

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA JEKLAR

**IZRAŽANJE GENOV ZA ANTIOKSIDATIVNE ENCIME V VZORCIH
HRUSTANCA**

ANTIOXIDATIVE ENZYMES' GENE EXPRESSION IN CARTILAGE SAMPLES

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila svoji mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in delovni mentorici asist. dr. Janji Zupan, mag.farm. za strokovno svetovanje, potrpežljivost, spodbudo in pomoč pri nastajanju magistrskega dela.

Hvala tudi moji ožji in širši družini za vsakršno podporo, ki ste mi jo in mi jo še vedno izkazujete.

Posebna zahvala pa gre tebi Primož, za vse, kar storiš zame. Hvala, ker si verjel in še verjameš vame. Hvala za ves optimizem in spodbudne besede. Hvala, da si bil moja opora, ko je bilo težko in da si se z mano iskreno veselil, ko je bilo lepo.

Hvala tudi Katji, Tini in vsem, ki ste kakor koli prispevali k nastanku tega dela in mi tekom študija stali ob strani.

IZJAVA

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo. Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorice asist. dr. Janje Zupan, mag.farm.

Ljubljana, junij 2014

Katarina Jeklar

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
SEZNAM SLIK.....	XI
SEZNAM PREGLEDNIC	XII
SEZNAM GRAFOV	XIII
1. UVOD.....	1
1.1 HRUSTANEC.....	1
1.1.1 Lastnosti hrustančnega tkiva	1
1.1.2 Hondrociti.....	1
1.1.3 Zunajcelični matriks hialinega hrustančnega tkiva	2
1.1.4 Nastanek, rast in obnova hialinega hrustanca.....	4
1.2 OSTEOARTROZA.....	5
1.2.1 Opredelitev bolezni.....	5
1.2.2 Patogeneza	6
1.2.3 Zdravljenje.....	7
1.2.4 Signalna pot HTRA1/DDR2/MMP13	8
1.3 OKSIDATIVEN STRES KOT DEJAVNIK PROPADA HRUSTANCA	9
1.3.1 Oksidativen stres.....	9
1.3.2 Reaktivne kisikove spojine (ROS)	9
1.3.3 Oksidativen stres kot dejavnik propada hrustanca	10
1.4 ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI.....	11
1.4.1 Superoksid dismutaza 2 (SOD2)	11
1.4.2 Tiorredoksin reduktaza 1 (TrxR1)	11

1.4.3	Katalaza (CAT).....	12
1.4.4	Aldehid oksidaza (AOX1).....	12
1.4.5	Glutation S transferaza π 1 (GSTP1).....	13
1.4.6	Selenoprotein P (SEPP1).....	13
1.4.7	Peroksiredoksin 5 (PRX5).....	14
1.5	ANGIOGENEZA IN OSTEOARTROZA.....	14
1.5.1	Angiogeneza	14
1.5.2	Vaskularni endotelijski rastni dejavnik A (VEGFA)	14
1.5.3	Angiogeneza v kosti in hrustancu pri osteoartroznem sklepu	15
2.	NAMEN DELA	16
3.	MATERIALI IN METODE	17
3.1	VZORCI.....	17
3.2	IZOLACIJA IN VREDNOTENJE RNK.....	17
3.3	PREPIS RNK V CDNK.....	18
3.4	PRIPRAVA – NAČRTOVANJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV ...	20
3.5	OPTIMIZACIJA QPCR ZA PREISKOVANE GENE.....	23
3.6	OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV 25	
3.7	DOLOČITEV NAJBOLJŠEGA REFERENČNEGA GENA.....	28
3.8	QPCR PREISKOVANIH VZORCEV HRUSTANCA	30
3.9	STATISTIČNE METODE.....	31
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	OPIS PREISKOVANE SKUPINE	32
4.2	ANALIZA QPCR REZULTATOV	32
4.3	OPTIMIZACIJA OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV.....	36
4.4	DOLOČITEV REFERENČNEGA GENA	37
4.5	ANALIZA IZRAŽANJA GENOV	38

4.6	REZULTATI IZRAŽANJA GENOV.....	40
4.6.1	Povezanost izražanja antioksidativnih genov z geni za hondrocitne označevalce.....	42
4.6.2	Povezanost izražanja genov za hondrocitne označevalce s signalno potjo HTRA1/DDR2/MMP13	44
4.6.3	Povezanost izražanja genov za AO encime s signalno potjo HTRA1/DDR2/MMP13	45
4.6.4	Povezanost izražanja preiskovanih genov z VEGFA	45
	SKLEP	47
	LITERATURA	48
5.	PRILOGE	53
	Priloga 1: Osebni podatki preiskovancev	53
	Priloga 2: Izražanje genov v vzorcih	54
	Priloga 3: Korelacije med preiskovanimi geni	56

POVZETEK

Osteoartroza je najpogostejša degenerativna bolezen sklepov, ki jo spremljata bolečina in motena gibljivost, njena prevalenca pa se povečuje iz leta v leto. Hrustanec je specializirana vrsta veziva, ki ga sestavljajo hrustančne celice, hondrociti in trdna medceličnina. Hondrociti tvorijo kolagen tipa II, proteoglikane (agrekane), specifične nekolagenske proteine (hrustančni oligomerni matriksni protein). Poleg tega so v zunajceličnem matriksu prisotni še glikoproteini in voda. Dejavniki, ki vplivajo na razgradnjo hrustanca se intenzivno raziskujejo z namenom preprečiti oz. izboljšati zdravljenje osteoartroze. Vpliv oksidativnega stresa na pojav kroničnih bolezni je znan, njegova vloga pri zgodnjih degenerativnih spremembah hrustanca pa je manj raziskana. Oksidativen stres nastane zaradi prevelike tvorbe radikalov oziroma zaradi manjše učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Del antioksidativnega sistema so tudi antioksidativni encimi (AO), kamor spadajo superoksid dismutaza, katalaza, tioredoksin reduktaza, aldehyd oksidaza, glutathion S transferaza, selenoprotein P in peroksiredoksin 5. Študije dokazujejo, da je za razgradnjo sklepnega hrustanca odgovorna signalna pot, ki vključuje HtrA1, DDR2 in MMP13. Dokazana pa je tudi pomembna vloga angiogeneze pri propadu hrustanca, ko začnejo pod vplivom ravnega endotelijskega faktorja A (VEGFA) v hrustancu nastajati nove krvne žile.

Naš namen je bil ugotoviti povezavo med izražanjem genov za antioksidativne encime in VEGFA na eni strani, z geni signalne poti HtrA1, DDR2 in MMP13 ter geni za hondrocitne označevalce na drugi strani.

V raziskavo je bilo vključeno 23 preiskovancev brez kostnih in sklepnih bolezni, ki so jim odvzeli sklepni hrustanec iz kolka in izolirali celokupno RNK. Z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo določili izražanje 16 preiskovanih genov za AO encime, hondrocitne označevalce, signalno potjo HTRA1/DDR2/MMP13 in VEGFA.

Najvišje izražen antioksidativni gen v naši študiji je aldehyd oksidaza 1 (AOX1), najnižje superoksid dismutaza 2 (SOD2). Najvišje izražen gen za hondrocitne označevalce je faktor za določitev spola – regija 9 (SOX9), najnižje fibronektin 1 (FN1). Z uporabo Spearmanovega koeficienta korelacije smo določili dve statistično značilni povezavi med geni za AO encime in hondrocitnimi označevalci. Med SOD2 in kolagenom, tip II, alfa 1

(COL2A1) je negativna povezava. Med geni za hondroцитne označevalce in preiskovano signalno potjo obstaja šest pozitivnih povezav. Med geni za antioksidativne encime in preiskovano signalno potjo obstajata dve statistično pomembni pozitivni povezavi. Med preiskovanimi geni in VEGFA obstajajo tri pozitivne povezave.

Naši rezultati nakazujejo na pomemben vpliv oksidativnega stresa in vaskularizacije na razgradnjo hrustanca v povezavi s starostjo, pojasnitev natančnega mehanizma teh povezav pa bi bila možna z nadaljnjimi študijami na celičnih linijah hondroцитov.

KLJUČNE BESEDE: hrustanec, oksidativen stres, signalna pot HTRA1/DDR2/MMP13, angiogeneza, osteoartroza

ABSTRACT

Osteoarthritis is the most common degenerative disease of joints, accompanied with pain and restricted (decreased, limited) mobility. Its prevalence increases with age. Cartilage is a specialized kind of connective tissue, consisting of cartilage cells, chondrocytes and firmly ground substance. Chondrocytes produce collagen type II, proteoglycans (aggrecan) and specific non collagenous proteins (cartilage oligomeric matrix protein). Extracellular matrix contains also glycoproteins and water. Factors, which effect the decomposition of cartilage, have been researched extensively in order to prevent or improve treatment of osteoarthritis. The influence of oxidative stress affecting chronic diseases is well known, but its role on early degenerative changes of cartilage is less examined. The reasons for antioxidative stress are increased free radical formation and reduced effectiveness of antioxidative defense systems. The antioxidative defense system includes antioxidative enzymes superoxide dismutase, catalase, thioredoxine reductase, aldehyde oxidase, glutathione S transferase, selenoprotein P and peroxiredoxin. However, studies show many reasons for cartilage responsible signal pathway decomposition, which include HTRA1, DDR2 and MMP13. Furthermore, angiogenesis has also been proven to have an important role in cartilage degradation, consequently new blood vessels are formed by vascular endothelial growth factor A (VEGFA).

Our purpose was to research and evaluate the relationship between gene expression of antioxidative enzymes, VEGFA, genes of signal pathway HTRA1/DDR2/MMP13 and cartilage genes.

23 persons without bone or joint diseases were included in this evaluation. A sample of hip cartilage was taken, from which RNA was extracted. We determined the expression of 16 different investigated genes with quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The most extensively expressed antioxidative enzyme in our study was aldehyde oxidase 1 (AOX1) and the lowest superoxide dismutase 2 (SOD2). Most extensively expressed cartilage specific gene is sex determining region Y-box 9 (SOX9) and the lowest is fibronectin 1(FN1). With the aid of Spearman`s correlation coefficient we determined two statistically important correlations between genes for antioxidative enzymes and cartilage specific genes. Between SOD2 and collagen type II, alpha 1 (COL2A1) a negative correlation was discovered. Between cartilage genes and our

investigated signal pathway existed six statistically important positive correlations. Between genes for antioxidative enzymes and signal pathway are two statistically important positive correlations. Between investigated genes and VEGFA are three statistically important positive correlations.

Our results indicate the important role of oxidative stress and vascularization on cartilage decomposition in relation to age. Nevertheless, further studies on chondrocyte cell lines would reveal more specific mechanisms based on these relationships.

KEY WORDS: cartilage, oxidative stress, signal pathway HTRA1/DDR2/MMP13, angiogenesis, osteoarthritis

SEZNAM OKRAJŠAV

AOX1 ... aldehyd oksidaza 1 (ang. aldehyde oxidase 1)

CAT ... katalaza (ang. catalase)

cDNK ... komplementarna DNK

COMP ... hrustančni oligomerni matriksni protein (ang. cartilage oligomeric matrix protein)

DDR2 ... diskodinsko področje receptorja 2 (ang. discoidin domain receptor tyrosine kinase 2)

dH₂O ... ultra čista voda

DNK ... deoksiribonukleinska kislina

dNTP ... deoksiribonukleotid trifosfat

GPX ... glutation peroksidaza (ang. glutathione peroxidase)

GSTP1 ... glutation S transferaza π 1

HTRA1 ... visoko temperaturo zahtevajoča serinska peptidaza A1 (ang. high-temperature requirement A serine peptidase 1)

ITM ... indeks telesne teže

MMP13 ... matriksna metaloproteinaza 13

NADPH ... nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NSAID ... nesteroidni antirevmatiki (ang. Non-steroidal anti-inflammatory drug)

NTC ... slepi vzorec (ang. no-template control)

OA ... osteoartroza

PRDX5 ... peroksiredoksin 5 (ang. peroxiredoxin 5)

PCR ... verižna reakcija s polimerazo, (ang. polymerase chain reaction)

qPCR ... kvantitativen PCR v realnem času (ang. quantitative polymerase chain reaction)

ROS ... reaktivne kisikove spojine (angl. reactive oxygen species)

SEPP1 ... selenoprotein P

SOD2 ... superoksid dismutaza 2

SOX9 ... faktor za določitev spola – regija 9, angl. SRY (sex determining region Y)-box 9

TRXR1 ... tioredoksin reduktaza 1 (ang. thioredoxin reductase)

VEGFA ... vaskularni endotelijski rastni dejavnik A (ang. vascular endothelial growth factor A)

SEZNAM SLIK

Slika 1: Kolagenska trojna vijačnica, predstavljena z modelom kroglic in palčk.....	2
Slika 2: Shematski prikaz najštevilčnejših molekul v zunajceličnem matriksu hialinega hrustanca.....	4
Slika 3: Histološki preparat zdravega (levo) in osteoartroznega hrustanca (desno).....	6
Slika 4: Spremembe v enoti kost - hrustanec	7
Slika 5: Reakcija, ki jo katalizira SOD2.....	11
Slika 6: Reakcijska shema tioredoksin reduktaze.....	11
Slika 7: Reakcija, ki jo katalizira CAT	12
Slika 8: Reakcijska shema AOX1	12
Slika 9: Reakcijska shema GSTP1	13
Slika 10: Reakcijska shema PRX5	14
Slika 11: Shema vgrajevanja barvila SYBR Green v dvovijačno DNK.....	20
Slika 12: Shema rezultatov programa Primer - BLAST	21
Slika 13: Krivulja pomnoževanja.	33
Slika 14: Talilna krivulja za COMP.	34
Slika 15: Krivulja pomnoževanja	34
Slika 16: Standardna krivulja.	35
Slika 17: Rezultati reakcije PCR v realnem času.	39

SEZNAM PREGLEDNIC

Tabela I: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo qPCR.....	22
Tabela II: Priprava standardov.	24
Tabela III: Shema pipetiranja na 384 ploščici.	24
Tabela IV: Program na LC480.	25
Tabela V: Reakcijska zmes za qPCR, 100 nM oligonukleotidni začetniki.	25
Tabela VI: Reakcijska zmes za qPCR, 200 nM oligonukleotidni začetniki.....	25
Tabela VII: Reakcijska zmes za qPCR, 600 nM oligonukleotidni začetniki.	26
Tabela VIII: Shema pipetiranja na 384 ploščici.	26
Tabela IX: Priprava standardov.	27
Tabela X: Reakcijska shema za qPCR, 1000 nM oligonukleotidni začetniki.	27
Tabela XI: Program na aparatu LC480 za pomnoževanje RPLP13A in VEGFA.....	28
Tabela XII: Reakcijska zmes za qPCR, 100 nM oligonukleotidni začetnik.	29
Tabela XIII: Reakcijska shema za qPCR, 600 nM oligonukleotidni začetnik.	29
Tabela XIV: Shema pipetiranja na 384 ploščici.	29
Tabela XV: Reakcijska zmes za qPCR, 100 nM oligonukleotidni začetniki.	30
Tabela XVI: Reakcijska zmes za qPCR, 600 nM oligonukleotidni začetniki.	30
Tabela XVII: Reakcijska zmes za qPCR, 1000 nM oligonukleotidni začetniki.	31
Tabela XVIII: Antropološke značilnosti preiskovancev.	32
Tabela XIX: Rezultati optimizacije qPCR preiskovanih genov.	36
Tabela XX: Dejavnik stabilnosti za določitev referenčnega gena.	37
Tabela XXI: Dejavnik stabilnosti za variabilnost znotraj posamezne skupine.	38
Tabela XXII: Dejavnik stabilnosti za variabilnost med skupinama.	38
Tabela XXIII: Izražanje preiskovanih genov.	40
Tabela XXIV: Rezultati statistično značilne korelacijske analize med posameznimi geni. 42	

Tabela XXV: Korelacije med geni za AO encime in geni za hondroцитne označevalce.	44
Tabela XXVI: Korelacije med geni za hondroцитne označevalce in geni signalne poti.	44
Tabela XXVII: Korelacije med geni za AO encime in geni signalne poti.	45
Tabela XXVIII: Korelacije med preiskovanimi geni z VEGFA.	46

SEZNAM GRAFOV

Graf 1: Izražanje preiskovanih genov za antioksidativne encime in VEGFA.	41
Graf 2: Izražanje preiskovanih genov za hondroцитne označevalce in signalno pot HTRA1/DDR2/MMP13.	41
Graf 3: Povezava med izražanjem SOD2 in COL2A1.	43

1. UVOD

1.1 HRUSTANEC

1.1.1 Lastnosti hrustančnega tkiva

Hrustančevina je specializirana vrsta veziva, ki jo sestavljajo hrustančne celice, hondrociti, in trdna medceličnina. Ne vsebuje krvnih in limfnih žil, prav tako ni oživčena. Prehranjuje se z difuzijo iz žil v perihondriju ali, v primeru sklepnega hrustanca, iz sinovijske tekočine iz sklepne špranje. Ima slabo sposobnost regeneracije zaradi neožiljenosti hrustanca, nemobilnosti hondrocitov in omejene proliferacijske sposobnosti zrelih hondrocitov (1,2).

Glede na sestavo medceličnine ločimo tri vrste hrustančevine:

- Vezivna hrustančevina vsebuje v medceličnini hondroitin sulfat in dermatan sulfat s kolagenskimi vlakni tipa I. Najdemo jo predvsem v medvretenčnih ploščicah, sramnični simfizi in meniskusu.
- Elastična hrustančevina je bogata z elastičnimi vlakni, ki se vrivajo med kolagenska vlakna tipa II. Je sestavni del uhlja, zunanjega sluhovoda, ušesne troblje, poklopca in nekaterih hrustancev grla.
- Hialina hrustančevina ima v medceličnini kolagenska vlakna tipa II, hondroitin sulfat, keratan sulfat in hondronektin. Je najbolj razširjena oblika hrustančevine, saj sestavlja sklepne površine premičnih sklepov, ogrodje dihalnih poti in rebrni hrustanec, iz nje pa je pred rojstvom zgrajena tudi večina skeleta (1,2).

1.1.2 Hondrociti

V hrustančnem tkivu je prisotna ena sama vrsta celic – hondrociti, ki so sferične oblike. Zanje je značilna tvorba kolagena tipa II, proteoglikanov kot je agrekan, specifičnih nekolagenskih proteinov kot je hrustančni oligomerni matriksni protein (angl. COMP) in urejanje teh molekul v hrustančni matriks. Kolagenske fibrile dajejo hrustancu trdnost in togost, proteoglikani pa elastičnost in prožnost. Posamezne celice so presnovno precej aktivne, vendar je skupna metabolna aktivnost nizka, saj je število celic v hrustancu precej majhno. Po zaključku skeletne rasti se večina hondrocitov ne deli več, zato pri odraslem človeku predstavljajo le en odstotek celotne prostornine hrustanca (3).

Delovanje hondrocitov je odvisno od hormonov. Rasni hormon, testosteron in tiroksin pospešujejo sintezo sulfatnih glukozaminoglikanov, medtem ko jo kortizon, hidrokortizon in estradiol upočasnjujejo (4).

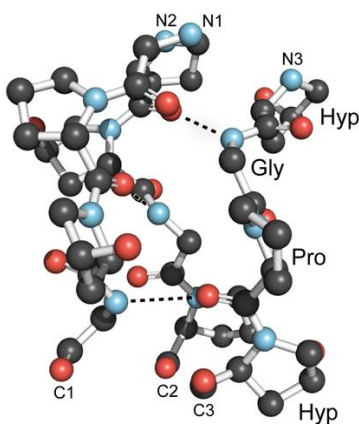
1.1.3 Zunajcelični matriks hialinega hrustančnega tkiva

Hondrociti so vpeti v strukturno organiziran matriks, ki je sestavljen iz vode, kolagena, proteoglikanov, glukozaminoglikanov in nekolagenskih proteinov. Zaradi neožiljenosti matriksa potekajo premiki hormonov, hranil, presnovkov in citokinov pri razmeroma velikih razdaljah in koncentracijskih gradientih. Nizek parcialen tlak kisika povzroča, da v celicah poteka pretežno anaerobna glikoliza, zato morajo biti odporne na visoke koncentracije mlečne kisline (5).

1.1.3.1 Kolagen

Kolagen je najbolj zastopana beljakovina medceličnine. Predstavlja približno 60 % suhe teže celotnega hrustanca. Najpogostejši je kolagen tipa II, ki predstavlja 80–90 % vseh kolagenskih vlaken, najdemo pa tudi kolagen tipa VI, IX in XI. Kolagenska vlakna so odgovorna za odpornost hrustanca, njegovo natezno trdnost in zmožnost kljubovanja silam, ki nastanejo v hrustancu (5, 6).

Struktura kolagena je desno sučna trojna vijačnica, ki je sestavljena iz treh polipeptidnih verig. Vijačnica je vrste poliprolin tip II (PPII). To pomeni, da je ponavljajoče zaporedje aminokislin XaaYaaGly, pri čemer Gly predstavlja glicin, Xaa in Yaa pa poljubno aminokislino. Najpogostejše sta ti aminokislini (2S)-prolin (Pro) in (2S,4R)-4-hidroksiprolin (Hyp) in tako je triplet ProHypGly najpogostejši triplet v kolagenu (7).



Slika 1: Kolagenska trojna vijačnica, predstavljena z modelom kroglic in palčk. Prirejeno po (7).

Uradno ime gena je kolagen, tip II, alfa 1 (COL2A1). Gen vsebuje zapis za eno izmed komponent kolagena tipa II, in sicer za pro-alfa1(II) verigo. Tri pro-alfa1(II) verige se nato združijo v trojno vijačnico prokolagena, ki se nato pod vplivom celičnih encimov pretvori v kolagenska vlakna (8).

Mutacije tega gena so odgovorne za mnoge bolezni, npr. ahondrogenozo (preprečena je normalna produkcija kolagena tip II kar se kaže s skeletnimi nepravilnostmi), Sticklerjev sindrom (nastajajo nepravilne, kratke pro-alfa1(II) verige, zaradi česar je zmanjšan nastanek kolagena tipa II), avaskularno nekrozo glave stegenice, povečujejo tveganje za nastanek osteoartroze ... (8)

1.1.3.2 Proteoglikani

Proteoglikani so makromolekule, ki so razpršene okoli kolagena. Sestavljeni so iz proteinske molekule, na katero so kovalentno vezani glukozaminoglikani: hondroitin sulfat, keratan sulfat in hialuronska kislina. Hondroitin in keratan sulfat vsebujeta močno negativno nabite karboksilne in sulfatne skupine, zaradi česar imajo visoko afiniteto do molekul vode. Zaradi visoke vsebnosti vode so proteoglikani viskozni in tako predstavljajo idealno mazivno tekočino v sklepih. Verige proteoglikanov se med seboj odbijajo, zato imajo odprto strukturo in zapolnjujejo prostor. V sklepnem hrustancu absorbirajo in porazdeljujejo tlačno težo. Dajejo mu prožnost in s tem ščitijo sklepe pred mehanskimi poškodbami (9).

V sklepnem hrustancu je najbolj pogost proteoglikan agrekan, ki ga kodira gen ACAN. Je makromolekula, sestavljena iz osrednjega proteina, na katerega so v večji meri vezane verige hondroitin sulfata, prisotne so tudi verige keratan sulfata ter *N*- in *O*- vezanih oligosaharidov. Mutacije gena za agrekan lahko vodijo v nastanek skeletne displazije in degeneracijo hrbtenice (10, 11).

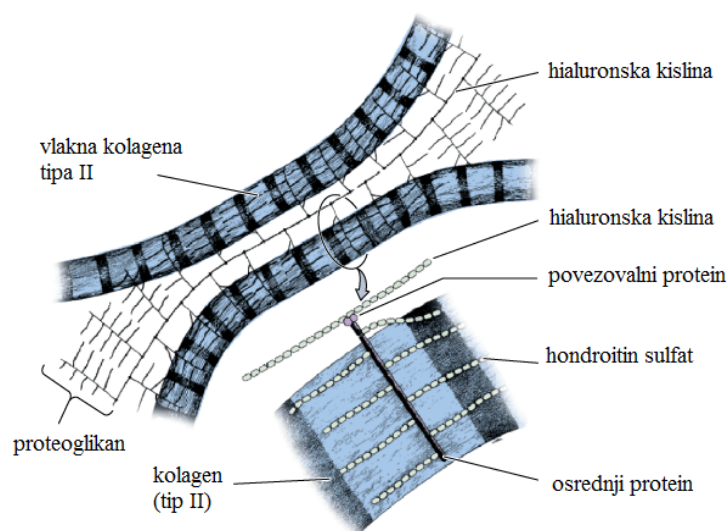
1.1.3.3 Glikoproteini

V zunajceličnem matriksu hialinega hrustančnega tkiva se v manjših količinah nahajajo tudi glikoproteini. Najpomembnejši strukturni glikoprotein je hondronektin. Specifično se veže na glukozaminoglikane in kolagen tipa II in uravnava povezavo med hondrociti in zunajceličnim matriksom (4).

1.1.3.4 Nekolagenski proteini

V to skupino spada hrustančni oligomerni matrični protein (angl. Cartilage oligomeric matrix protein, COMP), ki ga kodira istoimenski gen. Sestavljen je iz petih popolnoma enakih glikoproteinskih podenot (12). Vloga proteina še ni popolnoma znana. Imel naj bi vlogo pri celični rasti, apoptozi in regulaciji celičnega gibanja in povezovanja. Raziskave tudi kažejo, da se močno veže na kalcij. Pomanjkanje COMP proteina med hondrociti vodi v nastanek nenormalnega hrustanca, ki se zlahka poškoduje in zlomi, in tako vodi v zgodnji nastanek osteoartroze (13).

Mutacije v genu za COMP lahko vodijo v nastanek multiple epifizalne displazije ali pseudoahondroplazije (13).



Slika 2: Shematski prikaz najštevilčnejših molekul v zunajceličnem matriksu hialinega hrustanca. Prirejeno po (4).

1.1.4 Nastanek, rast in obnova hialinega hrustanca

Hrustanec nastane iz hondroprogenitornih mezenhimskih celic v procesu, imenovanem hondrogeneza. Ekspresija transkripcijskega faktorja SOX-9 (faktor za določitev spola - regija 9, angl. SRY (sex determining region Y)-box 9) sproži diferenciacijo teh celic v hondroblaste, ki začnejo izločati zunajcelični matriks. Hondroblasti se postopoma oddaljujejo drug od drugega, med njimi je vedno več medceličnine. Ko so popolnoma obdani z zunajceličnim matriksom se te celice imenujejo hondrociti (14).

Hondrogenezo uravnavajo ekstracelularni ligandi, jedrni receptorji, transkripcijski dejavniki, adhezijske molekule in proteini zunajceličnega matriksa. Poleg tega pa je rast in razvoj hrustanca tudi pod vplivom biomehaničnih sil. Te sile ne določajo samo oblike, regeneracije in staranja hrustanca, temveč tudi spreminjajo interakcije med hondrociti in zunajceličnim matriksom v hrustancu (14).

Hrustanec raste na dva načina:

- apozicijska rast – nov hrustanec se tvori na površini obstoječega hrustanca zaradi diferenciacije perihondrijskih celic (4,14)
- intersticijska rast – nov hrustanec nastaja v obstoječi hrustančni masi zaradi mitotične delitve že obstoječih hondrocitov (4,14)

Brez dostopa večjih količin hranil, kroženja progenitornih celic in zaradi majhne količine celic, hrustanec nima naravnih sposobnosti za izvajanje procesa obnove. Zato se je, razen pri majhnih otrocih, hrustanec praktično nesposoben regenerirati. Nekaj regeneracije je možne le v primeru, če poškodovano področje obsega perihondrij. Pri teh poškodbah je obnova posledica aktivnosti progenitornih pluripotentnih celic, ki se nahajajo v perihondriju. Tudi v tem primeru nastane zelo malo ali celo nič hrustančnih celic. Obnova tako večinoma vključuje nastanek gostega veznega tkiva. Obnova hrustanca je pogojno sprejeto ravnotežje med odlaganjem kolagena tipa I v brazgotinasto tkivo in obnovo z ekspresijo hrustančno specifičnih kolagenov. Na tako obnovljenem področju pogosto pričnejo nastajati nove krvne žile, kar stimulira rast kosti namesto hrustanca. Ker se poškodovano tkivo samo ne obnovi pravilno, je zato potreben kirurški postopek (14, 15).

1.2 OSTEOARTROZA

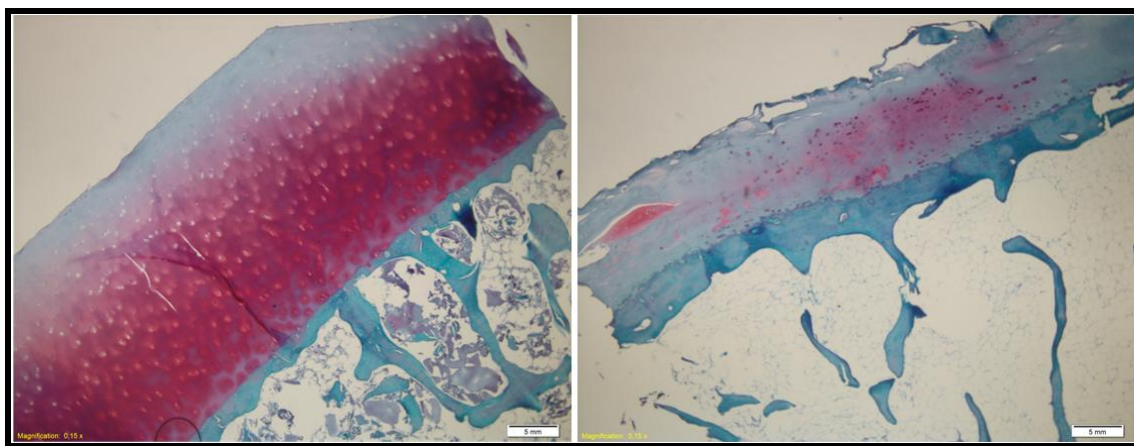
1.2.1 Opredelitev bolezni

Osteoartroza (OA) je degenerativna bolezen sklepov in pripadajočih struktur, mišic, burz, tetiv in veziva, ki jo spremljata bolečina in motena gibljivost (16).

Je najpogostejša bolezen sklepov, njena prevalenca pa se povečuje iz leta v leto. Po podatkih iz leta 2004 po celem svetu za to boleznijo trpi 151,4 milijonov ljudi, od tega je 40,2 milijona Evropejcev (17). Najpogosteje so prizadeti sklepi kolkov, kolen in rok. Bolezen se običajno začne nekaj let prej, preden se pojavijo simptomi. Diagnoza je lahko

radiološka ali klinična na podlagi simptomov. Najpogostejši simptomi so bolečina, kratkotrajna okorelost (<30 minut), omejeno gibanje in funkcionalnost sklepa. Približno polovica pacientov z radiološko diagnozo nima izraženih kliničnih znakov (18).

Dejavniki tveganja se razlikujejo glede na tip OA, saj bolezen delimo na primarno in sekundarno. Pri primarni obliki so ključni starost, spol, rasa, dednost, prekomerna telesna teža in hormonski vpliv. Sekundarna OA nastane zaradi prirojenih ali razvojnih anomalij, poškodb sklepov ali zaradi mehanskih obremenitev (npr. športniki) (19).

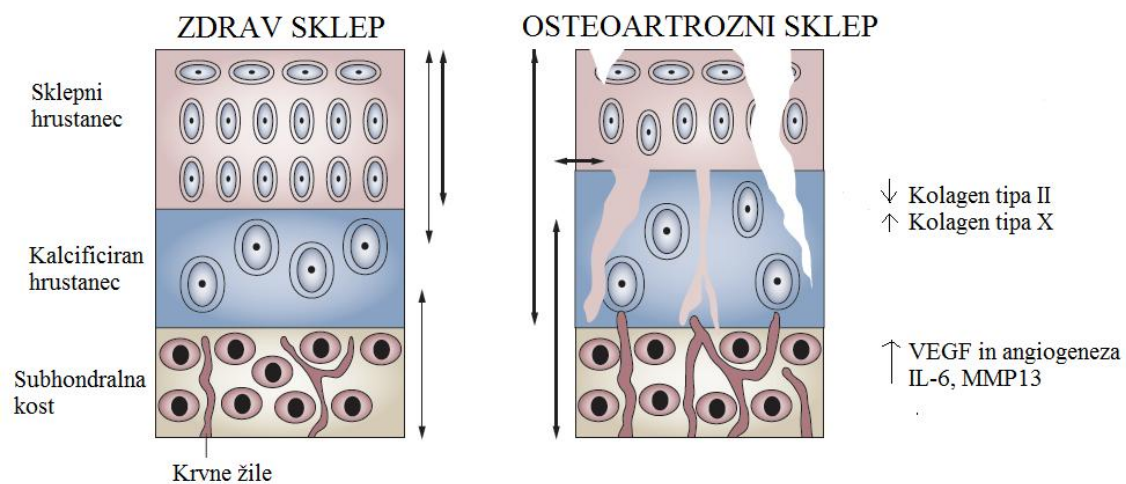


Slika 3: Histološki preparat zdravega (levo) in osteoartroznega hrustanca (desno). Povzeto po (Zupan s sod., poslano v objavo).

1.2.2 Patogeneza

OA nastane kot posledica propadlega poskusa obnove poškodovanega hrustanca. V zgodnji fazi se v poškodovanem območju zviša koncentracija rastnih dejavnikov, zmanjša se koncentracija proteoglikanov in vode. Ker obnova hrustanca ni učinkovita, se pojavi neravnovesje v korist razgradnje. Povečana sinteza razgradnjih proteinaz (matriks metaloproteinaze in agrekanaze) spodbuja apoptotično smrt hondrocitov in neustrezno sintezo komponent zunajceličnega matriksa. Tak matriks ni zmožen kljubovati normalnim mehanskim silam v hrustancu in se hitreje poškoduje. Tako se v hrustancu začne začaran krog, ki ima za posledico vedno večje propadanje hrustanca. Hrustanec postaja vedno tanjši, s površino, ki je razpokana, hrapava in nepravilnih oblik. Ker hrustanec ni oživčen, se te spremembe ne kažejo s kliničnimi znaki. Ti se pojavijo šele, ko so vključena tudi okoliška oživčena tkiva (spodaj ležeča kost). To je tudi eden izmed razlogov za pozno diagnozo bolezni (18, 19).

Sočasno s spremembami v hrustancu pa se povečuje tudi celična aktivnost v spodaj ležeči kosti. To pomeni sklerozo subhondralne kosti z zadebelitvijo kortikalne plasti, obsežno preoblikovanje trabekule in nastanek osteofitov na zunanjih robovih sklepa. Novi dokazi kažejo, da ima pri razvoju in napredovanju bolezni veliko vlogo biomehanska enota, ki vključuje stik med hrustancem in kostjo. V tem delu namreč prihaja do difuzije molekul med sklepnim hrustancem in subhondralno kostjo. Bolezen poveča prepustnost omenjenega območja, zaradi česar se poveča pretok tekočin in topljencev v osteoartroznem sklepu, kar še dodatno poškoduje sklejni hrustanec. Osteoblasti osteoartrozne subhondralne kosti začnejo proizvajati interleukin 6, MMP13 in faktorje angiogeneze, predvsem VEGFA. Opisani proces prikazuje spodnja slika (20).



Slika 4: Spremembe v enoti kost - hrustanec. Prirejeno po (20).

1.2.3 Zdravljenje

Trenutno so pri zdravljenju OA v ospredju zmanjšanje/odprava bolečine, izboljšanje gibljivosti in upočasnitev napredovanja bolezni. To lahko dosežemo z nefarmakološkimi ukrepi (npr. fizioterapija, telesna aktivnost, izguba odvečne telesne teže), farmakološkim zdravljenjem in kirurškimi posegi (npr. zamenjava sklepa). Terapija z zdravili temelji na uporabi analgetikov (paracetamol in NSAID) in učinkovin, ki dolgoročno vplivajo na razvoj bolezni (npr. glukozamin in hondroitin sulfat) (18, 21).

1.2.4 Signalna pot HTRA1/DDR2/MMP13

1.2.4.1 Visoko temperaturo zahtevajoča serinska peptidaza A1 (angl. high-temperature requirement A serine peptidase 1, HTRA1)

HTRA1 je encim iz družine serinskih proteaz, ki razgrajuje proteine zunajceličnega matriksa, npr. agrekan, fibromodulin, fibronektin. Veže se na proteine iz družine transformirajočih rastnih faktorjev beta (TGF- β) in upočasnjuje njihovo sposobnost pošiljanja kemičnih signalov. HTRA1 je vključena tudi v proces nalaganja mineralov, kot sta kalcij in fosfor in mineralizacijo kosti (22, 23).

1.2.4.2 Diskodinsko področje receptorja 2 (DDR2)

DDR2 je tirozin kinazni receptor na površini celice, ki veže kolagen tipa II in spodbuja ekspresijo MMP13 (21). Visoko izražen je v mezenhimskih celicah in ima pomembno vlogo pri različnih razvojnih procesih, še posebej pri formaciji kosti in hrustanca. DDR2 prispeva k razvoju nekaterih bolezni, npr. hepatične fibroze, raka in osteoartroze (24).

1.2.4.3 Matriksna metaloproteinaza 13 (MMP13)

Matriksna metaloproteinaza 13 je encim iz skupine endoproteinaz, ki sodelujejo pri razgradnji in preoblikovanju zunajceličnega matriksa. MMP13 cepi kolagen tipa II in agrekan, nastali produkti pa se nahajajo v ozkem pasu, ki je na koncu cone osifikacije in angiogeneze. Odgovoren je za preoblikovanje hrustanca v kost pri dolgih kosteh, pomembno vlogo pa ima tudi med samo remodelacijo kostnega tkiva (25).

1.2.4.4 Signalna pot HTRA1/DDR2/MMP13 pri osteoartrozi

Na razgradnjo sklepnega hrustanca najverjetneje vpliva signalna pot, ki vključuje HTRA1, DDR2 in MMP13. Razgradnja proteinov v zunajceličnem matriksu, ki se pojavi zaradi delovanja HTRA1, je ena izmed zgodnjih stopenj v razvoju osteoartroze. Kolagenska vlakna tipa II so normalno ločena od hondrocitov s tanko plastjo zunajceličnega matriksa. Pri motnjah zunajceličnega matriksa pa pride do neposrednega stika med kolagenskimi vlakni tipa II in DDR2 receptorji. To vodi v povečano izražanje tako DDR2 kot tudi MMP13, kar vodi v povečano razgradnjo hrustanca (23).

1.3 OKSIDATIVEN STRES KOT DEJAVNIK PROPADA HRUSTANCA

1.3.1 Oksidativen stres

Oksidativen stres je neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine visoko reaktivnih zvrsti na celice in tkiva v organizmu. Nastane zaradi prevelike tvorbe radikalov oziroma zaradi manjše učinkovitosti antioksidativnih sistemov. Količino radikalov v organizmu lahko povečajo zunanji dejavniki (npr. različne vrste sevanja, nekatere kemikalije, virusi in bakterije) kot tudi notranji dejavniki (povečana stopnja celične presnove zaradi določenih bolezni, intenzivna telesna obremenitev pri neprilagojenem obrambnem sistemu antioksidantov). Povzroča zgodnje staranje in mnoge bolezni, med drugimi tudi aterosklerozo, možgansko kap, srčni infarkt, Alzheimerjevo in sladkorno bolezen, nekatere vrste raka, sivo mreno, itd (26).

Z namenom odstranitve radikalov, ki bi lahko škodili tkivom in celicam, obstajajo v telesu različni antioksidativni in popravljalni sistemi. Obrambne mehanizme proti oksidativnem stresu delimo na: antioksidante, preventivne in popravljalne mehanizme ter fizično obrambo. Pri procesu odstranjevanja radikalov sodeluje mnogo encimov, med katerimi so najpomembnejši glutation peroksidaza, katalaza in superoksid dismutaza. Neencimski antioksidanti, ki ščitijo pred oksidativnim stresom so askorbinska kislina (vitamin C), α – tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi in flavonoidi. V normalnih in zdravih celicah je vzpostavljeno natančno ravnotežje med tvorbo radikalov in nivojem antioksidacijskih molekul. Pri oksidativnem stresu pa je ravnotežje pomaknjeno na stran radikalov (27).

1.3.2 Reaktivne kisikove spojine (ROS)

Izraz reaktivne kisikove spojine uporabljamo za poimenovanje kisikovih radikalov in njihovih neradikalskih intermediatov. Radikali so snovi, ki vsebujejo enega ali več neparnih elektronov in so zato visoko reaktivni (28).

V fizioloških pogojih je najpogostejši kisikov radikal superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$). V največji meri nastaja v mitohondrijih, vir njegovega nastanka pa so tudi dihalna veriga, NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat), endoplazmatski retikulum, citokrom P450 in drugi encimi iz skupine oksidoreduktaz. Zaradi naboja ne prehaja membrane in tako ostaja v mitohondrijskem matriksu. Odstranjuje ga encim superoksid dismutaza s pretvorbo v

vodikov peroksid. Le ta ni radikal in je zato manj reaktiven kot superoksidni radikal anion, vendar kljub temu spada v skupino ROS, saj je tesno vključen v nastanek in odstranjevanje radikalov. V neškodljiv produkt – vodo, ga pretvarjata encima katalaza in glutathion peroksidaza. Pomembno je, da antioksidativni encimi delujejo ubrano, saj lahko neravnovesje v koncentraciji $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 vodi v nastanek zelo nevarnega hidroksilnega radikala ($HO^{\cdot}$). To reakcijo katalizirajo prosti železovi ioni v tako imenovani Fentonovi reakciji. Hidroksilni radikal je zelo reaktiven, saj reagira z vsako biološko molekulo, ki se nahaja v neposredni bližini. Zaradi visoke reaktivnosti tudi ni znanega encima za njegovo odstranjevanje (28).

Povečana produkcija reaktivnih kisikovih zvrsti lahko poškoduje in zavira normalno funkcijo lipidov, proteinov in DNK. Zaradi tega lahko pride do propada celice, kar ponovno generira nove radikale (27).

1.3.3 Oksidativen stres kot dejavnik propada hrustanca

Hondrociti sklepnega hrustanca aktivno proizvajajo dušikov oksid (NO), superoksidni anion, hidroksilni radikal in vodikov peroksid, ki so pomembni za znotrajcelično sporočanje in za celično fiziologijo. Ti ROS pa lahko inducirajo tudi apoptotično celično smrt v hondrocitih zaradi oksidacije nukleinskih kislin, transkripcijskih dejavnikov in membrane fosfolipidov. Zmožnost ROS, da inducirajo celično smrt je odvisna od antioksidativnih zaščitnih mehanizmov. Le ta je v hondrocitih dobro razvit in vključuje encime superoksid dismutazo (SOD), katalazo (CAT), glutathion peroksidazo (GPX) in peroksiredoksin 5 (PRDX5). Zmanjšanje antioksidativne sposobnosti ima lahko škodljive posledice tudi za zunajcelični matriks sklepnega hrustanca. Povečano nastajanje ROS namreč zmanjša sintezo proteoglikanov in hialuronske kisline, razgrajujejo že obstoječi agrekan in hialuronsko kislino zunajceličnega matriksa ter neposredno aktivirajo encime matriksne metaloproteinaze (MMP) (29, 30).

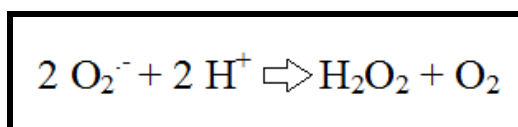
Oksidativne poškodbe ne sprožajo samo celične smrti, temveč povzročajo tudi ireverzibilne zastoje rasti. Dokazano je bilo tudi, da oksidativen stres povečuje nestabilnost telomere v DNK in disfunkcijo hondrocitov (31).

1.4 ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI

1.4.1 Superoksid dismutaza 2 (SOD2)

Superoksid dismutaza 2 (SOD2) je homotetramerni protein, ki v aktivnem mestu vsebuje mangan. Katalizira dismutacijo superoksidnega aniona ($O_2^{\cdot -}$) v vodikov peroksid in kisik. Nahaja se predvsem v mitohondrijih (32).

Antioksidativni encimi iz SOD družine so v zdravem hrustancu visoko izraženi. Pri osteoartrizi pa je v hondrocitih signifikantno zmanjšano izražanje vseh SOD encimov, najbolj SOD2 (33).

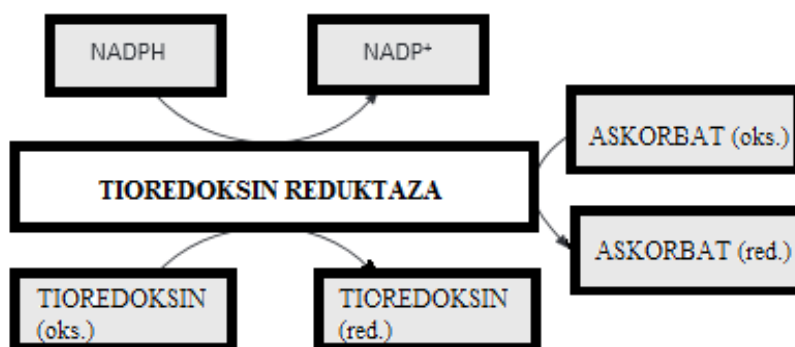


Slika 5: Reakcija, ki jo katalizira SOD2. Prirejeno po (27).

1.4.2 Tioredoksin reduktaza 1 (TrxR1)

Tioredoksin reduktaza 1, ki je kodiran z genom TXNRD1, je encim iz skupine flavoproteinov. Njegova naloga je redukcija oksidiranih tioredoksinov, pri tem se porablja NADPH. Pri tem procesu pa pride tudi do redukcije askorbata (34).

Tioredoksinski sistem ima pomembno vlogo pri celični rasti, zaščiti pred oksidacijskimi poškodbami in apoptozo, ugotavljajo pa tudi njegovo vlogo pri raku, AIDS-u in avtoimunih boleznih (34).

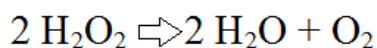


Slika 6: Reakcijska shema tioredoksin reduktaze. Prirejeno po (34).

1.4.3 Katalaza (CAT)

Katalaza (CAT) je encim iz družine hemoproteinov, saj ima v aktivnih mestih Fe^{3+} - hem. Naloga CAT je odstranjevanje vodikovega peroksida, s tem pa preprečuje nastanek hidroksilnega radikala (27).

Nahaja se predvsem v peroksisomih. Najdemo jo v različnih tkivih, največjo aktivnost pa doseže v jetrih, eritrocitih in ledvicah (27).



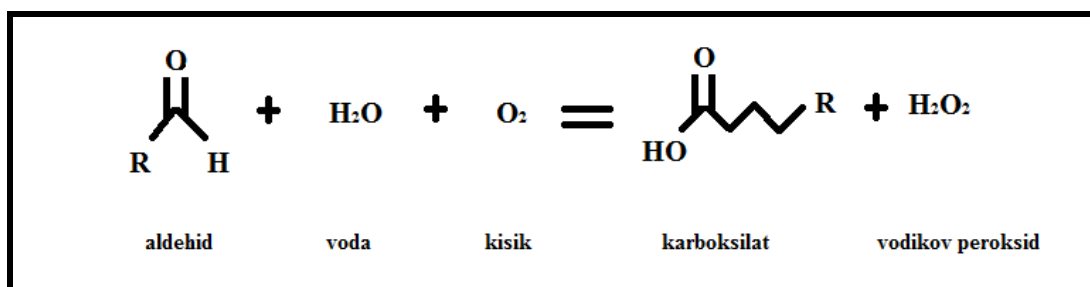
Slika 7: Reakcija, ki jo katalizira CAT. Prirejeno po (27).

1.4.4 Aldehid oksidaza (AOX1)

Aldehid oksidaza spada v skupino molibdenskih flavoproteinov. Encim je prisoten v citosolu vseh vretenčarjev. Katalizira mnoge oksidacije, kot svoj substrat pa lahko prepozna različne kemične strukture kot so aldehidi, nitrozo derivati, imini, aromatski heterocikli... (35)

Največjo aktivnost ima v jetrih, najdemo pa jo tudi v pljučih, gastrointestinalnem traktu in ledvicah (35).

Pri *in vitro* testiranjih so osteoblaste tretirali z vodikovim peroksidom in s tem celice izpostavili oksidativnem stresu. Pri tem so opazovali ekspresijo genov. Med geni, ki kodirajo antioksidativne encime, se je najbolj povečalo izražanje prav gena za AOX1. To dokazuje njegovo pomembno vlogo pri odgovoru na stres (36).

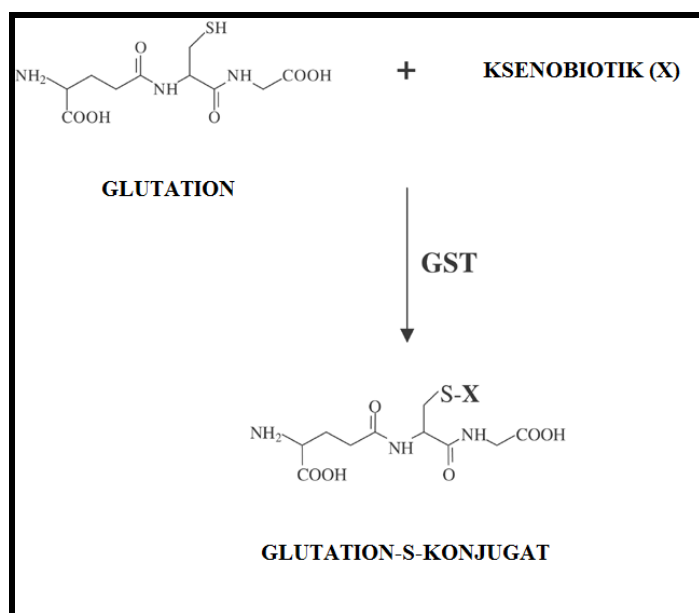


Slika 8: Reakcijska shema AOX1. Prirejeno po (37).

1.4.5 Glutation S transferaza π 1 (GSTP1)

Glutation S transferaze so družina detoksifikacijskih encimov faze II. Njihova naloga je zaščita celičnih makromolekul pred napadom reaktivnih elektrofilov in kataliza konjugiranega glutathiona (38).

GSTP 1 je endogeni inhibitor c-jun N-terminalne kinaze, ki je vključena v odgovor na stres, apoptozo in celično proliferacijo (38).



Slika 9: Reakcijska shema GSTP1. Prirejeno po (38).

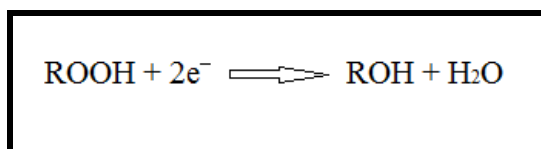
1.4.6 Selenoprotein P (SEPP1)

Selenoprotein P je glikoprotein, ki spada med antioksidativne selenoproteine. V svoji proteinski molekuli ima 10 selenocisteinskih ostankov in tako predstavlja 40–50 % vsega plazemskega selena. Odgovoren je za transport selena v tkiva, vezavo heparina, kompleksacijo ionov težkih kovin in zvečano aktivnost glutathion peroksidaze (39).

Najvišje vrednosti Sepp1 lahko določimo v plazmi, možganih in testisih, njegovo pomanjkanje pa vodi v nevrološke težave in moško sterilnost (39).

1.4.7 Peroksiredoksin 5 (PRX5)

Peroksiredoksin 5 je monomerni encim, ki spada v skupino peroksiredoksinov. To je družina antioksidativnih encimov, ki imajo v aktivnem mestu cistein. Nahaja se v mitohondrijih, peroksisomih in citosolu. Njegova naloga je odstranjevanje vodikovega peroksida, peroksinitritov in drugih organskih hidroperoksidov (ROOH) (40).



Slika 10: Reakcijska shema PRX5. Prirejeno po (40).

1.5 ANGIOGENEZA IN OSTEOARTROZA

1.5.1 Angiogeneza

Angiogeneza je rast novih kapilarnih krvnih žil iz že obstoječega žilja. Normalno se pojavi med osnovnimi fiziološkimi procesi, kot so embriogeneza, celjenje ran in menstrualni cikel pri ženskah. Pojavlja pa se tudi pri različnih patoloških stanjih, ki vključujejo neželeno rast novih žil pri kroničnih vnetnih boleznih, ter rast in metastaziranje tumorjev. Proces uravnavajo številni aktivacijski in inhibitorni dejavniki, ki se lahko razlikujejo glede na vrsto tkiva in bolezensko stanje. Pozitivni regulator angiogeneze je tudi hipoksija, ki je v zdravem hrustancu navzoča zaradi njegove neožiljenosti. S procesom angiogeneze je močno povezano tudi vnetje (če je prisotno, bolezen imenujemo osteoartritis), ki vsaj v nekaterih elementih deluje po podobnih mehanizmih (43, 44).

1.5.2 Vaskularni endotelijski rastni dejavnik A (VEGFA)

Vaskularni endotelijski rastni dejavnik A je glikozilirani homodimer, ki specifično deluje na endotelijske celice. Povečuje vaskularno permeabilnost, inducira angiogenezo in rast endotelijskih celic, inhibira apoptozo. Mutacije gena VEGFA so lahko povezane z nastankom proliferativne in neproliferativne diabetične retinopatije (41).

VEGFA je močan spodbujevalec angiogeneze, ki uravnava tudi metabolizem hondrocitov. Združuje invazijo krvnih žil s hipertrofičnim preoblikovanjem hrustanca in osifikacijo pri osteoartrozi. Pri osteoartrozi je zvišano izražanje VEGFA v hondrocitih. VEGFA tudi zavira izločanje tkivnih inhibitorjev metaloproteinaz in s tem posledično olajšuje izločanje MMP (42).

1.5.3 Angiogeneza v kosti in hrustancu pri osteoartroznem sklepu

Vaskularizacija sklepnega hrustanca in prisotnost osteofitov je karakteristika osteoartroze, saj je zdrav sklepni hrustanec pri odraslem neožiljen. Krvne žile prodrejo v kalcificiran hrustanec skozi fibrovaskularne kanale iz subhondralne kosti. Z napredovanjem bolezni se žile vedno bolj razraščajo, tako da jih lahko najdemo tudi bolj površinsko v nekalificiranem hrustancu (43).

Rast krvnih žil je uravnavana z ravnotežjem med angiogenimi in antiangiogenimi faktorji znotraj hrustanca. Vnetje, ki je pri osteoartrozi vedno prisotno, neposredno spodbuja angiogenezo preko sproščanja rastnih dejavnikov iz makrofagov in tudi s stimulacijo drugih celic, npr. hondrocitov, živčnih celic in osteoblastov, da izločajo angiogene dejavnike. Angiogeneza vodi v endohondralno osifikacijo in tvorbo osteofitov, kar pa vodi v novo vnetje. Nove žile lahko sčasoma postanejo oživčene in kot take postanejo tudi vzrok za bolečine (43).

2. NAMEN DELA

Rezultati predhodno objavljenih študij kažejo, da reaktivne kisikove zvrsti in posledično oksidativni stres, do katerega pride zaradi prekomernega nastanka ROS, močno prispevajo k nastanku s starostjo povezanih kroničnih bolezni, tudi osteoartroze.

Angiogeneza je odgovorna za različna patološka stanja, kot so neželena rast krvnih žil pri kroničnih vnetnih boleznih ter rast in metastaziranje tumorjev. Formacija novih žil omogoča dodatno oskrbo s krvjo in hranili, to pa pomeni tudi infiltracijo tkiv z vnetnimi mediatorji (43).

Namen magistrskega dela je:

- Ugotoviti povezavo med izražanjem genov za antioksidativne encime SOD2, TXNRD1, CAT, SEPP1, AOX1, PRDX5, GSTP1 in vaskularnim endotelijskim rastnim dejavnikom VEGFA v hrustancu in:
 - geni, ki kodirajo kolagen IIA1 (COL2A1), agrekan (AGC1), COMP, faktor za določitev spola - regija 9 (SOX9), ki odražajo anabolno aktivnost hondrocitov.
 - geni, ki kodirajo komponente signalne poti HTRA1/DDR2/MMP13, za katero obstajajo dokazi, da ima pomembno vlogo pri razgradnji hrustančnega matriksa pri osteoartrozi.

Z določitvijo zgornjih povezav želimo ugotoviti, ali obstajajo *in vivo* povezave med izražanjem antioksidativnih encimov in VEGFA z označevalci aktivnosti hondrocitov in sistemom HTRA1/DDR2/MMP13. Morebitne povezave bi nakazovale na pomembno pot vpliva oksidativnega stresa na razgradnjo hrustanca, in s tem kvaliteto hrustanca, ki smo jo določili z merjenjem izražanja genov, specifičnih za hrustanec, kot so npr. COL2A1, COMP.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

Vzorci hrustanca so bili odvzeti 23 preiskovancem *post mortem*, ki so bili napoteni na obdukcijo na Inštitut za sodno medicino, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Pred odvzemom vzorca je bil narejen tudi makroskopski pregled hrustanca z namenom ugotoviti, ali so opažene osteoartrozne spremembe hrustanca in v kakšnem deležu. Izsek kostnine skupaj s hrustancem je bil odvzet iz najbolj obremenjenega dela glave stegenice. Vzorec je bil shranjen v sterilnem nevtralnem fosfatnem pufru za krajši čas. Po odstranitvi hrustanca od subhondralne kosti, pa je bil hrustanec zamrznjen v tekočem dušiku in shranjen na -80 °C do izolacije RNK.

3.2 IZOLACIJA IN VREDNOTENJE RNK

Celokupna RNK je bila predhodno izolirana iz hrustanca, ovrednotena in prepisana v cDNK. Kostnino so homogenizirali s krogličnim mlinčkom Mikro-Dismembrator S (Sartorius AG, Nemčija) in hrustančno tkivo ves čas hladili s tekočim dušikom. Približno 100 mg uprašenega hrustančnega tkiva so prenesli v lizirajoči reagent QIAzol (Qiagen, Evropa).

Celokupno RNK so izolirali s pomočjo komercialnega reagenčnega kompleta RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Nemčija). Izolirano celokupno RNK so resuspendirali v vodi brez RNaz (HyClone, Thermo Scientific, Nemčija) in shranili na -80°C.

Čistost in koncentracijo izolirane celokupne RNK so določili z merjenjem absorbance (A) pri valovni dolžini 230 nm, 260 nm, 280 nm s pomočjo UV/VIS spektrofotometrije. To je ena izmed najbolj enostavnih metod za kvantifikacijo določenih snovi v raztopini. Temelji na dejstvu, da proteini v raztopini absorbirajo UV svetlobo valovne dolžine 280 nm, nukleinske kisline (DNK, RNK) absorbirajo UV svetlobo valovne dolžine 260 nm, pri 230 nm pa absorbirajo ogljikovi hidrati, fenoli in EDTA. Razmerje absorbanc A260 in A280 se uporablja za določanje čistosti DNK in RNK (kontaminacija s proteini). Vrednost ~1,8 kot čisto označuje DNK, medtem ko RNK velja za čisto pri razmerju ~2,0. Razmerje absorbanc A260 in A230 se uporablja kot dodatno preverjanje čistosti DNK oz. RNK. Tukaj je vrednost za čisto nukleinsko kislino višja, in sicer med 2,0 in 2,2 (45).

3.3 PREPIS RNK V cDNK

Prepis iz RNK v cDNK je potreben, ker je sama molekula RNK bistveno manj stabilna od cDNK in bi bilo potrebno zagotavljati precej bolj stroge pogoje pri rokovanju z vzorci z RNK.

mRNK je bila predhodno prepisana z uporabo kita High Capacity cDNK Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Nemčija).

reagenti:

- SYBR Select MasterMix (Life Technologies, Evropa)
- ultra čista voda (dH₂O)
- začetni in končni oligonukleotidni začetnik za vsak gen (smerni F in protismerni R oligonukleotidni začetnik)

oprema:

- qPCR inštrument LightCycler ® 480 II (Roche Diagnostics, Nemčija)
- centrifuga CENTRIC 322A (Tehtnica, Slovenija)
- mikrocentrifuga FVL – 2400N Combi – Spin (Biosan)
- komora za PCR z UV lučjo (BioSan)
- pipete Eppendorf Research (100-1000µl, 20-200µl, 0,5-10µl)
- nastavki za pipete
- epice 1,5 mL
- ploščica za pipetiranje s 384 luknjicami
- vibracijski mešalnik za epice (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemčija)

metodi:

- obratno prepisovanje
- PCR

PCR v realnem času

PCR v realnem času je zelo občutljiva kvantitativna metoda. S pomočjo fluorescence, ki se meri tekom posameznega cikla, lahko natančno določimo količino PCR produkta (DNK, cDNK, RNK) (46).

Sama reakcija poteka ciklično v treh stopnjah, vsak cikel se običajno ponovi približno 40-krat. Najprej potече denaturacija pri kateri reakcijsko zmes segrejemo na temperaturo med 92°C in 95°C. Zaradi visoke temperature potече reverzibilna denaturacija dvoverižne DNK (prekinejo se vodikove vezi), dobimo dve enoverižni DNK (ss-DNK, ang. single stranded DNA). Sledi faza prileganja, kjer znižamo temperaturo na okoli 50 - 65°C. S tem omogočimo vezavo oligonukleotidnih začetnikov na komplementarna mesta matrične ssDNK. Temperatura prileganja mora biti 3-5°C nižja od talilne temperature oligonukleotidnih začetnikov. Zadnja faza je podaljševanje komplementarne verige, ki poteka pri temperaturi 72°C ob prisotnosti termostabilne DNK polimeraze (npr. Taq-polimeraza). Le ta katalizira podaljševanje komplementarne verige. Pri tem nastaneta dve popolnoma enaki kopiji začetne DNK (47).

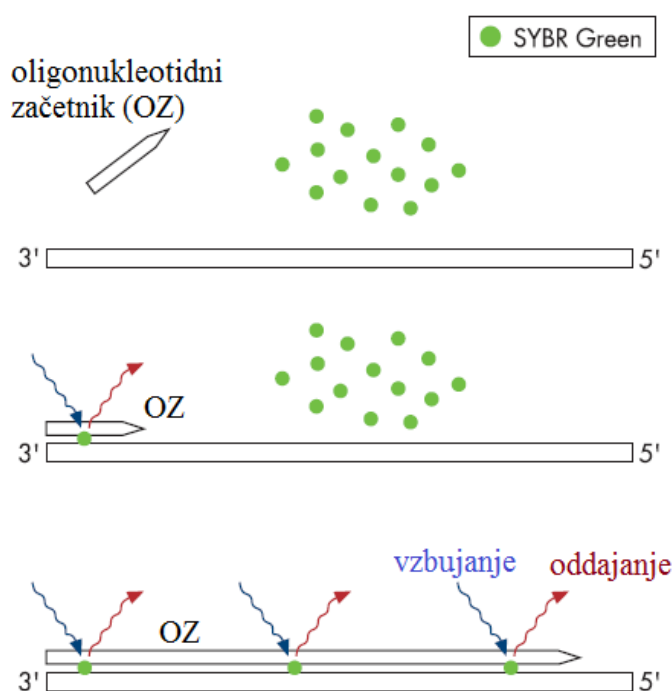
Fluorescenco omogoča izbrano barvilo, ki ga vključimo v reakcijo. Obstajata dve vrsti barvil in sicer 1. barvila, ki so vezana na specifično oligonukleotidno zaporedje ter 2. barvila, ki se nespecifično vežejo na dvovijačno DNK (46).

1. Specifična barvila

Detekcija s TaqMan® sondami (sonda je sestavljena iz reporterskega barvila in dušilca; tekom PCR reakcije DNK polimeraza sondo razcepi, prosto reportersko barvilo ob vzbujanju oddaja fluorescentno svetlobo), detekcija s hibridizacijskimi sondami (prisotni sta dve sondi, ena ima vezano akceptorsko, druga pa donorsko barvilo; fluorescenco merimo v fazi prileganja, ko sta obe sondi vezani na tarčo; v fazi podaljševanja pa se sondi ločita, s tem pa se preneha tudi fluorescenca), barvila ki se uporabljajo pri fluorogenih sondah (npr. Marina Blue, Yakima Yellow, Texas Red...) (46).

2. Nespecifična barvila

Fluorescentno barvilo SYBR Green se veže na vse dvovijačne DNK molekule in ob vzbujanju močno fluorescira. Maksimum vzbujanja je pri valovni dolžini 494 nm, maksimum oddajanja pa pri 521 nm, kar nam omogoča, da barvilo uporabimo pri kateremkoli inštrumentu za qPCR. Detekcija se izvaja v fazi podaljševanja. Intenzivnost signala narašča z naraščanjem števila ciklov zaradi kopičenja PCR produkta. Uporaba barvila SYBR Green omogoča detekcijo različnih tarč brez uporabe specifičnih sond. Vendar pa k fluorescentnemu signalu prispevajo tudi nespecifični PCR produkti in dimeri oligonukleotidnih začetnikov, zato je pri uporabi barvila SYBR Green potrebna visoka PCR specifičnost (46). Tako barvilo smo uporabili tudi mi.



Slika 11: Shema vgrajevanja barvila SYBR Green v dvovijačno DNK. Povzeto po (46).

3.4 PRIPRAVA – NAČRTOVANJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV

Na začetku smo določili oligonukleotidne začetnike za gene, ki jih bomo preiskovali. To so: superoksid dismutaza 2 (SOD2), tioredoksin reduktaza 1 (TXNRD), katalaza (CAT), selenoprotein P (SEPP1), aldehyd oksidaza (AOX1), glutation S transferaza π 1 (GSTP1), peroksiredoksin 5 (PRDX5), vaskularni endotelijski rastni dejavnik A (VEGFA), faktor za

določitev spola – regija 9 (SOX9), proteoglikan agrekan (AGC1), kolagen tipa 2A1 (COL2A1), hrustančni oligomerni matrični protein (COMP), glutation peroksidaza 1 (GPX1) in glutation reduktaza (GSR). Zadnja dva gena smo kmalu po začetku raziskave izključili, dodali pa smo gene za matriks metaloproteinazo 13 (MMP13), visoko temperaturo zahtevajoči faktor A1 (HTRA1), diskodinsko področje receptorja 2 (DDR2) in pet referenčnih genov: aktin beta (ACTB), beta 2 mikroglobulin (B2M), velik ribosomalni protein P0 (RPLP0), na TATA mesto vezoči protein (TBP) in ribosomalni protein L13a (RPLP13A).

S pomočjo PubMed-a (48) smo poiskali izbrane gene in njihovo nukleotidno zaporedje, oligonukleotidne začetnike (primerje) za posamezni gen pa smo načrtovali s pomočjo programa Primer – BLAST (49). S pomočjo tega programa smo preverili njihovo specifičnost za preiskovani gen na mRNK in morebitno tvorbo produkta na genomski DNK in jih nato tudi naročili pri izbranem proizvajalcu (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Input PCR template

Specificity of primers

Other reports

none

Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)

[Search Summary](#)

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGAAGTTCAATGGTGGTGGTCA	22	60.09	45.45	7.00	2.00
Reverse primer	AGCAACTCCCCTTTGGGTTC	20	60.18	55.00	3.00	0.00

Products on target templates

>NM_001024465.1 Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), transcript variant 2, mRNA

product length = 91

Forward primer	1	TGAAGTTCAATGGTGGTGGTCA	22
Template	417		438

Reverse primer	1	AGCAACTCCCCTTTGGGTTC	20
Template	507		488

>NM_000636.2 Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), transcript variant 1, mRNA

product length = 91

Forward primer	1	TGAAGTTCAATGGTGGTGGTCA	22
Template	417		438

Reverse primer	1	AGCAACTCCCCTTTGGGTTC	20
Template	507		488

Slika 12: Shema rezultatov programa Primer - BLAST. Povzeto po (49).

Tabela I: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo qPCR.

gen	Oligonukleotidni začetnik	zaporedje	Talilna temperatura T _m (°C)
SOD2	F-začetnik	TGAAGTTCAATGGTGGTGGTCA	60,09
	R-začetnik	AGCAACTCCCCTTTGGGTTC	60,18
TXNRD1	F-začetnik	AACGGAGCTGCAGACGAAA	59,93
	R-začetnik	ACCAGGGTGATGATCTTTAGCTGAC	62,38
CAT	F-začetnik	CTTTTTGCCTATCCTGACACTCA	58,67
	R-začetnik	ATTTGGAGCACCACCCTGATT	59,92
GPX	F-začetnik	GGAGAACGCCAAGAACGAAG	59,21
	R-začetnik	AGAGCATGAAGTTGGGCTCG	60,39
SEPP1	F-začetnik	CGTTGGAAGTGGTTGTTTAAGTTCT	60,16
	R-začetnik	CTCCCGATGGGAGGAGACAG	61,11
GSR1	F-začetnik	GCTGAAGTTCTCCCAGGTCAAGG	62,99
	R-začetnik	CAGAGCAGGCAGTCAACATCT	60,34
AOX1	F-začetnik	AAATAGACTGCCTGACGGGG	59,46
	R-začetnik	TGCACCTTCAATCTGGCCTA	59,01
GSTP1	F-začetnik	TATTTCCCAGTTCGAGGCCG	59,82
	R-začetnik	TAGGCAGGAGGCTTTGAGTG	59,38
PRDX5	F-začetnik	TTCAAGGGCAAGAAGGGTGTG	60,75
	R-začetnik	CTGGCAGGTGTGTCTTGAACA	62,97
SOX9	F-začetnik	GGGCAAGCTCTGGAGACTTCTG	62,88
	R-začetnik	CCCGTTCTTCACCGACTTCC	60,67
COL2A1	F-začetnik	AGCCATGATTCGCCTCGG	59,89
	R-začetnik	CTGCCAGCCTCCTGGACAT	61,68
AGC1	F-začetnik	GGCGAGCACTGTAACATAGACCA	62,53
	R-začetnik	TCAGCATCCACCCAGGTCTC	61,27
COMP1	F-začetnik	CGTTCTTCTGCTCACCCTGG	60,67
	R-začetnik	CAGGTCTGAGCCCAACGGG	62,61
TBP	F-začetnik	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	61,93
	R-začetnik	CACATCACAGCTCCCCACCA	62,13
B2M	F-začetnik	AGATGAGTATGCCTGCCGTG	59,89
	R-začetnik	GCGGCATCTTCAAACCTCCA	60,96
RPLP13A	F-začetnik	AAAAAGCGGATGGTGGTTC	56,41
	R-začetnik	CTTCCGGTAGTGGATCTTGG	57,40
VEGFA	F-začetnik	TATTTCCCAGTTCGAGGCCG	59,8
	R-začetnik	TAGGCAGGAGGCTTTGAGTG	59,4
ACTB	F-začetnik	CTTCGCGGGCGACGAT	59,89

	R-začetnik	AATCCTTCTGACCCATGCCC	59,74
RPLP0	F-začetnik	TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT	59,67
	R-začetnik	CAATCTGCAGACAGACACTGG	58,93
MMP13	F-začetnik	GGACAAGTAGTTCCAAAGGCTA	61,1
	R-začetnik	AGACCTAAGGAGTGCCGAA	64,9
HTRA1	F-začetnik	TCCCAACAGTTTGCGCCATA	68,5
	R-začetnik	AAACGGAAGCTTGCGAAACA	66,7
DDR2	F-začetnik	GGACCCAGAGGGAGACTGTAG	64,0
	R-začetnik	TGTTGGAAGTGGAGTCTCTGGG	67,6

3.5 OPTIMIZACIJA QPCR ZA PREISKOVANE GENE

Sterilizacija materiala in priprava komore za PCR:

Pri samem delu smo uporabljali le sterilni material, zato smo morali pred začetkom dela vse ustrezno sterilizirati. Epice in nastavke za pipete smo zložili v za to namenjene posode (stekleni kozarci in plastični vsebniki) in jih avtoklavirali (121°C, 20 minut, 1 bar). Neposredno pred pričetkom dela smo pripravili še komoro za PCR. Celotno notranjo površino smo obrisali s hipokloritom, vanjo dali ves potreben material (epice, nastavki za pipete in pipete, ploščica s 384 luknjicami, folija za ploščico...) in nato za 15 minut prižgali UV luč v komori.

Priprava standardne krivulje:

Po reakciji z reverzno transkriptazo smo dobili koncentracijo cDNK v vseh vzorcih 15 ng/μL, končni volumen posameznega vzorca je bil 20 μL. Iz pripravljene zmesi vzorcev smo pripravili standarde. Koncentracije standardov in njihov način priprave je prikazan v spodnji tabeli (Tabela II).

Tabela II: Priprava standardov.

standard	volumen cDNK (μL)	volumen voda (μL)	končni volumen (μL)	prenos v naslednje redčenje
st1 (5 ng/μL)	60 stock* cDNK	120	180	120
st2 (2,5 ng/μL)	120	120	240	60
st3 (1,25 ng/μL)	60	60	120	60
st4 (0,625 ng/μL)	60	60	120	60
st5 (0,313 ng/μL)	60	60	120	60
st6 (0,156 ng/μL)	60	60	120	

* zaloga cDNK, ki smo jo predhodno pripravili

Pripravili smo reakcijsko zmes za qPCR, koncentracija oligonukleotidnih začetnikov je bila 100 nM (Tabela V). V ploščico s 384 luknjicami smo pipetirali 5 μL standarda oz. vzorca in 10 μL reakcijske zmesi za qPCR. Standarde smo nanašali v duplikatu, vzorce in negativno kontrolo (NTC) pa v triplikatu (Tabela III). V primeru negativne kontrole smo namesto reakcijske zmesi dodali ultra čisto vodo. Nato smo ploščico prekrili z lepljivo folijo, jo 5 minut centrifugirali s hitrostjo 2300 r.p.m in jo vstavili v PCR aparat. Na aparatu LightCycler 480 II smo nastavili program po priporočilih proizvajalca reagenčne zmesi SYBR Select (Tabela IV). Opisani način pipetiranja in priprave ploščice je bil enak tekom celotne raziskave.

Tabela III: Shema pipetiranja na 384 ploščici.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	st1	-	st2	-	st3	-	st4	-	st5	-	st6	-	NTC	-	-
B	vz1	-	-	vz2	-	-	vz3	-	-						
C	st1	-	st2	-	st3	-	st4	-	st5	-	st6	-	NTC	-	-
D	vz5	-	-	vz19	-	-	vz20	-	-	vz21	-	-			

Tabela IV: Program na LC480.

korak	temperatura	čas	število ciklov
UDG aktivacija	50 °C	2 min	1
začetna denaturacija	95 °C	2 min	1
denaturacija	95 °C	15 s	45
prileganje in podaljševanje	60 °C	60 s	
melting	65 – 97 °C		1
ohlajanje	40 °C	30 s	

3.6 OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV

Optimalno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov za posamezen gen v naši študiji smo določili s pripravo reakcijske zmesi za qPCR z oligonukleotidnimi začetniki z različnimi koncentracijami, in sicer 100 nM, 200 nM in 600 nM (Tabele V, VI in VII).

Tabela V: Reakcijska zmes za qPCR, 100 nM oligonukleotidni začetniki.

	1x	18x
dH ₂ O	2,35	42,5
F - začetnik	0,075	1,35
R - začetnik	0,075	1,35
SYBR Select 2x	7,5	135
cDNK	5,0	

Tabela VI: Reakcijska zmes za qPCR, 200 nM oligonukleotidni začetniki.

	1x	5x
dH ₂ O	2,2	11
F - začetnik	0,15	0,75
R - začetnik	0,15	0,75
SYBR Select 2x	7,5	375
cDNK	5,0	

Tabela VII: Reakcijska zmes za qPCR, 600 nM oligonukleotidni začetniki.

	1x	5x
dH ₂ O	1,6	8,0
F - začetnik	0,45	2,25
R - začetnik	0,45	2,25
SYBR Select 2x	7,5	37,5
cDNK	5,0	

Poleg določitve optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in s tem nastankom specifičnega produkta qPCR, smo v tem poizkusu želeli dokazati še, da naši oligonukleotidni začetniki ne pomnožujejo genomske DNK. V ta namen smo pripravili vzorec celokupne RNK enega od naših vzorcev hrustanca brez reverzne transkriptaze (H47-RT), da smo preverili specifičnost oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje cDNK. Če bi v tem vzorcu dobili produkt, bi to pomenilo, da je prisotna tudi genomska DNK oz., da oligonukleotidni začetniki niso specifični za mRNK. Ta vzorec smo razredčili na enako koncentracijo (2,5 ng/μL) kot standard 2 (11,7 μL H47-RT in 58,3 μL dH₂O).

V 384 ploščico smo pipetirali 5 μL standarda in 10 μL reakcijske zmesi za qPCR (Tabela VIII).

Tabela VIII: Shema pipetiranja na 384 ploščici.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
A	st1	-	st2	-	st3	-	st4	-	st5	-	st6	-	NTC	-	-	H47-RT	-
B	200	-	NTC	-	600	-	NTC	-									
C	st1	-	st2	-	st3	-	st4	-	st5	-	st6	-	NTC	-	-	H47-RT	-
D	200	-	NTC	-	600	-	NTC	-									

Obravnavali smo po dva gena hkrati, torej je bil prvi gen v vrsticah A in B, drugi gen pa v vrsticah C in D. Postopek smo ponovili za vse proučevane gene.

Več poizkusov optimizacije je bilo potrebno opraviti za več genov. Za gene CAT, SEPP1, ACTB, GSTP1, AGC1, COMP, MMP13, HTRA1, DDR2 in GSTP1 smo uporabili bolj razredčene standarde, njihove koncentracije so bile 1.25 ng/μL, 0.625 ng/μL, 0.313 ng/μL, 0.156 ng/μL, 0.078 ng/μL in 0.039 ng/μL (Tabela IX). V reakcijski shemi za qPCR smo za

vse gene uporabili 600 nM oligonukleotidne začetnike (Tabela VII), le v primeru HTRA1 smo uporabili 100 nM oligonukleotidne začetnike (Tabela V). Ker za gen GSTP1 s koncentracijami oligonukleotidnih začetnikov 100 nM in 200 nM nismo dobili produkta v qPCR, pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov 600 nM pa zelo malo, smo se odločili poizkusiti še koncentracijo 1000 nM (Tabela X). Program na aparatu LC480 je bil SYBR Select MM (Tabela IV).

Tabela IX: Priprava standardov.

standard	volumen cDNK (μ L)	volumen voda (μ L)	končni volumen (μ L)	prenos naslednje redčenje
st1 (1,25 ng/ μ L)	22,5 stock cDNK	247,5	270	180
st2 (0,625 ng/ μ L)	180	180	360	90
st3 (0,313 ng/ μ L)	90	90	180	90
st4 (0,156 ng/ μ L)	90	90	180	90
st5 (0,078 ng/ μ L)	90	90	180	90
st6 (0,039 ng/ μ L)	90	90	180	

Tabela X: Reakcijska shema za qPCR, 1000 nM oligonukleotidni začetniki.

	1x	17x
dH ₂ O	1,0	17,0
F - začetnik	0,75	12,75
R - začetnik	0,75	12,75
SYBR Select 5x	7,5	127,5
cDNK	5,0	

Tudi za gene RPLP13A, RPLPO in VEGFA smo uporabili bolj razredčene standarde (Tabela IX). Pri genu RPLP13A smo prav tako uporabili 600 nM oligonukleotidne začetnike, reakcijska shema je enaka kot je prikazano v Tabeli VII. Pri genih RPLPO in VEGFA smo uporabili 100 nM oligonukleotidne začetnike, reakcijska shema je enaka kot je prikazano v Tabeli V.

Spremenili smo program na aparatu LC480, razlika je, da sta v tem primeru cikla prileganja in podaljševanja ločena, saj se razlikujeta v temperaturi prileganja in podaljševanja. Spremembe so prikazane v tabeli XI.

Tabela XI: Program na aparatu LC480 za pomnoževanje RPLP13A in VEGFA.

korak	temperatura	čas	število ciklov
UDG aktivacija	50 °C	2 min	1
začetna denaturacija	95 °C	2 min	1
denaturacija	95 °C	15 s	45
prileganje	56 °C	15 s	
podaljševanje	72 °C	60 s	
melting	65 – 97 °C		1
ohlajanje	40 °C	30	

3.7 DOLOČITEV NAJBOLJŠEGA REFERENČNEGA GENA

Najbolj pogosto uporabljeni referenčni geni so tako imenovani hišni geni. Zanje velja, da so široko in konstitutivno izraženi v različnih tkivih. Že majhne spremembe v ekspresiji referenčnega gena pa lahko vodijo do napačnih zaključkov, zato je potrebno ekspresijsko stabilnost preučiti za vsako specifično tkivo in vrsto eksperimenta posebej. Kombinacija več referenčnih genov nam zagotavlja boljše rezultate, vendar pa je potrebno paziti, da izberemo optimalno število genov. Le to je doseženo, ko dodatek novega gena vodi v zanemarljivo redukcijo povprečne variance genov. Ocena variance znotraj skupine zagotavlja naravno pot določitve števila vključenih genov (50,51).

Uporabili smo pet standardov, katerih koncentracije so bile 0.625 ng/μL, 0.313 ng/μL, 0.156 ng/μL, 0.078 ng/μL in 0.039 ng/μL. Reakcijska zmes za qPCR je bila pripravljena v dveh različicah, in sicer s 100 nM oligonukleotidnimi začetniki za gena RPLP0 in B2M ter s 600 nM oligonukleotidnimi začetniki za gene ACTB, TBP in RPLP13A. Med 23 preiskovanimi vzorci, ki smo jih razdelili v 2 skupine glede na kvaliteto hrustanca (normalen in s prisotnimi zgodnjimi degenerativnimi spremembami), smo izbrali 5 vzorcev iz vsake skupine za določitev referenčnega gena. Normalen hrustanec so predstavljali vzorci H7, H26, H27, H28 in H47, patološki hrustanec pa vzorci H16, H33, H34, H44 in H46. Vsak vzorec smo naredili v triplikatu.

Tabela XII: Reakcijska zmes za qPCR, 100 nM oligonukleotidni začetnik.

	1x	53x
dH ₂ O	2,35	124,55
F - začetnik	0,075	3,975
R - začetnik	0,075	3,975
SYBR Select 2x	7,5	397,5
cDNK	5,0	

Tabela XIII: Reakcijska shema za qPCR, 600 nM oligonukleotidni začetnik.

	1x	53x
dH ₂ O	1,6	84,8
F - začetnik	0,45	23,85
R - začetnik	0,45	23,85
SYBR Select 2x	7,5	397,5
cDNK	5,0	

Tabela XIV: Shema pipetiranja na 384 ploščici.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	st1	-	-	st2	-	-	st3	-	-	st 4	-	-	st 5	-	-	-	NTC	-	-	-				
B	H7	-	-	H16	-	-	H26	-	-	H 27	-	-	H 28	-	-	H 33	-	-	H34	-	-	H 44	-	-
C	H46	-	-	H47	-	-																		
D	st1	-	-	st2	-	-	st3	-	-	st 4	-	-	st 5	-	-	-	NTC	-	-	-				
E	H7	-	-	H16	-	-	H26	-	-	H 27	-	-	H 28	-	-	H 33	-	-	H34	-	-	H 44	-	-
F	H46	-	-	H47	-	-																		

Obravnavali smo po dva gena hkrati, torej je bil prvi gen v vrsticah A, B in C, drugi gen pa v vrsticah D, E in F. Postopek smo ponovili za vseh pet genov.

Na aparatu LC480 smo nastavili program, prilagojen MM SYBR Select ABI (Tabela IV). Ta program smo uporabili za vse gene, razen za gen RPLP13A. Pri njem smo uporabili dvostopenjski program, pri katerem je temperatura prileganja 56°C (Tabela XI).

3.8 qPCR PREISKOVANIH VZORCEV HRUSTANCA

Pred določitvijo izražanja 17 preiskovanih genov smo iz zmesi cDNK različnih vzorcev hrustanca s koncentracijo cDNK = 15 ng/ μ L pripravili standarde z enakimi koncentracijami kot v prej opisanih postopkih (Tabela IX). Nato smo naše preiskovane vzorce razredčili na enako koncentracijo kot je standard 2, torej na 0,625 ng/ μ L. Pri tem smo uporabili 7,5 μ L vzorca in 292,5 μ L dH₂O in pri tem dobili skupni volumen 300 μ L, kar je zadoščalo za določitev 17 genov z upoštevanjem rezerve pri pipetiranju ali morebitnih napakah. Nato smo pripravili reakcijsko zmes za qPCR. Za gene AOX1, PRDX5, SOX9, COL2A1 in HTRA1 smo uporabili 100 nM oligonukleotidne začetnike, 600 nM oligonukleotidni začetniki so bili pri genih SOD2, TXNRD1, CAT, SEPP1, RPLP13A, ACTB, AGC1, COMP, VEGFA, MMP13 in DDR2, za GSTP1 pa je bila koncentracija oligonukleotidnih začetnikov 1000 nM.

Tabela XV: Reakcijska zmes za qPCR, 100 nM oligonukleotidni začetniki.

	1x	109x
dH ₂ O	2,35	256,15
F - začetnik	0,075	8,175
R - začetnik	0,075	8,175
SYBR Select 2x	7,5	817,5
cDNK	5,0	

Tabela XVI: Reakcijska zmes za qPCR, 600 nM oligonukleotidni začetniki.

	1x	109x
dH ₂ O	1,6	174,4
F - začetnik	0,45	49,05
R - začetnik	0,45	49,05
SYBR Select 2x	7,5	817,5
cDNK	5,0	

Tabela XVII: Reakcijska zmes za qPCR, 1000 nM oligonukleotidni začetniki.

	1x	109x
dH ₂ O	1,0	109,0
F - začetnik	0,75	81,75
R - začetnik	0,75	81,75
SYBR Select 2x	7,5	817,5
cDNK	5,0	

Na aparatu LC480 smo nastavili program, prilagojen MM SYBR Select (Tabela IV). Ta program smo uporabili za vse gene, razen za gena RPLP13A in VEGFA. Tam smo uporabili dvostopenjski program, pri katerem je temperatura prileganja 56 °C (Tabela XI).

3.9 STATISTIČNE METODE

Statistično analizo smo izvedli s pomočjo računalniškega programa SPSS/PASW verzija 18.0.0 (IBM, Chicago, IL, USA) in MS Excel 2010. Izračunali smo povprečne vrednosti in standardni odklon za starost in indeks telesne teže udeležencev v raziskavi. Normalnost porazdelitve izražanja preiskovanih genov smo preverili z uporabo Shapiro-Wilkovega testa. Ta test nam pove, da se vzorci porazdeljujejo normalno, če je $p > 0,05$. V tem primeru lahko uporabimo parametrične teste, npr. Pearsonovo korelacijo. Če pa je $p < 0,05$ se vzorci ne porazdeljujejo normalno, zato uporabimo neparametrične teste, npr. Spearmanovo korelacijo. Korelacije med geni za antioksidativne encime in hondrocitnimi označevalci smo tako izračunali s pomočjo Spearmanovega rho koeficienta korelacije. Vrednost p smo zmanjšali z 0,05 na 0,02 ker smo sočasno testirali korelacije za 15 izmerjenih genov. Če je bila vrednost $p > 0,02$ smo zaključili, da med posameznima spremenljivkama ne obstaja statistično značilna povezava. Nasprotno pa lahko pri $p < 0,02$ trdimo, da med posameznima spremenljivkama obstaja statistično pomembna povezava. Spearmanov koeficient korelacije nam pove stopnjo povezave med posameznimi spremenljivkami. Lahko zavzame vrednosti med -1 in 1, pri čemer -1 pomeni popolnoma negativno povezanost, 0 pomeni da med spremenljivkama ni povezave, vrednost 1 pa označuje popolnoma pozitivno povezavo.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPIS PREISKOVANE SKUPINE

V študijo smo vključili 23 preiskovancev brez anamneze kostnih bolezni ali bolezni sklepov. Prav tako so bili izključeni vsi preiskovanci z endokrinološkimi boleznimi, cirozo jeter ali katerokoli boleznijo, za katero obstajajo predhodni znanstveni dokazi, da ima vpliv na presnovo kosti. Izključeni so bili tudi preiskovanci, za katere smo imeli podatke, da so jemali zdravila, ki bi lahko vplivala na proces kostne presnove. V raziskavo je bilo vključenih 23 oseb, od tega 17 moških in 5 žensk, njihove antropološke značilnosti so predstavljene v Tabeli XVIII. Za eno osebo nismo imeli antropoloških podatkov, vendar je imela ustrezne ostale vključitvene kriterije in za nadaljnjo analizo teh podatkov nismo potrebovali, zato smo ta vzorec hrustanca kljub temu uporabili v naši raziskavi.

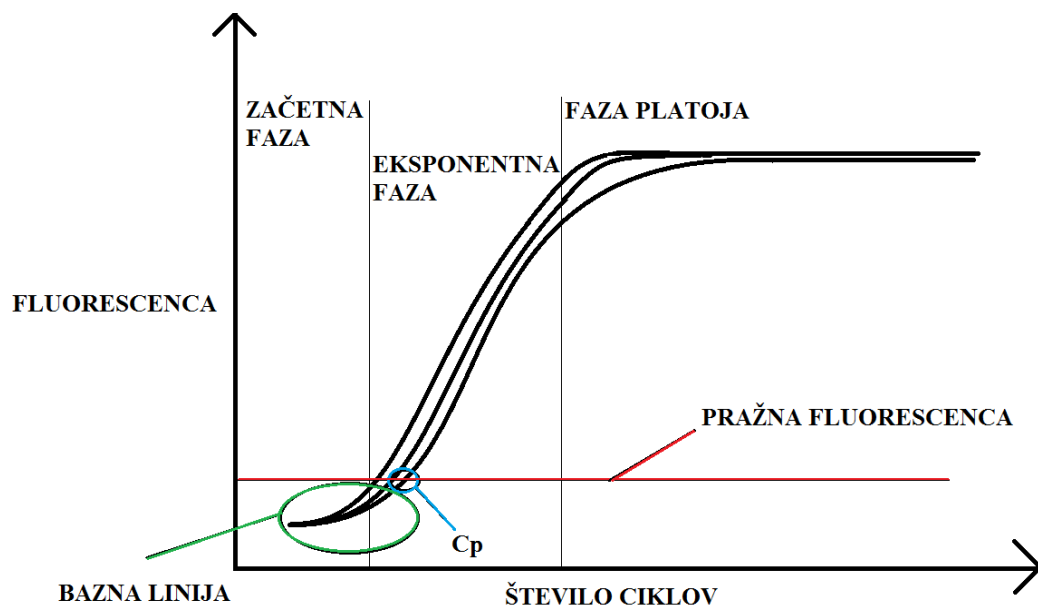
Tabela XVIII: Antropološke značilnosti preiskovancev.

	N	Minimum	Maksimum	Srednja vrednost	Std. deviacija
Starost (leta)	22	56	87	70,64	9,149
Višina (m)	22	1,61	1,88	1,7327	0,07330
Telesna teža (kg)	22	60	105	79,64	11,830
ITM	22	21,51	33,30	26,4742	3,21890

4.2 ANALIZA QPCR REZULTATOV

Graf C_p v odvisnosti od fluorescence

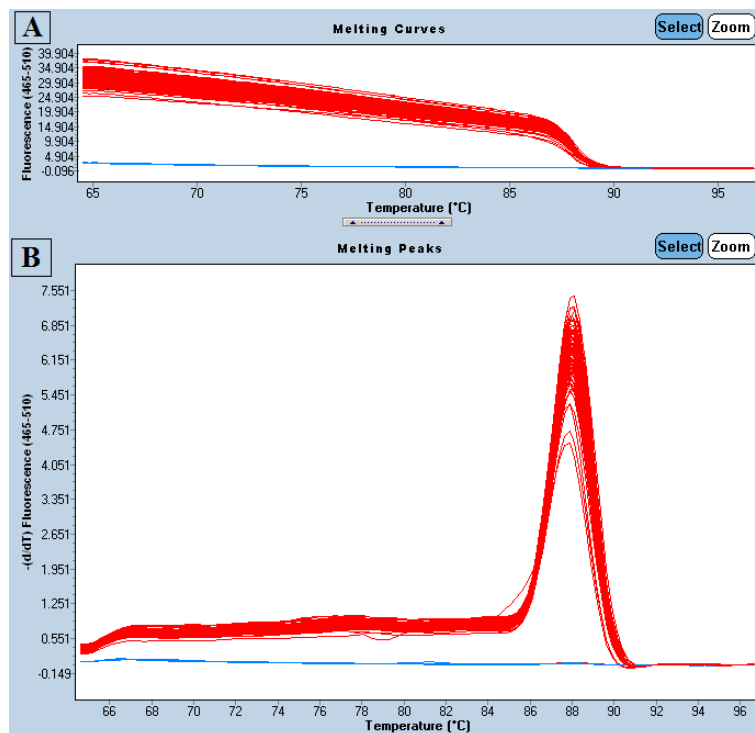
Celotno krivuljo pomnoževanja lahko razdelimo na tri dele. Najprej je začetna faza, sledi eksponentna faza, reakcija pa se zaključi s fazo platoja, v kateri se reakcija tudi ustavi. Merjenje nastalega produkta se izvaja v eksponentni fazi PCR reakcije, v kateri določimo tudi prazno fluorescenco. To je odziv, pri katerem je intenziteta odziva značilno višja od ozadja. Cikel, pri katerem se to zgodi imenujemo C_p -cikel (ang. crossing point). Uporabljamo ga za izračun začetnega števila kopij cDNK, saj so C_p vrednosti obratnosorazmerne začetnemu številu. Večje kot je to začetno število, manjši je C_p (52, 53).



Slika 13: Krivulja pomnoževanja.

Talilna krivulja

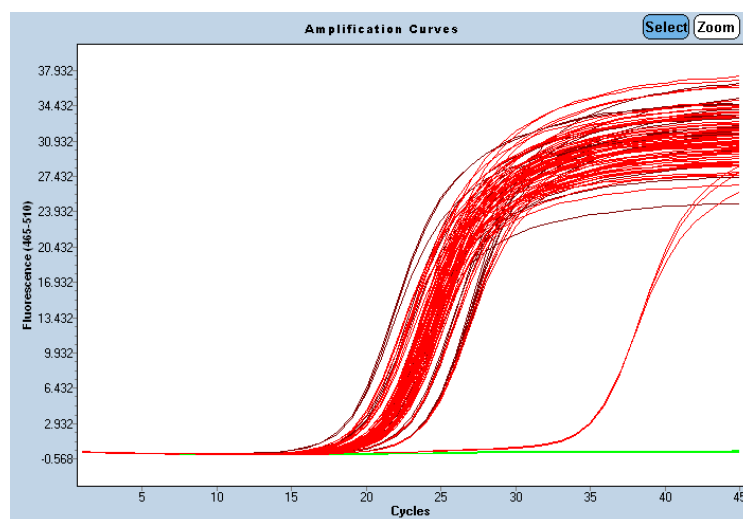
Nenadno zmanjšanje fluorescence v grafu talilne krivulje se pojavi, ko dvovijačna DNK, na katero je vezano fluorescentno barvilo, razpade v enovijačno DNK. To se zgodi, ko temperatura preseže talilno temperaturo DNK. Pri tem opazujemo dve krivulji. Prva je odvisnost fluorescence od temperature (na sliki 14 označeno z A), druga pa njen drugi odvod (količnik med spremembo fluorescence in spremembo temperature v odvisnosti od temperature) (na sliki 14 označeno z B). S tem dobimo boljši vpogled v samo talilno dinamiko, enostavno pa lahko preverimo tudi morebitno kontaminacijo, prisotnost dimerov oligonukleotidnih začetnikov in specifičnost PCR reakcije. Talilna temperatura produkta PCR reakcije je namreč odvisna od njene dolžine, vsebnosti nukleinskih baz citozina in gvanozina ter drugih dejavnikov, različni PCR produkti pa se pogosto razlikujejo v talilnih karakteristikah (53).



Slika 14: Talilna krivulja za COMP.

NTC (ang. no-template control)

NTC reakcijska zmes vsebuje vse komponente PCR reakcijske zmesi, razen vzorca. S tem preverimo kontaminacijo PCR reagentov oziroma prisotnost neželenih nukleinskih kislin in prisotnost dimerov iz oligonukleotidnih začetnikov. Uspešno reakcijo tako predstavlja negativen rezultat, na grafu se ne pojavi noben vrh, kar je prikazano tudi na Sliki 15 z zeleno krivuljo (46, 53).



Slika 15: Krivulja pomnoževanja. NTC, -RT sta prikazani z zeleno barvo.

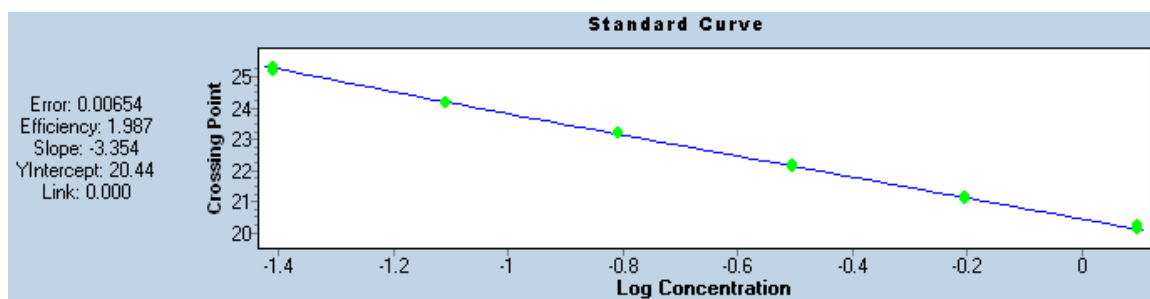
Kontrola genomske DNK

Reakcijska zmes vsebuje vse komponente PCR reakcijske zmesi, razen reverzne transkriptaze. Če pride do pomnoževanja to nakazuje na prisotnost DNK v vzorcu RNK. Stremimo k temu, da v vzorcu ni prisotna DNK ali da se oligonukleotidni začetniki specifično vežejo le na cDNK, posledica tega je, da je ta reakcija negativna, kar z zeleno barvo prikazuje Slika 15 (53).

Standardna krivulja

Standardno krivuljo pripravimo s serijsko razredčenimi vzorci znanih koncentracij (standardi) z namenom ocenjevanja učinkovitosti reakcije. Na abscisni osi ležijo logaritemske vrednosti koncentracij standardov, na ordinatni osi pa C_p (ang. cycle of quantification) vrednosti. Z njeno pomočjo dobimo informacije o samem poteku reakcije in različne parametre reakcije. Med njimi so najpomembnejši presečišče z y-osjo (ustreza teoretični meji detekcije PCR reakcije), naklon (meri učinkovitost reakcije, idealen je -3,32) in učinkovitost (100% učinkovitost sovпада z naklonom -3,32 kar pomeni, da se produkti PCR reakcije v vsakem ciklu eksponentne faze pomnoževanja podvajajo; dobra reakcija ima učinkovitost med 90% in 110%, kar predstavlja naklon med -3,58 in -3,10) (53).

$$\text{Učinkovitost} = 10^{(-1/\text{naklon})} - 1$$



Slika 16: Standardna krivulja.

4.3 OPTIMIZACIJA OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV

Za analizo izražanja genov SOD2, TXNRD1, CAT, SEPP1, AOX1, GSTP1, PRDX5, SOX9, COL2A1, AGC1, COMP1, RPLP13A, ACTB, VEGFA, MMP13, DDR2 in HTRA1 smo najprej optimizirali koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov. Najbolj optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov je tista, pri kateri dobimo specifičen produkt pri čim nižjem cp. Spremljali smo tudi talilno krivuljo, pri kateri smo stremeli k dejstvu, da opazimo samo en nastali produkt. Koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov smo za vse gene uspešno optimizirali (Tabela XIX). Pri večini genov je najbolj optimalna koncentracija 600 nM oz. 100 nM, le v primeru GSTP1 je ta koncentracija 1000 nM.

Tabela XIX: Rezultati optimizacije qPCR preiskovanih genov.

gen	naklon standardne krivulje	učinkovitost	cp za st. 5 ng/ul (razen če ni v oklepaju navedeno drugače)	cp za st 0.156 ng/ul (razen če ni v oklepaju navedeno drugače)	konc. oligonukleotidnih začetnikov (nM)	program na LC480
SOD2	-3,6	1,9	18	23,6	600	enostopenjski
TXNRD1	-3,4	1,97	26,6	31,7	600	enostopenjski
CAT	-3,5	1,9	27,7 (1,25 ng/ul)	33 (0,039 ng/ul)	600	enostopenjski
SEPP1	-3,5	1,9	25,5 (1,25 ng/ul)	30,9 (0,039 ng/ul)	600	enostopenjski
AOX1	-2,8	2,2	27	32	100	enostopenjski
GSTP1	-4,3	1,7	26,3 (1,25 ng/ul)	33,3 (0,039 ng/ul)	1000	enostopenjski
PRDX5	-3,5	1,9	23,9	29,1	100	enostopenjski
SOX9	-3,2	2	23,9 (1,25 ng/ul)	28,2	100	enostopenjski
COL2A1	-3,3	1,9	15,04	20,4	100	enostopenjski
AGC1	-3,5	1,9	22,2 (1,25 ng/ul)	27,9 (0,039 ng/ul)	600	enostopenjski
COMP1	-3,6	1,9	20,8 (1,25 ng/ul)	26,4 (0,039 ng/ul)	600	enostopenjski
RPLP13A	-4,4	1,7	26,8 (1,25 ng/ul)	34,1 (0,039 ng/ul)	600	dvostopenjski, Tann=56 °C
ACTB	-3,7	1,9	22,2 (1,25 ng/ul)	27,7 (0,039 ng/ul)	600	enostopenjski
VEGF	-3,7	1,85	24,6 (0,625 ng/ul)	28,8 (0,039 ng/ul)	100	dvostopenjski,

				ng/ul)		Tann=60 °C
MMP13	-3,6	1,9	23,9 (1,25 ng/ul)	29,6 (0,039 ng/ul)	600	enostopenjski
DDR2	-3,8	1,8	19,9 (1,25 ng/ul)	25,7 (0,039 ng/ul)	600	enostopenjski
HTRA1	-4,2	1,7	29,4 (1,25 ng/ul)	36 (0,039 ng/ul)	100	enostopenjski

Tann, temperatura prileganja oligonukleotidnega začetnika

4.4 DOLOČITEV REFERENČNEGA GENA

Referenčni gen smo določili s pomočjo programa NormFinder.xla, version 20 (50). Določitev optimalnega para referenčnih genov smo izvedli med kandidatnimi referenčnimi geni RPLP13A, RPLP0, ACTB, B2M in TBP. Za najboljšega se je izkazal gen RPLP13A, saj je imel najnižjo vrednost dejavnika stabilnosti po izračunu s pomočjo programa NormFinder. Najboljša kombinacija dveh genov po izračunu NormFinder pa je bila RPLP13A in ACTB, ki smo jo tudi uporabili pri nadaljnjem delu. Vrednost stabilnosti za omenjeno kombinacijo najbolj stabilnih genov znaša 0,209. Vse preiskovane gene smo normalizirali na geometrično sredino teh dveh referenčnih genov, ki smo ju izmerili za vse vzorce skupaj s 16 preiskovanimi geni.

Tabela XX: Dejavnik stabilnosti za določitev referenčnega gena. Nižja vrednost dejavnika stabilnosti pomeni večjo stabilnost.

gen	vrednost stabilnosti
RPLP13A	0,251
RPLP0	0,443
ACTB	0,325
B2M	0,471
TBP	0,443

Tabela XXI: Dejavnik stabilnosti za variabilnost znotraj posamezne skupine.

	zdrav hrustanec	hrustanec z degenerativnimi spremembami
RPLP13A	0,023	0,353
RPLP0	0,231	1,270
ACTB	0,384	0,265
B2M	0,801	0,047
TBP	0,230	1,365

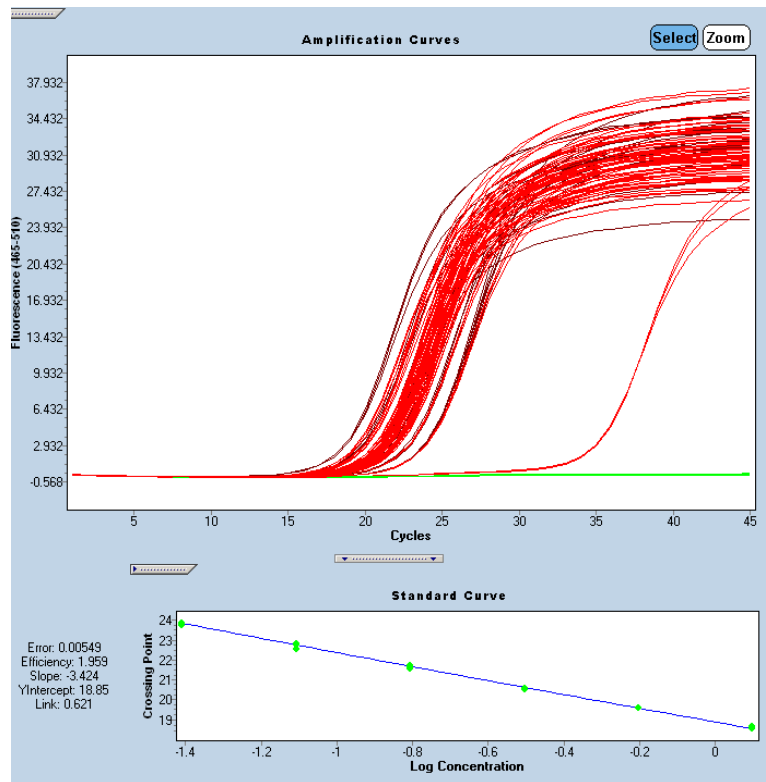
Tabela XXII: Dejavnik stabilnosti za variabilnost med skupinama.

	zdrav hrustanec	hrustanec z degenerativnimi spremembami
RPLP13A	0,095	-0,095
RPLP0	0,221	-0,221
ACTB	-0,086	0,086
B2M	-0,410	0,410
TBP	0,179	-0,179

4.5 ANALIZA IZRAŽANJA GENOV

Izražanje genov smo merili z reakcijo kvantitativnega PCR v realnem času. Pri tem smo uporabili ustrezne oligonukleotidne začetnike za posamezni gen (zaporedje je prikazano v Tabeli I) in interkalirajoče barvilo SybrGreen I. Zanimale so nas predvsem razlike v ciklih (tj. Cp) in s tem razlike v koncentraciji cDNK, kar pomeni razlike v izražanju genov.

Uspešen potek reakcije prikazuje slika 17. Potek reakcije je uspešen če je: negativna kontrola negativna (zelena črta na zgornjem grafu ostaja vodoravna), učinkovitost (ang. efficacy) med 1,8 in 2,2 ter spodnji graf padajoče linearen z idealnim naklonom -3,3, kar ustreza učinkovitosti 2,0.



Slika 17: Rezultati reakcije PCR v realnem času.

Z omenjeno metodo smo uspešno izmerili izražanje vseh proučevanih genov in jih vključili v statistično analizo.

4.6 REZULTATI IZRAŽANJA GENOV

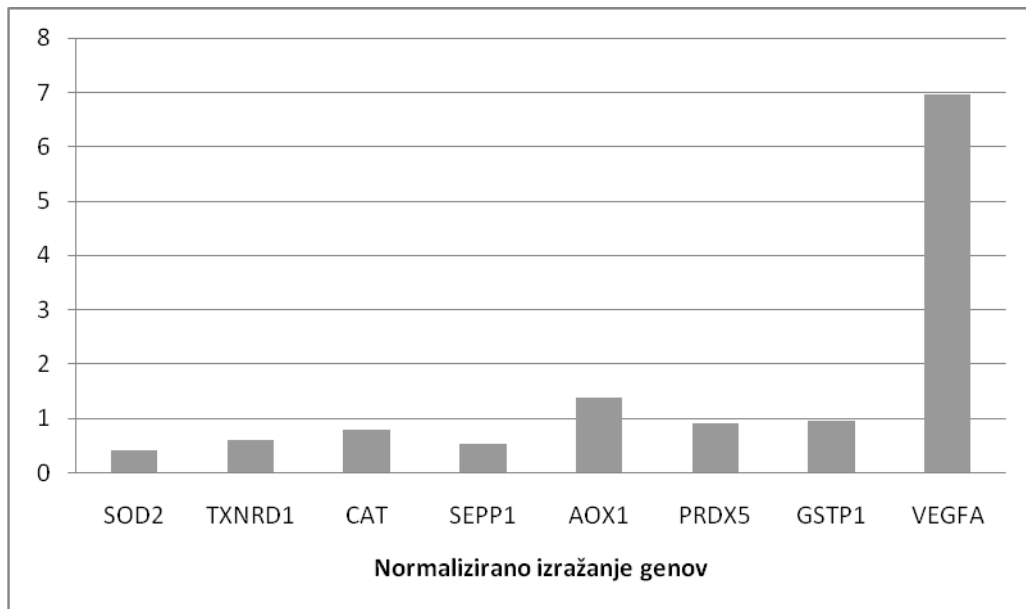
V našem delu smo se osredotočili na izražanje genov za antioksidativne encime in VEGFA, gene za hondrocitne označevalce in gene signalne poti za razgradnjo hrustanca HTRA1/DDR2/MMP13 v vzorcih hrustanca 23 preiskovancev (Tabela XXIII).

Tabela XXIII: Izražanje preiskovanih genov. Vrednosti so normalizirane na dva referenčna gena.

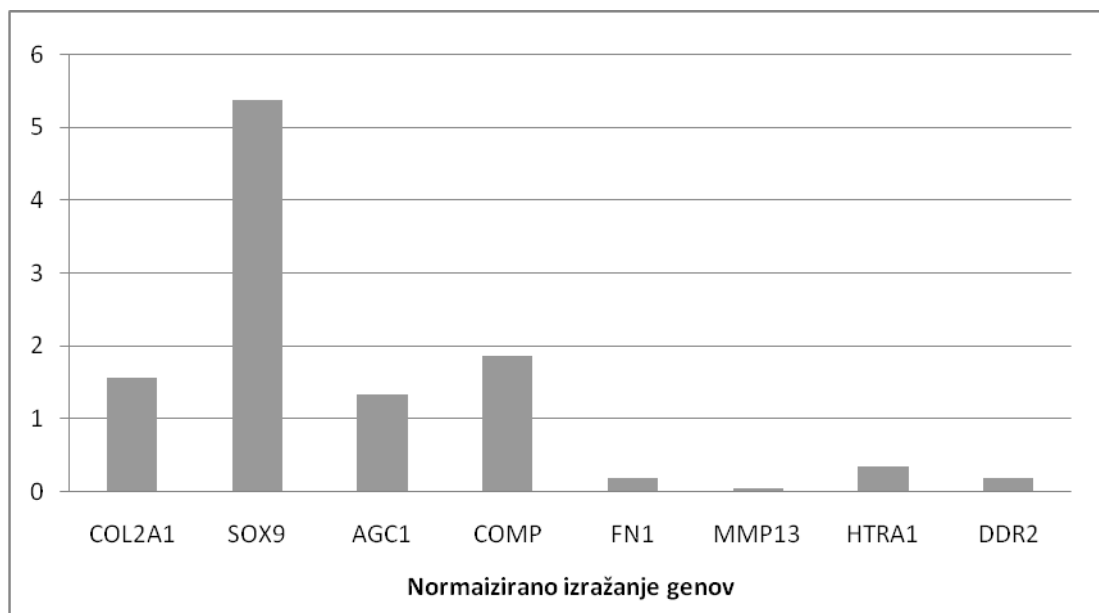
	Srednja vrednost	Standardna deviacija	N
SOD2	0,42680295	1,012478600	23
TXNRD1	0,60382841	0,171657198	23
CAT	0,78695910	0,324957539	23
SEPP1	0,52462038	0,326070929	23
AOX1	1,37355705	0,593853112	23
PRDX5	0,91077466	0,314461081	23
COL2A1	1,56866229	1,618273550	23
SOX9	5,37232396	2,609439341	23
GSTP1	0,96530365	0,304806928	23
AGC1	1,32803386	0,611397294	23
COMP	1,86293887	1,311161378	23
VEGFA	6,96950515	5,908398847	23
MMP13	0,04034453	0,039730991	23
HTRA1	0,35231977	0,256615147	23
DDR2	0,18806898	0,155451531	23
FN1	0,18806898	0,155451531	23

Statistično pomembno korelacije med posameznimi geni prikazuje Tabela XXIV. Ker se izražanje genov ne porazdeljujejo normalno, smo uporabili Spearmanovo korelacijo.

Iz spodnjih stolpčnih diagramov je razvidno, da je najvišje izražen antioksidativni gen AOX1, najnižje izražen antioksidativni gen je SOD2 (Graf 1), najvišje izražen gen za hondrocitne označevalce je SOX9, najnižje izražen gen za hondrocitne označevalce je FN1 (Graf 2).



Graf 1: Izražanje preiskovanih genov za antioksidativne encime in VEGFA.



Graf 2: Izražanje preiskovanih genov za hondrocitne označevalce in signalno pot HTRA1/DDR2/MMP13.

Tabela XXV: Rezultati statistično značilne korelacijske analize med posameznimi geni.

korelacija med posameznima genoma	p	Spearmanov rho koeficient korelacije
SOD2 – COL2A1	0,007	-0,546
CAT – SEPP1	0,017	0,492
CAT – GSTP1	0,007	0,545
SEPP1 – PRDX5	0,007	0,544
SEPP1 – GSTP1	0,003	0,596
AOX1 – PRDX5	0,010	0,528
AOX1 – GSTP1	0,000	0,685
AOX1 – DDR2	0,001	0,663
PRDX5 – GSTP1	0,002	0,608
PRDX5 – AGC1	0,002	0,613
PRDX5 – DDR2	0,007	0,542
COL2A1 – SOX9	0,003	0,588
COL2A1 – VEGFA	0,004	0,579
COL2A1 – HTRfA1	0,001	0,664
COL2A1 – DDR2	0,009	0,534
SOX9 – VEGFA	0,001	0,825
SOX9 – HTRA1	0,017	0,492
SOX9 – DDR2	0,012	0,515
COMP – HTRA1	0,002	0,615
COMP – FN1	0,001	0,669
VEGFA – HTRA1	0,018	0,489
HTRA1 – FN1	0,016	0,496

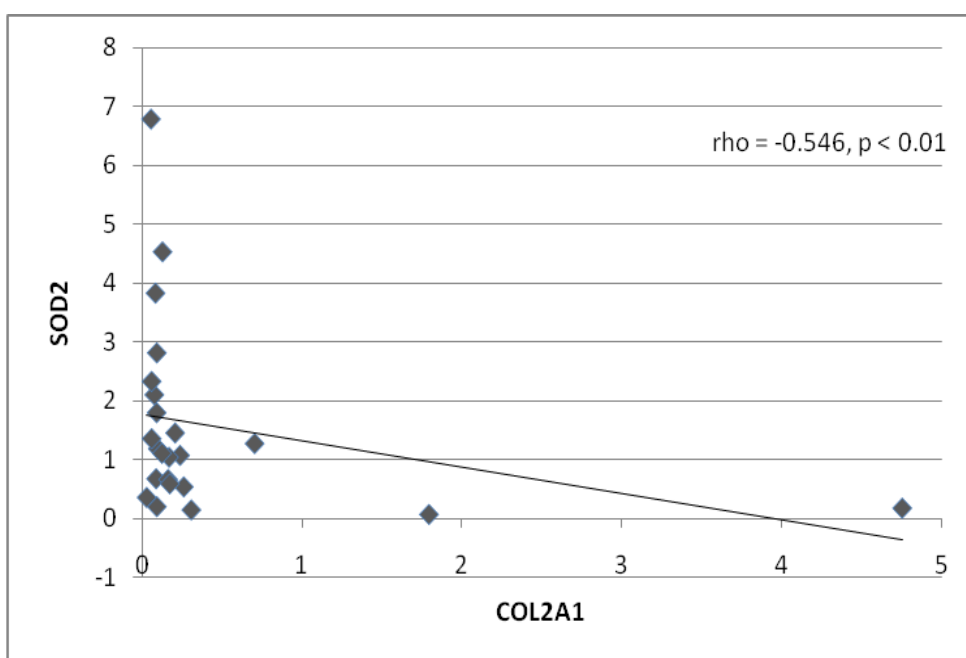
$p < 0,02$

4.6.1 Povezanost izražanja antioksidativnih genov z geni za hondrocitne označevalce

Zanimala nas je korelacija med posameznimi geni za antioksidativne encime in geni, specifičnimi za hrustanec oz. hondrocitnimi označevalci, saj le-ti predstavljajo edino vrsto celic v hrustancu. To so COL2A1, SOX9, AGC1, COMP in FN1. Statistično pomembni sta dve povezavi, med katerimi je ena povezava negativna, druga pa pozitivna (Tabela XXVI). Negativna povezava pomeni, da je povečano izražanje enega preučevanega gena povezano z zmanjšanim izražanjem drugega preučevanega gena. Pozitivna povezava pa pomeni, da

je povečano izražanje enega preučevanega gena povezano s povečanim izražanjem drugega preučevanega gena.

Povečano izražanje SOD2 je povezano z zmanjšanim izražanjem COL2A1 (Graf 3). Povečano izražanje SOD2, ki je najverjetneje posledica zvečane obremenitve z ROS, zmanjša sintezo COL2A1. Zmanjšana oziroma uravnotežena sinteza proteinov zunajceličnega matriksa (torej tudi COL2A1) pa je pomembna za homeostazo hondrocitov. Na podlagi te povezave bi lahko potrdili predhodne študije, ki dokazujejo, da je SOD2 hondroprotektiven, torej prepreči poškodbo hondrocitov, ki bi jo lahko povzročile ROS in bi vodila v iztirjen metabolizem hondrocitov (54, 55).



Graf 3: Povezava med izražanjem SOD2 in COL2A1.

Povečano izražanje PRDX5 je povezano s povečanim izražanjem AGC1. Zaradi povečane produkcije ROS pride do zvečanega izražanja genov za antioksidativne encime. Dokazano je bilo, da ROS razgrajujejo agrekan, zato se zaradi potrebe po obnovi poveča izražanje gena AGC1. To lahko vodi v porušeno homeostazo hondrocitov, saj jih »sili« v pospešeno sintezo proteinov zunajceličnega matriksa in tako pride do porušenega ravnotežja med anabolizmom in katabolizmom hondrocitov, kar lahko vodi v začetek OA (29).

Tabela XXVII: Korelacije med geni za AO encime in geni za hondrocitne označevalce.

korelacija med posameznima genomom	p	Spearmanov rho koeficient korelacije
SOD2 – COL2A1	0,007	-0,546
PRDX5 – AGC1	0,002	0,613

4.6.2 Povezanost izražanja genov za hondrocitne označevalce s signalno potjo HTRA1/DDR2/MMP13

Zanimala nas je povezava genov za hondrocitne označevalce s signalno potjo HTRA1/DDR2/MMP13. Omenjeno signalno pot smo izbrali, ker HTRA1 razgrajuje zunajcelični matriks in s tem tudi COL2A1, DDR2 veže COL2A1, MMP13 pa ga razgrajuje (23).

Statistično pomembnih je šest povezav, ki so vse pozitivne (Tabela XXVIII). Pozitivne povezave so potrdile pomembno povezanost genov te signalne poti z geni za hondrocitne označevalce, gena HTRA1 in DDR2 imata pozitivne povezave z istimi geni hondrocitnih označevalcev.

Tabela XXIX: Korelacije med geni za hondrocitne označevalce in geni signalne poti.

korelacija med posameznima genomom	p	Spearmanov rho koeficient korelacije
COL2A1 – HTRA1	0,001	0,664
COL2A1 – DDR2	0,009	0,534
SOX9 – HTRA1	0,017	0,492
SOX9 – DDR2	0,012	0,515
COMP – HTRA1	0,002	0,615
FN1 – HTRA1	0,016	0,496

Povečano izražanje HTRA1 in DDR2 je povezano z povečanim izražanjem COL2A1, SOX9, COMP in FN1. Predhodne študije so pokazale, da HTRA1 v osteoartroznem sklepu razgrajuje glavne komponente zunajceličnega matriksa, kar naj bi bil eden izmed začetnih korakov v procesu osteoartroze. Pozitivne povezave med HTRA1 in COL2A1, COMP in FN1 v naši študiji potrjujejo to delovanje, saj se povečano izražanje HTRA1 odraža v zvečani razgradnji teh proteinov zunajceličnega matriksa. To izgubo poskuša organizem

regulirati s povečanim izražanjem genov za hondrocitne označevalce. Tako poskuša nadomestiti izgubo hrustančnega matriksa s pospešeno in povečano produkcijo elementov zunajceličnega matriksa. DDR2 se veže na kolagen tipa II, posledično pa se poveča izražanje DDR2 in MMP13, kar vodi v začarani krog razgradnje hrustanca (23).

4.6.3 Povezanost izražanja genov za AO encime s signalno potjo HTRA1/DDR2/MMP13

Preiskovali smo povezavo med geni za antioksidativne encime in geni signalne poti HTRA1/DDR2/MMP13. Statistično pomembni sta dve povezavi, obe sta pozitivni (Tabela XXX).

Tabela XXXI: Korelacije med geni za AO encime in geni signalne poti.

korelacija med posameznima genomama	p	Spearmanov rho koeficient korelacije
AOX1 – DDR2	0,001	0,663
PRDX5 – DDR2	0,007	0,542

Povečano izražanje antioksidativnih encimov AOX1 in PRDX5 je povezano s povečanim izražanjem DDR2. Zaradi oksidativnega stresa pride namreč do povečanega izražanja antioksidativnih encimov. Pozitivno povezavo bi lahko razložili na ta način, da je antioksidativna obramba preslaba in pride zaradi povečanega oksidativnega stresa do razgradnje zunajceličnega matriksa. S tem pride do direktnega stika med hondrociti in kolagenom tipa II, kar vodi v povečano aktivnost in ekspresijo DDR2, kar je bilo dokazano na mišjih hondrocitih (56).

4.6.4 Povezanost izražanja preiskovanih genov z VEGFA

Raziskovali smo povezavo med preiskovanimi geni in VEGFA, da bi ugotovili povezanost AO encimov in genov za hondrocitne označevalce s procesom angiogeneze. Obstajajo tri statistično pomembne povezave, vse so pozitivne (Tabela XXXII).

Tabela XXXIII: Korelacije med preiskovanimi geni z VEGFA.

korelacija med posameznima genomama	p	Spearmanov rho koeficient korelacije
COL2A1 – VEGFA	0,004	0,579
SOX9 – VEGFA	0,001	0,825
HTRA1 – VEGFA	0,018	0,489

Povečano izražanje VEGFA povzroči povečano izražanje COL2A1, saj povečana vaskularizacija hrustanca, ki je fiziološko avaskularno tkivo, pomeni patološki proces in spodbudi hondroците k zvečani tvorbi proteinov zunajceličnega matrika, torej tudi COL2A1 ter s tem v porušenje homeostaze med anabolnimi in katabolnimi funkcijami (57).

Povečano izražanje VEGFA povzroči povečano izražanje SOX9. VEGFA, ki je dokazano povečan pri osteoartrorznem hrustancu, spodbuja preživetje hondroцитов z indukcijo ekspresije antiapoptotičnih molekul kot je na primer Bcl2. Le ta pa ima pomembno vlogo pri uravnavanju apoptoze hondroцитов in pri regulaciji ekspresije matričnih genov preko SOX9 (57). Ugotovili smo zanimivo pozitivno povezavo med HTRA1 in VEGFA, kar lahko razložimo na naslednji način: sproščanje in aktivacija HTRA1 in ostalih encimov vodi v razgradnjo zunajceličnega matriksa. S tem pride do izpostavitve kolagena in aktivacijo DDR2 receptorjev, ki sprožijo spremembe, podobne hipertrofiji hondroцитов. To pa vodi v produkcijo vnetnih citokinov in rastnih dejavnikov, kot je tudi VEGFA (58). Druga razlaga pa je, da lahko sam proces vaskularizacije hrustanca, spodbujen s strani VEGFA, sproži signalno pot za razgradnjo hrustanca, saj je bilo dokazano v predhodnih študijah, da je VEGFA vpleten v patogenezo OA (57).

Z omenjenimi povezavami smo dokazali vpletenost antioksidativnih encimov, VEGFA in signalne poti HTRA1/DDR2/MMP13 v zgodnje degenerativne spremembe hrustanca pri ljudeh.

SKLEP

Raziskavo zaključujemo z naslednjimi sklepi:

- ✓ Med geni za antioksidativne encime je najvišje izražen gen AOX1, najnižje SOD2; med geni za hondrocitne označevalce je najvišje izražen SOX9, najnižje FN1.
- ✓ Med geni za antioksidativne encime in hondrocitnimi označevalci obstajata dve statistično pomembni povezavi in sicer SOD2 - COL2A1 in PRDX5 - AGC1. Negativna je povezava SOD2 – COL2A1 in nakazuje na hondroprotektivno delovanje SOD2.
- ✓ Med geni za hondrocitne označevalce in signalno potjo obstaja šest statistično pomembnih povezav in sicer COL2A1 - HTRA1, COL2A1 - DDR2, SOX9 - HTRA1, SOX9 - DDR2, COMP - HTRA1 in FN1 - HTRA1. Povezave s HTRA1 potrjujejo, da le – ta razgrajuje glavne komponente zunajceličnega matriksa.
- ✓ Med geni za antioksidativne encime in signalno potjo obstajata dve statistično pomembni povezavi in sicer AOX1 - DDR2 in PRDX5 - DDR2. Ti povezavi kažeta na povezanost med oksidativnim stresom in signalno potjo razgradnje v hrustancu, ki se je izkazala za pomembno v predhodnih študijah.
- ✓ Med preiskovanimi geni in VEGFA obstajajo tri statistično pomembne povezave in sicer COL2A1 - VEGFA, SOX9 - VEGFA in DDR2 - VEGFA. Zadnje povezave kažejo na povezanost med procesom angiogeneze in signalno potjo razgradnje hrustanca.

Omenjene povezave so pomembne, ker so dobljene na človeškem tkivu hrustanca brez sklepnih bolezni in nam nakazujejo povezave, ki bi bile lahko pomembne za razumevanje zgodnjih sprememb v patogenezi OA. Zgodnja diagnoza OA je še vedno velik problem, saj premalo poznamo patogenezo OA in trenutno nimamo še na voljo metod za zgodnje odkrivanje OA. Bolniki z OA so tako odkriti šele v pozni fazi OA, ko je edina možnost zdravljenja vstavev sklepne proteze.

LITERATURA

- 1) Štiblar Martinčič D: Histologija univerzitetni učbenik, 1. izdaja, Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Maribor, 2010: 15 – 19.
- 2) Zorc Pleskovič R, Milutinović Živin A, Petrovič D: Histologija učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2006: 23 – 25.
- 3) Barlič A, Maličev E: Zdravljenje poškodovanega sklepnega hrustanca. Zdravniški vestnik, 2008; 77: 141 – 144.
- 4) Mescher A: Junqueira's Basic Histology text & atlas, 12th edition, The McGraw – Hill Companies, 2009, 135 – 142.
- 5) Milner P, Wilkins R, Gibson J: Cellular Physiology of Articular Cartilage in Health and Disease, Principles of Osteoarthritis- Its Definition, Character, Derivation and Modality-Related Recognition, In Tech, 2012: 567 – 590.
- 6) Erggelet C, Mandelbaum B. Mrosek E, Scopp J : Principles of Cartilage Repair, Springer, 2008, 1 – 4.
- 7) Shoulders M, Raines R: Collagen structure and stability. Annual Review of Biochemistry, 2009: 929 – 958.
- 8) <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL2A1>; Genetics Home References, vpogled: 13.11.2013.
- 9) Hauser R: The Acceleration of Articular Cartilage Degeneration in Osteoarthritis by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. Journal of prolotherapy 2010; 2: 305 – 322.
- 10) Kiani C, Chen L, Wu Y, Yee A, Yang B: Structure and function of aggrecan. Cell Research, 2002; 12: 19 – 32.
- 11) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/176>; National Center for Biotechnology Information, vpogled: 28.11.2013
- 12) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1311>; National Center for Biotechnology Information, vpogled: 19.11.2013.
- 13) <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COMP>; Genetics Home References, vpogled: 19.11.2013.
- 14) Ross M, Pawlina W: Histology, A text and atlas With correlated cell and molecular biology, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, ZDA, 2006, 182 – 195.

- 15) Huey D, Hu J, Athanasious K: Unlike Bone, Cartilage Regeneration Remains Elusive. *Science* 2012; 338: 917 – 921.
- 16) <http://lsm1.amebis.si/lsmeds/novPogoj.aspx?pPogoj=artroza>; Slovenski medicinski e-slovar, vpogled: 20.11.2013.
- 17) WHO: The global burden of disease: 2004 update.; 2008.
- 18) Bijlsma J, Berenbaum F, Lefeber F: Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 2011; 377: 2115 – 2126.
- 19) Pal M, Kranjc I, Potočnik U: Osteoarthritis: patogeneza in farmakološko zdravljenje. *Medicinski mesečnik* 2008; 4: 88 – 93.
- 20) Lories R, Luyten F: The bone – cartilage unit in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology* 2011; 7: 43 – 49.
- 21) Pal M, Vogrin M, Ferk P: Glukozamin za peroralno zdravljenje osteoartroze. *Farmacevtski vestnik* 2011; 62: 147 – 153.
- 22) <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HTRA1>; Genetics Home References, vpogled: 21.11.2013.
- 23) Holt D, Hendreson M, Stockdale C, Farrell J, Kooyman D, Bridgewater L, Seegmiller R: Osteoarthritis-like changes in the heterozygous sedc mouse associated with the HtrA1 – Ddr2 – Mmp13 degradative pathway: a new model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012; 20: 430 – 439.
- 24) Iwai L, Payne L, Luczynski M, Chang F, Xu H, Clinton R, Paul A, Esposito E, Gridley S, Leintinger B, Naeglell K, Huang P: Phosphoproteomics of collagen receptor networks reveals SHP-2 phosphorylation downstream of wild – type DDR2 and its lung cancer mutants. *Biochemical Journal* 2013; 454: 501 – 513.
- 25) McCaw A, Ewald A, Werb Z: Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2007; 8 (3): 221 – 233.
- 26) Osredkar J: Oksidativni stres, pregledni članek. *Zdravniški vestnik* 2012; 81: 393 – 406.
- 27) Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M: Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age – Related Diseases and Cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 2009; 3: 73 – 80.
- 28) Burton G, Jauniaux E: Oxidative stress. *Best Practic & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2011; 25: 287 – 299.

- 29) Del Carlo M, Loeser R: Increased Oxidative Stress With Aging Reduces Chondrocyte Survival. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48: 3419 – 3430.
- 30) Henrotin Y, Kurz B, Aigner T: Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?. *Osteoarthritis and Cartilage* 2005; 13: 643 – 654.
- 31) Yudoh K, van Trieu N, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K: Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Research & Therapy* 2005; 7: 380 – 391.
- 32) Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63: 153 – 156.
- 33) Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingler TE, Clark IM, Wallis GA, Boot-Handford RP, Kirkwood TB, Taylor RW, Young DA: Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2010; 69: 1502 – 1510.
- 34) Mustacich D, Powis G: Thioredoxin reductase, Review article. *Biochem J.* 2000; 346: 1 – 8.
- 35) Pride D, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach S, Tran T: Aldehyde Oxidase: An Enzyme of Emerging Importance in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry Perspective* 2010; 53: 8441 – 8460.
- 36) Trošt Z, Trebše R, Preželj J, Komadina R, Bitenc Logar D, Marc J: A microarray based identification of osteoporosis-related genes in primary culture of human osteoblasts. *Bone* 2009; 1 – 9.
- 37) http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=1.2.3.1; The Comprehensive Enzyme Information System, vpogled: 25.10.2013.
- 38) Townsend D, Tew K: The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7369 – 7375.
- 39) Reeves M, Hoffmann P: The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cellular and molecular life sciences* 2009; 66: 2457 – 2478.
- 40) Wood Z, Schröder E, Harris R, Poole L: Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Science* 2003; 28: 32 – 40.
- 41) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7422;](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7422) National Center for Biotechnology Information, vpogled: 26.11.2013.

- 42) Ashraf S, Walsh D: Angiogenesis in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 2008; 20: 573 – 580.
- 43) Bonnet C.S, Walsh D.A: Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 2004; 44: 7 – 16.
- 44) Schütze N: Angiogenesis in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reviews* 2008; 4: 1 – 4.
- 45) 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers. Technical Support Bulletin. NanoDrop Technologies 2007.
- 46) Critical Factors for Successful Real-Time PCR. Real-Time PCR Brochure. Qiagen 2010; 1 – 64.
- 47) Bustin: Expert Guides Definitive qPCR Assay Design. 2012; 1 – 364.
- 48) Zapoređja posameznih genov. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- 49) Primer BLAST. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
- 50) Andreson C, Jensen J, Ørntoft T: Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* 2004; 64: 5245 – 5250.
- 51) Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino J, Gonzalez A: Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Molecular Biology* 2008; 9: 1 – 7.
- 52) Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 56 – 57.
- 53) Real-time PCR: from theory to practice. Invitrogen™, 2008.
- 54) Henrotin Y, Bruckner P, Pujol J: The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003; 11: 747 – 755.
- 55) Gavriilidis C, Miwa S., von Zglinicki T, Taylor R, Young D: Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis and Rheumatology* 2013; 65 (2): 378 – 387.
- 56) Xu L, Polur I, Servais J, Hsieh S, Lee P, Goldring M, Li Y: Intact pericellular matrix of articular cartilage is required for unactivated discoidin domain receptor 2

- in the mouse model. *The American Journal of Pathology* 2011; 179(3): 1338 – 1346.
- 57) Murata M, Yudoh K, Masuko K: The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: How the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis and Cartilage* 2008; 3: 279 – 286.
- 58) Vann der Kraan P, van den Berg W: Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis and Cartilage* 2012; 20: 223 – 232.

5. PRILOGE

Priloga 1: Osebni podatki preiskovancev

vzorec	H RNK	spol	starost (leta)	višina (m)	telesna teža (kg)	BMI
16gl	16	M	78	1,68	70	24,8
21gl	21					
22gl	22	M	70	1,81	88	26,9
25gl	25	M	68	1,74	72	23,8
26gl	26	M	64	1,85	76	22,2
27gl	27	M	81	1,78	79	24,9
28gl	28	F	76	1,69	71	24,9
29gl	29	F	82	1,63	81	30,5
30gl	30	M	71	1,69	89	31,2
32gl	32	M	77	1,76	73	23,6
33gl	33	M	87	1,61	63	24,3
34gl	34	F	83	1,70	73	25,3
35gl	35	M	58	1,74	85	28,1
37gl	37	M	67	1,80	79	24,4
40gl	40	M	74	1,72	68	23,0
41gl	41	M	63	1,88	105	29,7
42gl	42	M	81	1,67	60	21,5
36gl	36	M	58	1,78	89	28,1
44gl	44	F	58	1,62	64	24,4
45gl	45	M	70	1,80	93	28,7
46gl	46	M	56	1,79	95	29,6
48gl	48	M	67	1,68	94	33,3
51gl	51	F	64	1,7	85	29,41

Priloga 2: Izražanje genov v vzorcih

vzorec	SOD2	TXNRD1	CAT	SEPP1	AOX1	PRDX5	COL2A1	SOX9
16gl	0,090629	0,222519	0,552673	0,389601	1,069468	0,487662	0,202338	2,620447
21gl	0,702397	0,563107	0,949824	1,244209	1,756023	1,33938	1,273058	5,745759
22gl	0,054376	0,675673	0,55388	0,250497	1,192491	0,820256	6,777213	9,241978
25gl	0,090494	0,513119	1,167373	1,143663	2,120684	1,314755	2,81139	6,911856
26gl	0,097521	0,499319	0,884219	0,230244	1,218575	0,794702	1,185588	7,448018
27gl	0,082218	0,554542	0,668244	0,661784	1,906744	1,194916	3,825044	9,753347
28gl	1,793011	1,005272	1,068587	0,259812	2,43692	0,678478	0,070185	5,296677
29gl	0,236193	0,475159	1,248006	0,36758	0,911004	0,831084	1,073017	2,675708
30gl	0,086558	0,53736	0,506398	0,368158	0,681246	0,496992	0,676024	3,93759
32gl	0,161634	0,572997	0,608889	0,75482	2,471677	1,446463	0,662759	9,341008
33gl	0,167425	0,700604	1,065317	0,600067	0,952356	0,512914	1,04041	5,096541
34gl	0,123466	0,659191	1,591436	1,186389	1,149235	0,799365	1,107989	3,242619
35gl	0,259534	0,524078	1,034247	0,647063	2,023479	0,936394	0,538	2,138839
37gl	0,089476	0,759507	0,849353	0,577024	1,697233	1,047604	1,796784	6,973145
40gl	0,075188	0,748628	0,830779	0,476532	1,578998	1,014012	2,101672	3,80748
41gl	0,05779	0,44637	0,606803	0,138652	0,863006	0,766996	2,327471	5,647798
42gl	0,306307	0,718266	0,633567	0,232322	1,669382	0,836501	0,148134	2,80856
36gl	0,171841	0,625286	0,413244	0,271108	1,014036	0,851075	0,591277	3,183951
44gl	0,204961	0,58211	0,703148	0,299887	1,215854	0,77101	1,453096	9,419278
45gl	0,126386	0,791633	0,870819	0,721771	1,892156	1,435581	4,525424	8,88308
46gl	4,753503	0,752128	0,120803	0,24932	0,864706	1,25195	0,176745	3,702794
48gl	0,058259	0,705233	0,799702	0,760573	0,266832	1,021043	1,35637	2,41918
51gl	0,027302	0,255954	0,372748	0,235193	0,639708	0,298683	0,359245	3,267796

vzorec	GSTP1	AGC1	COMP	VEGFA	MMP13	HTRA1	DDR2	FN1
16gl	0,721003	0,863477	0,650336	4,717392	0,059027	0,177752	0,630052	0,101901
21gl	1,212523	1,162862	6,541739	10,8981	0	0,678698	0,927863	0,664892
22gl	0,787168	0,889096	1,950524	25,45775	0,060126	0,515671	0,94407	0,328761
25gl	1,1387	1,656201	1,435991	7,971451	0,05392	0,171938	1,709617	0,098103
26gl	0,82161	1,966753	1,105438	5,936691	0	0,40219	1,333166	0,107957
27gl	0,945022	1,772572	2,145218	14,82539	0	0,504102	1,280019	0,144983
28gl	1,336654	0,286435	0,381043	1,701124	0,042106	0,058963	0,752164	0,066292
29gl	0,952495	0,875858	2,518794	1,941394	0,021377	0,275858	0,798551	0,371962
30gl	0,677459	0,462989	0,961015	7,072752	0,02525	0,17498	0,681841	0,148217
32gl	1,815502	1,84506	1,557598	9,359865	0,057285	0,288331	1,500959	0,085683
33gl	0,709941	0,937928	0,828781	4,875217	0,037165	0,288823	0,679913	0,106954
34gl	0,967959	1,568044	1,827905	3,75424	0,049263	0,574205	0,872709	0,188184
35gl	1,46562	2,328543	2,89421	1,296981	0,05004	0,234463	1,198154	0,117675
37gl	1,122528	1,528095	1,985515	8,59884	0,134086	1,020587	0,921975	0,277566
40gl	1,009878	2,513593	2,938766	3,083161	0	0,3634	1,235303	0,085234
41gl	0,58364	0,730752	3,376843	5,6616	0	0,95085	1,201908	0,351908
42gl	0,743166	1,382579	0,899737	3,923846	0	0,086182	1,193966	0,138168
36gl	0,949427	1,852026	1,298231	0,851943	0,077075	0,199476	1,108342	0,072864
44gl	1,042461	0,805939	2,439773	7,906749	0	0,340127	1,377916	0,149919
45gl	0,95064	2,119003	1,770223	18,39419	0	0,340529	1,829329	0,152638
46gl	0,791638	0,859915	2,008345	4,247574	0,109607	0,065998	0,191317	0,47671
48gl	1,052923	1,405429	0,597827	1,406717	0,10951	0,167216	0,54529	0,044343
51gl	0,404025	0,731632	0,733743	6,415654	0,042087	0,223015	0,587335	0,044674

Priloga 3: Korelacije med preiskovanimi geni

		SOD2	TXNRD1	CAT	SEPP1	AOX1	PRDX5	COL2A1	SOX9	GSTP1	AGC1	COMP	VEGFA	MMP13	HRTA1	FN1	DDR2
Spearmanov koeficient korelacije	korelacijski koeficient	1,000	,287	,289	,040	,336	,211	-,546 [~]	-,165	,384	-,015	,083	-,307	-,038	-,342	,219	-,035
	Sig. (2-stranska)	.	,185	,182	,898	,117	,333	,007	,452	,070	,946	,707	,154	,862	,110	,315	,876
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	,287	1,000	,121	,120	,239	,359	,032	,132	,296	,154	-,090	-,051	,173	-,092	,004	,155
	Sig. (2-stranska)	,185	.	,584	,587	,272	,093	,886	,547	,170	,483	,683	,816	,431	,677	,986	,480
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	,289	,121	1,000	,492 [~]	,429 [~]	,156	,199	,004	,545 [~]	,287	,136	-,131	-,218	,200	,075	,195
	Sig. (2-stranska)	,182	,584	.	,017	,041	,477	,364	,986	,007	,185	,535	,550	,318	,361	,733	,373
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	,040	,120	,492 [~]	1,000	,372	,544 [~]	,301	,054	,596 [~]	,437 [~]	,124	,174	,129	,165	-,035	,371
	Sig. (2-stranska)	,858	,587	,017	.	,081	,007	,162	,805	,003	,037	,574	,427	,557	,452	,876	,082
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	,336	,239	,429 [~]	,372	1,000	,528 [~]	,125	,452 [~]	,685 [~]	,479 [~]	,176	,292	-,141	,116	-,057	,663 [~]
	Sig. (2-stranska)	,117	,272	,041	,081	.	,010	,571	,031	,000	,021	,422	,177	,520	,599	,795	,001
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	,211	,359	,156	,544 [~]	,528 [~]	1,000	,353	,278	,608 [~]	,613 [~]	,408	,275	,107	,125	,188	,542 [~]
	Sig. (2-stranska)	,333	,093	,477	,007	,010	.	,099	,200	,002	,002	,053	,205	,625	,568	,391	,007
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	-,546 [~]	,032	,199	,301	,125	,353	1,000	,588 [~]	,077	,314	,462 [~]	,579 [~]	-,245	,664 [~]	,297	,534 [~]
	Sig. (2-stranska)	,007	,886	,364	,162	,571	,099	.	,003	,727	,144	,026	,004	,260	,001	,168	,009
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	-,165	,132	,004	,054	,452 [~]	,278	,588 [~]	1,000	,121	,057	,243	,825 [~]	-,294	,492 [~]	,236	,515 [~]
	Sig. (2-stranska)	,452	,547	,986	,805	,031	,200	,003	.	,584	,795	,264	,000	,174	,017	,278	,012
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	,384	,296	,545 [~]	,596 [~]	,685 [~]	,608 [~]	,077	,121	1,000	,423 [~]	,236	-,079	,182	,015	-,111	,442 [~]
	Sig. (2-stranska)	,070	,170	,007	,003	,000	,002	,727	,584	.	,044	,278	,720	,407	,946	,615	,035
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	-,015	,154	,287	,437 [~]	,479 [~]	,613 [~]	,314	,057	,423 [~]	1,000	,226	-,019	-,039	,258	-,192	,411
	Sig. (2-stranska)	,946	,483	,185	,037	,021	,002	,144	,795	,044	.	,299	,932	,858	,235	,381	,051
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	,083	-,090	,136	,124	,176	,408	,462 [~]	,243	,236	,226	1,000	,203	-,318	,615 [~]	,669 [~]	,475 [~]
	Sig. (2-stranska)	,707	,683	,535	,574	,422	,053	,026	,264	,278	,299	.	,354	,139	,002	,000	,022
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	-,307	-,051	-,131	,174	,292	,275	,579 [~]	,825 [~]	-,079	-,019	,203	1,000	-,212	,489 [~]	,378	,445 [~]
	Sig. (2-stranska)	,154	,816	,550	,427	,177	,205	,004	,000	,720	,932	,354	.	,332	,018	,075	,034
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	-,038	,173	-,218	,129	-,141	,107	-,245	-,294	,182	-,039	-,318	-,212	1,000	-,307	-,189	-,234
	Sig. (2-stranska)	,862	,431	,318	,557	,520	,625	,260	,174	,407	,858	,139	,332	.	,154	,388	,283
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	-,342	-,092	,200	,165	,116	,125	,664 [~]	,492 [~]	,015	,258	,615 [~]	,489 [~]	-,307	1,000	,496 [~]	,349
	Sig. (2-stranska)	,110	,677	,361	,452	,599	,568	,001	,017	,946	,235	,002	,018	,154	.	,016	,103
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	,219	,004	,075	-,035	-,057	,188	,297	,236	-,111	-,192	,669 [~]	,378	-,189	,496 [~]	1,000	,141
	Sig. (2-stranska)	,315	,986	,733	,876	,795	,391	,168	,278	,615	,381	,000	,075	,388	,016	.	,520
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	korelacijski koeficient	-,035	,155	,195	,371	,663 [~]	,542 [~]	,534 [~]	,515 [~]	,442 [~]	,411	,475 [~]	,445 [~]	-,234	,349	,141	1,000
	Sig. (2-stranska)	,876	,480	,373	,082	,001	,007	,009	,012	,035	,051	,022	,034	,283	,103	,520	.
	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23

**Korelacija je signifikantna na 0,01 stopnji (2-stranska)

* Korelacija je signifikantna na 0,05 stopnji (2-stranska)