoporozo. Pri ostalih skupinah, ki so bile po številu preiskovancev bistveno manjše, vpliva polimorfizmov nismo uspeli dokazati. Raziskavo bi bilo zato potrebno razširiti na več preiskovancev.

6. LITERATURA

1. A. Kocijančič. Presnovne bolezni kosti V: Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D.: Interna medicina, 3. Izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005: 898-900, 916-924.
2. Biology of bone. V: Barti R, Frisch LC. Osteoporosis: diagnosis, prevention, therapy. Springer- Verlag, 2009: 9.
3. R. Baron. Anatomy and ultrastructure of bone-histogenesis, growth and remodeling, Chapter 1: 2008, Dostopno na: <http://www.endotext.org>. Dostop: 23.04.2013
4. S. C. Manolagas, R. L. Jilka. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling, Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. The New England Journal of Medicine 1995; 332(5):305-311.
5. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatol Port. 2007 Apr-Jun; 32(2):103-10.
6. L. Bonewald. Osteocytes as multifunctional cells. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006; 6(4): 331–333.
7. Steven L. Teitelbaum. Bone Resorption by Osteoclasts. Science 1 September 2000: Vol. 289 no. 5484: 1504-1508.
8. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003 May 15;423(6937):337-42.
9. M. Pal, I. Kranjc . Osteoimunologija: RANKL/RANK/OPG citokinski sistem. Medicinski mesečnik; Marec-April 2008: 94-97.
10. A. Meh, Š. Sprogar, G. Drevenšek, M. Drevenšek. Presnova čeljustne kosti in modeli njenega preučevanja. Zobozdravstveni Vestnik 2011; 66: 18-24.
11. *Osteoporozna kost*. Dostopno na: <http://primarna-medicina.com/slo/kako-premagati-osteoporozo/>. Dostop: 14.04.2013

12. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Guideline no. 71. Management of osteoporosis. Dostopno na: <http://www.sign.ac.uk/guidelines/fulltext/71/section3.html>. Dostop: 25.04.2013
13. A.G. Uitterlinden, J.B.J. van Meurs¹, F. Rivadeneira, H.A.P. Pols. Identifying genetic risk factors for osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6(1):16-26.
14. Markus J Seibel. Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev.* 2005 November; 26(4): 97–122.
15. I. Čepelak, D. Čvorišec. Biokemijski biljezi pregradnje kostiju – pregled. *Biochemia Medica* 2009; 19(1): 17-35.
16. S. Mencej Bedrač, B. Ostanek, V. Mlakar, J. Zupan, T. Kocjan, J. Preželj, J Marc. Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 269-279.
17. M.Pal, I. Krajnc, U. Potočnik. Osteoarthritis: patogeneza in farmakološko zdravljenje. *Medicinski mesečnik*, marec-april 2008; 88-93.
18. M. Bregar. Novejša spoznanja na področju etiopatogeneze in zdravljenja primarne osteoartroze. *Zdravstveni vestnik* 2002; 71: 235-9 .
19. *Osteoartroza*. Dostopno na: <http://www.natego.si/si/spondiloartroza-a49.shtml>
Dostop: 30.05.2013
20. Defeng Wu, Ph.D., and Arthur I. Cederbaum, Ph.D.. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. National Institutes of Health; October 2004; 93-103
21. J. Osredkar. Oksidativni stres. *Zdravstveni vestnik* 2012; 81: 939-406.
22. Jones DP.. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Sep-Oct; 8(9-10): 1865-79.
23. B. Rejc, J. Osredkar, K. Geršak: Oksidacijski stres in nosečnost. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 153-161
24. G. Papanikolaoua, K. Pantopouloub. Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202 (2005); 199– 211.

25. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr.* 2006; 26: 323-42.
26. L. Valenti, M. Varena, A. L. Fracanzani, V. Rossi, S. Fargion, L. Sinigaglia. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporosis International*, April 2009, Volume 20, Issue 4: 549-555.
27. P. Guggenbuhl, Y. Deugnier, J. F. Boisdet, Y. Rolland, A. Perdriger, Y. Pawlotsky, G. Chalès. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporosis International*, December 2005, Volume 16, Issue 12: 1809-1814
28. Yamasaki K, Hagiwara H.. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol Lett.* 2009 Dec 15; 191(2-3): 211-5.
29. D'Amelio P, Cristofaro MA, Tamone C, Morra E, Di Bella S, Isaia G, Grimaldi A, Gennero L, Gariboldi A, Ponzetto A, Pescarmona GP, Isaia GC. Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone.* 2008 Dec;43(6): 1010-5.
30. C. Hershko. Iron, bone, and marrow. *Blood* October 7, 2010 vol. 116 no. 14: 2405-2406.
31. Weinberg ED.. Iron loading: a risk factor for osteoporosis. *Biometals.* 2006 Dec; 19(6): 633-5.
32. J. Jian, E. Pelle, Xi Huang: Iron and Menopause: Does Increased Iron Affect the Health of Postmenopausal Women?. *Antioxid Redox Signal.* 2009 December; 11(12): 2939–2943.
33. A. Kocijančič. Hemokromatoza. V: Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D.: *Interna medicina*, 3. Izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005: 898-900, 607-617.
34. Press R.D.. Hereditary hemochromatosis: impact of molecular and iron-based testing on the diagnosis, treatment, and prevention of a common, chronic disease. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Nov; 123(11): 1053-9.

35. Katrina J. Allen, M.D., Ph.D., Lyle C. Gurrin, Ph.D., Clare C. Constantine, Ph.D., Nicholas J. Osborne, Ph.D., Martin B. Delatycki, M.D., Ph.D., Amanda J. Nicoll, M.D., Ph.D., Christine E. McLaren, Ph.D., Melanie Bahlo, Ph.D., Amy E. Nisselle, B.Sc., Chris D. Vulpe, M.D., Ph.D., Gregory J. Anderson, Ph.D., Melissa C. Southey, Ph.D., Graham G. Giles, Ph.D., Dallas R. English, Ph.D., John L. Hopper, Ph.D., John K. Olynyk, M.D., Lawrie W. Powell, M.D., Ph.D., and Dorota M. Gertig, M.D., D.Sc.. Iron-Overload–Related Disease in HFE Hereditary Hemochromatosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 221-230
36. P. Guggenbuhl, P. Brissot, O. Loréal. Haemochromatosis: The bone and the joint. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 25 (2011): 649–664.
37. M. Cukjati, T. Vaupotič, R. Ruprecht, V. Čurin-Šerbec. Prevalence of H63D, S65C and C282Y hereditary hemochromatosis gene mutations in Slovenian population by an improved high-throughput genotyping assay. *BMC Medical Genetics* 2007, 8:69.
38. Zadavec T. Vpliv polimorfizmov V174A in N130D v genu za OATP1B1 na mineralno kostno gostoto. Diplomsko delo 2011. Fakulteta za farmacijo. Univerza v Ljubljani.
39. B.Arko. Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmacevtski vestnik*, 2004, 55: 215-220.
40. S. A. Bustn, Real-time PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, 2005; 1117-1125.
41. K. Drobnič. Ugotavljanje identitete posameznika z uporabo genetskih informacij, metode verižne reakcije s polimerazo in računalniško podprte tehnologije, Ministrstvo za notranje zadeve, Policija, Center za forenzične preiskave, 2012; 152-163. Dostopno na: <http://www.zrss.si/bzid/geni/pdf/drobnic-clanek.pdf>. Dostop: 14.05.2013
42. Nouvelle méthode rapide et robuste de génotypage du *CYP2C9* et *MDR1*, *Annales de biologie clinique*, Vol.61, št.3, 2003; 305-309. Dostopno na: http://www.jle.com/fr/revues/bio_rech/abc/edocs/00/03/FE/D1/article.phtml?fichier=images.htm. Dostop: 15.05.2013

