

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA PRUNK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA PRUNK

**POMEN DOLOČANJA GALEKTINA-3 V SERUMU PRI OSTEOPOROZI IN  
OSTEOARTROZI**

**ROLE OF SERUM GALECTIN-3 DETERMINATION IN OSTEOPOROSIS AND  
OSTEOARTHRISIS**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Zavodu za biokemijo in molekularno biologijo na Farmacevtsko-biokemijski fakulteti Univerze v Zagrebu in na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc in somentorstvom prof. dr. Jerke Dumić. Meritve mineralne kostne gostote so opravili na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani ter na Kliniki za travmatologijo v Splošni bolnišnici Celje. Meritve koncentracije biokemijskih kazalcev kostne premene so opravili na Kliniki za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in v Splošni bolnišnici Celje.

Mentorica: prof. dr. Janja Marc  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Katedra za klinično biokemijo

Somentorica: prof. dr. Jerka Dumić  
Univerza v Zagrebu, Farmacevtsko-biokemijska fakulteta,  
Zavod za biokemijo in molekularno biologijo

#### **Komisija za oceno in zagovor**

Predsednica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Mentorica: prof. dr. Janja Marc

Somentorica: prof. dr. Jerka Dumić

Član: prof. dr. Simon Žakelj

#### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Janje Marc in somentorice prof. dr. Jerke Dumić.

Ljubljana, junij 2014

Mateja Prunk

# Vsebina

Povzetek .....	v
Abstract.....	vi
Seznam kratic .....	vii
1 Uvod .....	1
1.1 Osteoporozna in osteoartroza.....	1
1.2 Galektin-3 .....	2
1.2.1 Splošno .....	2
1.2.2 Biološka vloga .....	3
1.2.3 Galektin-3 v krvnem obtoku.....	4
1.3 Kosti, sklepi in galektin-3 .....	4
1.4 Metode za določanje galektina-3 .....	7
1.4.1 Encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA).....	7
1.4.2 Optimizacija in validacija metode ELISA.....	8
2 Namen dela .....	14
3 Materiali in metode.....	15
3.1 Materiali.....	15
3.1.1 Kemikalije in reagenti .....	15
3.1.2 Pufri in raztopine .....	15
3.1.3 Laboratorijska oprema.....	16
3.1.4 Biološki vzorci.....	17
3.2 Preiskovanci, merjenje MKG in biokemijskih kazalcev.....	18
3.3 Določanje koncentracije galektina-3 v serumu z metodo ELISA.....	19
3.3.1 Priprava umeritvenih raztopin, slepega vzorca in vzorcev .....	19
3.3.2 Postopek dela.....	19
3.3.3 Izračun rezultatov .....	21
3.4 Statistične metode .....	22

4	Rezultati in razprava.....	23
A.	Določanje koncentracije galektina-3 v serumu.....	23
4.1	Optimizacija metode ELISA za določanje galektina-3 v serumu.....	23
4.1.1	Preverjanje reagentov .....	23
4.1.2	Določanje območja linearnosti metode .....	24
4.1.3	Optimizacija analitske občutljivosti .....	25
4.1.4	Ocenjevanje ustreznosti matematičnega modela za izračun umeritvene krivulje .....	27
4.1.5	Točnost .....	29
4.1.6	Natančnost .....	30
4.2	Določanje koncentracije galektina-3 v vzorcih preiskovancev .....	34
B.	Klinični pomen določanja galektina-3 pri OP in OA.....	35
4.3	Povezanost z antropometričnimi lastnostmi .....	35
4.4	Povezanost z osteoporozo in osteoartrozo .....	36
4.5	Povezanost z mineralno kostno gostoto.....	38
4.6	Povezanost s koncentracijo 25-hidroksivitamina D v serumu.....	38
4.7	Povezanost koncentracije galektina-3 s serumskimi kazalci kostne premene .....	39
4.7.1	C-terminalni telopeptid kolagena tipa I.....	39
4.7.2	Osteoprotegerin in RANKL.....	40
4.7.3	Dickkopf 1 .....	41
4.7.4	Parathormon .....	42
5	Sklep.....	43
6	Literatura .....	45

## Kazalo slik

<i>Slika 1: Dejavniki tveganja za osteoporozo in osteoartrozo.</i> .....	2
<i>Slika 2: Princip sendvič metode ELISA s streptavidin-biotinom.</i> .....	8
<i>Slika 3: Oksidacija substrata TMB, ki jo katalizira encim HRP.</i> .....	8

## Kazalo grafov

<i>Graf 1: Rezultati poskusa preverjanja reagentov.</i> .....	23
<i>Graf 2: Razpon koncentracij umeritvenih raztopin 0,06 ng/ml – 4,0 ng/ml in primerjava s primerom krivulje iz navodil proizvajalca.</i> .....	24
<i>Graf 3: Primerjava dveh različnih mikrotitrskih ploščic.</i> .....	26
<i>Graf 4: Optimizacija naklona umeritvene krivulje.</i> .....	27
<i>Graf 5: Primer umeritvene krivulje, izračunane z metodo nelinearne regresije.</i> .....	28
<i>Graf 6: Rezultati testa linearnosti redčitev.</i> .....	30
<i>Graf 7: Koncentracija zbirnega vzorca z nizko koncentracijo galektina-3 določena pri poskusih z vzorci preiskovancev.</i> .....	34

## Kazalo preglednic

<i>Preglednica I: Rezultati ocene ustreznosti matematičnega modela za izračun umeritvene krivulje.</i> .....	28
<i>Preglednica II: Rezultati testa pravilnosti s pridobitvijo dodatka.</i> .....	29
<i>Preglednica III: Natančnost med analizami pri vzorcih preiskovancev z različnimi boleznimi.</i> .....	31
<i>Preglednica IV: Natančnost med serijami pri vzorcih preiskovancev z različnimi boleznimi po optimizaciji pogojev vezave primarnega protitelesa.</i> .....	32
<i>Preglednica V: Natančnost med serijami pri vzorcih zdravih preiskovancev.</i> .....	32
<i>Preglednica VI: Povzetek rezultatov natančnosti pri analizi zbirnih vzorcev.</i> .....	33
<i>Preglednica VII: Povezava koncentracije galektina-3 z antropometričnimi lastnostmi.</i> ....	35
<i>Preglednica VIII: Značilnosti preiskovancev po posameznih skupinah glede na diagnozo.</i> .....	36
<i>Preglednica IX: Korelacija med galektinom-3 in MKG v OP, OA in kontrolni skupini.</i> ....	38

## Povzetek

Osteoblasti, osteoklasti in hondrociti so celice, ki imajo pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju učinkovitosti skeletnega sistema. So tudi ključni igralci pri razvoju in napredovanju številnih bolezni, med drugim osteoporoze in osteoartroze. Galektin-3 se izraža v vseh treh tipih celic, vpleten pa je tudi v osteoblastogenezo in osteoklastogenezo, zato smo želeli ugotoviti, kakšen je pomen določanja galektina-3 v serumu pri osteoporozi in osteoartrozi. Predvsem nas je zanimala uporabnost galektina-3 kot biokemijskega kazalca pri diagnozi osteoporoze in osteoartroze.

Najprej smo optimizirali in validirali imunokemijsko metodo ELISA za določanje galektina-3 v serumu. Določili smo območje linearnosti metode od 0,06 ng/ml do 4,0 ng/ml, za izračun umeritvene krivulje smo izbrali nelinearni regresijski model, pri katerem ocenjujemo štiri parametre. Ocenili smo točnost metode, ki je bila ustrezna, saj je bila pridobitev pri testu pravilnosti s pridobitvijo dodatka 80,9%. S testom linearnosti redčitev smo ugotovili, da lahko vzorce redčimo do 1:10. Natančnost metode je bila dobra, saj je bil koeficient variacije znotraj serije manjši od 4,2%, med serijami pa manjši od 16,6%. V raziskavo smo vključili 131 preiskovancev, 106 žensk in 25 moških. Ugotovili smo, da je koncentracija galektina-3 statistično značilno višja pri ženskah ( $p = 0,026$ ,  $N = 131$ ), medtem ko povezava z indeksom telesne mase ( $p = 0,119$ ,  $N = 126$ ) in starostjo ( $p = 0,990$ ,  $N = 131$ ) ni bila statistično značilna. Nadalje smo ugotovili, da se serumska koncentracija galektina-3 ne razlikuje med preiskovanci z osteoporozo, osteoartrozo ali zdravimi preiskovanci ( $p = 0,277$ ,  $N = 131$ ). Koncentracija galektina-3 tudi ni bila povezana z mineralno kostno gostoto ali koncentracijo 25-hidroksivitamina D niti s serumskimi kazalci kostne premene. Izjema je bila povezava s serumsko koncentracijo proteina dickkopf 1 v celotni skupini preiskovancev ( $p = 0,012$ ,  $N = 47$ ) in v podskupini zdravih preiskovank ( $p = 0,023$ ,  $N = 26$ ), ne pa tudi v podskupini preiskovank z osteoporozo ( $p = 0,222$ ,  $N = 21$ ).

Na podlagi naših rezultatov smo zaključili, da določanje galektina-3 v serumu ni uporabno kot biokemijski kazalec pri diagnozi osteoporoze ali osteoartroze. Statistično značilna povezava med koncentracijo galektina-3 in dickkopf 1 kaže na morebitno vlogo galektina-3 v signalni poti wnt/ $\beta$ -katenin in nakazuje smer, v katero bi se lahko usmerile nadaljnje raziskave.

**Ključne besede:** osteoporoza, osteoartroza, galektin-3, mineralna kostna gostota, biokemijski kazalci kostne premene, metoda ELISA

## Abstract

Osteoblasts, osteoclasts and chondrocytes are cells important in the development and maintenance of homeostasis of skeletal system, as well as in the onset and progression of many different diseases, such as osteoporosis and osteoarthritis. Galectin-3 is expressed in all three types of cells and is also involved in osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. Consequently the aim of our study was first, to set up a method for determination of galectin-3 in serum and second, to assess if serum concentration of galectin-3 could be used as a biochemical marker in osteoporosis and osteoarthritis diagnosis.

First, the immunochemical ELISA method for galectin-3 determination in serum was optimized and validated. The method was shown to be linear from 0.06 ng/mL to 4.0 ng/mL and 4-parameter logistic was shown to be an adequate model for calculation of the standard curve. Accuracy was evaluated with spike and recovery experiment and recovery was shown to be 80.9%. Assessment of linearity of dilution was also performed and the method was shown to be linear until 10-fold dilution. The method was precise with coefficient of variation less than 4.2% within run and less than 16.6% run to run. Second, the concentration of galectin-3 in sera of 131 participants, 106 women and 25 men was determined. Galectin-3 concentration was significantly higher in women ( $p = 0.026$ ,  $N = 131$ ) while association with body mass index ( $p = 0.119$ ,  $N = 126$ ) and age ( $p = 0.990$ ,  $N = 131$ ) was not statistically significant. In addition, we found no difference in serum galectin-3 concentration between participants with osteoporosis, osteoarthritis and healthy controls ( $p = 0.277$ ,  $N = 131$ ). Moreover the concentration did not correlate with bone mineral density, 25-hydroxy-vitamin D concentration or any biochemical marker related to bone turnover. However we did find an association with dickkopf 1 concentration in the group of all participants ( $p = 0.012$ ,  $N = 47$ ) and in the subgroup of healthy participants ( $p = 0.023$ ,  $N = 26$ ), but the association was not significant in the subgroup of osteoporotic participants ( $p = 0.222$ ,  $N = 21$ ).

Based on our results we concluded that serum galectin-3 determination is not useful as a biochemical marker of osteoporosis or osteoarthritis diagnosis. Statistically significant association between galectin-3 concentration and dickkopf-1 concentration points to a possible role of galectin-3 in wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway that could be further evaluated in additional studies.

**Key Words:** *osteoporosis, osteoarthritis, galectin-3, bone mineral density, biochemical markers of bone turnover, ELISA method*

## Seznam kratic

4PL	nelinearni regresijski model, pri katerem ocenjujemo štiri parametre, angl. 4-parameter logistic
ACCF/AHA	American College of Cardiology Foundation/American Heart Association
AGE	končni proizvodi napredovale glikacije, angl. advanced glycation endproducts
ANCOVA	analiza kovariance, angl. analysis of covariance
ANOVA	analiza variance
BSA	goveji serumski albumin, angl. bovine serum albumin
CTX	C-terminalni telopeptid kolagena tipa I
DKK1	dickkopf 1
ELISA	encimskoimunski test na trdnem nosilcu, angl. enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano, angl. Food and Drug Administration
HRP	hrenova peroksidaza
KV	koeficient variacije
MKG	mineralna kostna gostota
OA	osteoartroza
OP	osteoporoza
OPG	osteoprotegerin
PBS	pufer PBS, angl. phosphate buffered saline
PINP	N-terminalni propeptid prokolagena tipa I
PTH	parathormon
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B angl. receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B, angl. receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand
SD	standardna deviacija
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

# 1 Uvod

## 1.1 Osteoporoza in osteoartritoza

Osteoporoza (OP) in osteoartritoza (OA) sta pogosti kostni bolezni, ki se navadno pojavita pri starejših ljudeh in sta obe povezani z znatno morbidnostjo, umrljivostjo in zmanjšano gibljivostjo (1).

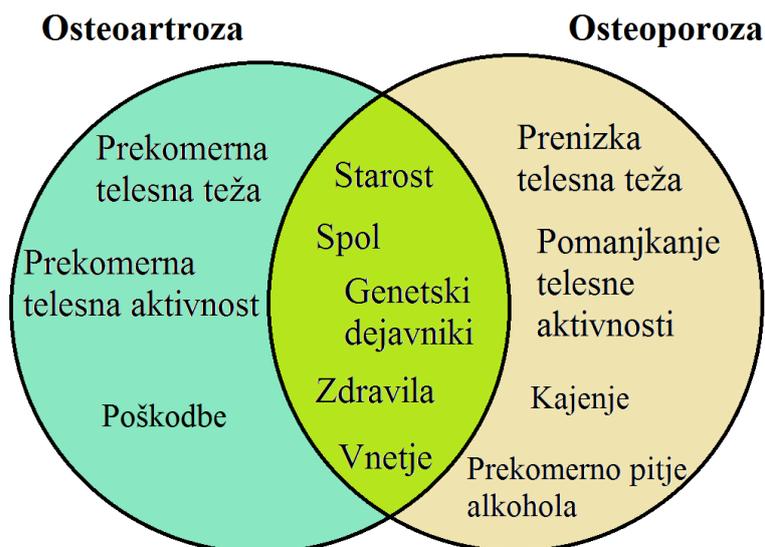
Za OP je značilno pospešeno izgubljanje kostne mase in porušenje kostne mikroarhitekture, kar vodi v povečano lomljivost kosti in večje tveganje za nizkoenergijski zlom. Diagnoza OP je postavljena na podlagi merjenja mineralne kostne gostote (MKG) in sicer na podlagi kriterijev Svetovne zdravstvene organizacije o OP govorimo, ko je MKG glede na aritmetično sredino zdravih mladih odraslih oseb istega spola in rase zmanjšana za 2,5 ali več standardnih deviacij. (2)

OA<sup>1</sup> je degenerativna bolezen sklepov, pri kateri so patološko spremenjene vse strukture sklepa, med njimi hrustanec, subhondralna kostnina (kostnina, ki se nahaja pod hrustancem), sinovijska membrana in vezivno tkivo. Spremljata jo bolečina in motena gibljivost. Značilna patološka sprememba pri OA je izguba sklepnega hrustanca, pomembno vlogo pa imajo tudi spremembe v subhondralni kostnini. Glede etiologije še ni jasno, ali je ključen hrustanec, subhondralna kostnina ali oboje, je pa z napredovanjem bolezni povezana prisotnost sinovitisa (vnetja sinovijske membrane). (5)

OP in OA sta zelo pogosti bolezni, sploh pri starejših, vendar se le redko pojavita skupaj pri istem posamezniku, precej redkeje kot bi pričakovali glede na pogostost obeh bolezni. Obratno sorazmerje v njuni pojavnosti proučujejo že več kot 40 let, vendar še vedno ni v celoti razjasnjeno, kateri dejavniki vplivajo na razvoj bodisi OA bodisi OP (6). Boleznima je skupnih več dejavnikov tveganja, med njimi starost in ženski spol, jemanje nekaterih zdravil, genetski dejavniki, v zadnjem času pa je postalo znano, da je pri obeh pomemben dejavnik tveganja tudi vnetje. Pri obeh igra vlogo tudi neprimerna telesna teža, vendar so k OA nagnjeni ljudje s prekomerno telesno težo, medtem ko k razvoju OP prispeva prenizka telesna teža. Razlike obstajajo tudi pri telesni aktivnosti, ki je zaščitni dejavnik pri OP, vendar dejavnik tveganja pri OA. (1,6) Dejavniki tveganja so prikazani na *sliki 1*.

---

<sup>1</sup> V Slovenskem medicinskem slovarju (3) osteoartritozo ločijo od osteoartritisa in sicer je osteoartritis definiran kot osteoartritoza, pri kateri je prisotno vnetje; ker pa v tuji literaturi ne ločujejo med obema stanjema in besedi razumejo kot sopomenki (4), bomo tudi v tej magistrski nalogi besedo osteoartritoza razumeli kot sopomenko besedi osteoartritis.



Slika 1: Dejavniki tveganja za osteoporozo in osteoartritozo.

OP in OA sta bolezni z visoko prevalenco, povezani sta z zmanjšano gibljivostjo, večjo morbidnostjo in smrtnostjo ter izredno visokimi stroški zdravljenja in tako predstavljata velik zdravstven problem. Zaradi staranja prebivalstva lahko pričakujemo, da se bo njuna incidenca v prihajajočih desetletjih še povečala, zato je poglobljanje znanja o etiologiji obeh bolezni in s tem povezano odkrivanje novih terapevtskih možnosti izrednega pomena.

## 1.2 Galektin-3

### 1.2.1 Splošno

**Lektini** so razred proteinov, ki specifično in reverzibilno vežejo ogljikove hidrate, vendar nimajo katalitične aktivnosti (7). Lektine razdelimo v različne družine, med katerimi je posebej zanimiva družina galektinov. Zanje je značilno, da njeni predstavniki vežejo  $\beta$ -galaktozide in da imajo značilno aminokislinsko zaporedje v domeni za vezavo ogljikovih hidratov (8). Pri sesalcih družina galektinov zajema 15 članov, med njimi je najbolj proučevan **galektin-3**, ki je 32 kDa velik monomeren protein (9,10). Zapis zanj se nahaja v genu *lgals3* na kromosomu 14. Protein tvori dve domeni: karboksiterminalna domena, ki vsebuje mesto za vezavo ogljikovih hidratov, in atipična aminoterminalna domena, ki sodeluje pri tvorjenju multimer galektina-3 in je nujna za popolno biološko aktivnost galektina-3 (9). Galektin-3 se pri odraslih izraža v večini tkiv in celic: črevesju, dojkah, ledvicah, nevronih, testisih, prostati, kosteh in levkocitih. Nahaja se lahko znotraj ali zunajcelično. Znotrajcelično se nahaja v citosolu, mitohondrijih in jedru, zunajcelično pa na celičnih površinah, v zunajceličnem matriksu in v bioloških tekočinah (9,10).

### 1.2.2 Biološka vloga

Galektin-3 ima raznovrstne **biološke vloge**, ki so odvisne od vrste tkiva, lokalizacije, koncentracije, post-translacijskih modifikacij, afinitete do svojih ligandov in/ali razvojne stopnje. Znotrajcelični galektin-3 sodeluje pri izrezovanju mRNA, apoptozi in regulaciji celičnega cikla. Zunajcelični galektin-3 se vpleta v spodbujanje in zaviranje prenosa signalov, celično adhezijo, proliferacijo, migracijo, modulacijo tako prirojene kot pridobljene imunosti, kemotakso, apoptozo in interakcije med patogenom in gostiteljem.(9,10) Zanimivo je, da so si vloge lahko odvisno od lokalizacije tudi nasprotujoče: znotrajcelični galektin-3 ščiti celice T pred apoptozo (11), medtem ko zunajcelični spodbuja celično smrt (12).

Prekomerno izražanje galektina-3 je povezano z mnogimi **rakavimi obolenji**, spremenjena lokalizacija galektina-3 iz jedra v citoplazmo pa je povezana z napredovanjem raka iz adenoma v karcinom (13). Poleg z napredovanjem primarnega tumorja je spremenjeno izražanje in lokalizacija galektina-3 povezano še z metastaziranjem, invazivnostjo ter angiogenezo pri rakih ščitnice, trebušne slinavke, jeter, debelega črevesja, dojke, prostate, glave in vratu ter živčnega sistema (10,13,14).

Pri **vnetju** sodeluje galektin-3 tako pri akutnem kot kroničnem vnetju. Večina *in vivo* podatkov nakazuje, da ima galektin-3 pri akutnem vnetju provnetno, zaščitno vlogo, vpleten pa je v različne procese, med drugim aktivacijo in adhezijo nevtrofilcev, kemotakso monocitov/makrofagov na mesto vnetja, opsonizacijo apoptotičnih nevtrofilcev in aktivacijo nevtrofilcev (15). Vnetni odgovor je načeloma blagodejen proces, saj pripomore k ponovni vzpostavitvi in ohranitvi homeostaze, po drugi strani pa je dolgo trajajoče kronično vnetje s fibrogenozo in brazgotinjenjem organov vključeno v patogenezo mnogih **kroničnih boleznih**. Galektin-3 pri kroničnem vnetju spodbuja brazgotinjenje in se tako vpleta v patogenezo teh boleznih, čeprav nekaj raziskav nakazuje, da ima tudi zaščitno vlogo, odvisno od organa in vrste poškodbe.(15) Študije človeških fibroblastov so pokazale, da je izražanje galektina-3 zvišano pri fibrozi jeter neodvisno od vzroka fibroze (15,16), da je povečano izražanje povezano s fibrogenozo pri kroničnem pankreatitisu (17) in s fibrozo pljuč (18). Nadalje so raziskave z uporabo živalskih modelov pokazale, da je galektin-3 povezan tudi s fibrozo ledvic (19) in miokarda (20).

### **1.2.3 Galektin-3 v krvnem obtoku**

Galektin-3 se nahaja v krvnem obtoku, vendar fiziološka vloga prostega galektina-3 v krvnem obtoku pri zdravih posameznikih še ni znana. Glede na vpletenost galektina-3 v mnoga rakava obolenja in kronične vnetne bolezni pa ni presenetljivo, da je veliko raziskav ocenjevalo povezavo med serumsko/plazemsko koncentracijo tega proteina in različnimi boleznimi.

Najpomembnejša je povezava med koncentracijo galektina-3 v serumu/plazmi in srčnim popuščanjem in sicer je koncentracija pri bolnikih s srčnim popuščanjem povišana. Ima visoko prognostično vrednost in doda povednost k merjenju natriuretičnega peptida, galektin-3 pa je vključen tudi v najnovejše smernice ACCF/AHA (American College of Cardiology Foundation/American Heart Association) iz leta 2013 glede obravnave srčnega popuščanja (20,21). Poleg tega so spremenjeno koncentracijo galektina-3 v serumu/plazmi povezali še s kronično ledvično boleznijo (22), idiopatsko pljučno fibrozo (18), kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi (23), debelostjo in diabetesom tipa 2 (24), Behçetovo boleznijo (25), cirozo jeter (26), revmatoidnim artritisom (27) in juvenilnim idiopatskim artritisom (28).

Serumska/plazemska koncentracija galektina-3 je nadalje povišana pri mnogih rakavih bolnikih, na primer pri bolnikih z rakom prostate (29). Poleg tega pa imajo bolniki z metastazami višje koncentracije galektina-3 v primerjavi z bolniki z lokaliziranimi tumorji, višja koncentracija galektina-3 je tako povezana s slabšo prognozo. (13,30)

### **1.3 Kostni, sklepi in galektin-3**

Galektin-3 se izraža v številnih celicah, med drugim tudi v celicah, ki imajo pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju kosti in sklepov: osteoblastih, osteoklastih in hondrocitih (31). Osteoblasti so enojedrne celice, ki sintetizirajo in izločajo kostno medceličnino in se pri tem diferencirajo v osteocite. Osteoklasti so večjedrne celice, ki razgrajujejo kostnino. Hondrociti pa so celice, ki tvorijo hrustančno medceličnino in nastanejo iz mezenhimskih prekursorjskih celic, enako kot osteoblasti. (5)

Pri proučevanju kostnega tkiva miši so ugotovili, da se galektin-3 nahaja tako znotrajcelično v **osteoklastih** kot tudi zunajcelično na celični membrani osteoklastov in v zunajceličnem matriksu (32). Nadaljnje raziskave so pokazale, da ima zunajcelični galektin-3 pomembno vlogo pri diferenciaciji osteoklastov v procesu osteoklastogeneze. Deluje kot negativni regulator, saj zavira nastajanje osteoklastov iz prekursorjskih celic in

tako zmanjša število osteoklastov, poleg tega zmanjša tako površino kot število resorpcijskih vdolbinic, zavira pa tudi nastanek aktinskega obroča, strukture, ki je močno povezana z aktivnostjo osteoklastov. Ne vpliva pa na adhezijo osteoklastov. Znotrajcelični galektin-3 ne vpliva na osteoklastogenezo (33,34).

Izražanje galektina-3 je povišano med diferenciacijo **osteoblastov** iz prekursorških celic (35), njegovo izražanje je v skeletnih tkivih pod nadzorom transkripcijskega dejavnika *Runx2*, ki je ključen regulator diferenciacije osteoblastov in razvoja hondrocitov (36). Na izražanje galektina-3 v osteoblastih vplivata 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>, ki spodbuja izražanje galektina-3, in glukokortikoid deksametazon, ki zavira izražanje galektina-3 (35). Zunajcelični galektin-3 v osteoblastih iz subhondralne kostnine preiskovancev z OA zavira nastajanje osteokalcina, ki ga kodira za osteoblaste najbolj specifičen in najkasneje izražen gen. Proučevali so tudi vpliv zunajceličnega galektina-3 na izražanje kolagena tipa I, ki je najpogostejši protein osteoida. V odsotnosti vitamina D je galektin-3 znižal izražanje  $\alpha 1$  verige kolagena tipa I v osteoblastih, vendar je v prisotnosti vitamina D izgubil svoj zaviralni učinek, kar nakazuje na večji pomen pri posameznikih s hipovitaminozo D. (37) S proučevanjem osteoblastnih celičnih linij so ugotovili, da se galektin-3 nahaja v jedru in citoplazmi, ter da ga osteoblasti tudi izločajo, saj so ga detektirali v mediju celičnih kultur. Poleg tega so ugotovili, da na izražanje galektina-3 v osteoblastnih celičnih linijah vplivajo končni proizvodi napredovale glikacije (AGE, angl. advanced glycation endproducts), ki zvišajo izražanje galektina-3, medtem ko njegovo koncentracijo v celičnem mediju znižajo. (38,39)

Med razvojem kosti se galektin-3 izraža v **hondrocitih**, še posebej v hipertrofičnih hondrocitih, ki so najbolj diferencirani hondrociti in se pojavijo med procesom zakostenitve. (31) Študija na fetusih miši z izbitim genom za galektin-3 je pokazala, da zbitje gena za galektin-3 vodi v prezgodnjo celično smrt hondrocitov, poleg tega je bil ta proces oddvojen od ostalih procesov, ki potekajo pri nastajanju kosti med endohondralno zakostenitvijo (razgradnja zunajceličnega matriksa, invazija krvnih žil in nastanek lamelarne kostnine). (40) Rezultati tako kažejo na pomembno vlogo galektina-3 pri razvoju kosti in njegovo anti-apoptotično vlogo. S proučevanjem hondrocitov iz človeškega osteoartroznega tkiva pa so pokazali, da ima znotrajcelični galektin-3 anti-apoptotično vlogo tudi pri odraslih (41). Pri hipertrofičnih hondrocitih med razvojem kosti se galektin-3 nahaja zgolj znotrajcelično (31), *Guévremont in sod.* (42) pa so ugotovili, da se pri hondrocitih iz OA tkiva galektin-3 nahaja tudi na celični površini. Lokalizacija na celični

površini pomeni, da lahko pride do vezave z ligandi v zunajceličnem matriksu ali na drugih celicah. Lahko bi se npr. vezal s fibronektinom ali integrinom, adhezijskima molekulama, galektin-3 pa je tudi receptor za AGE, ki se povišajo tako pri staranju kot pri OA (43).

Vezava galektina-3 z ligandi izven celice predstavlja pot, preko katere bi lahko prišlo do presnovnih sprememb hondrocitov, pomembnih za nastanek in napredovanje OA.

Pri raziskovanju vloge zunajceličnega galektina-3 so ugotovili, da le ta kvarno vpliva na strukturo sklepa. Galektin-3 so injicirali podganam v koleno, kar je povzročilo poškodbe, podobne poškodbam pri OA. (37) Podobno so pri primerjavi gensko nespremenjenih miši in miši z izbitim genom za galektin-3 po indukciji adjuvantnega artritisa ugotovili, da je pri miših z izbitim genom za galektin-3 obseg artiritisa manjši, se je pa obseg povečal po dodatku galektina-3 (44). Zunajcelični galektin-3 je pri hondrocitih iz osteoartroznega tkiva spodbudil izražanje encimov ADAMTS-5 in MMP-3, ki sta udeležena pri razgradnji proteoglikanov hrustanca. (37) Zunajcelični galektin-3 torej vpliva na metabolizem hondrocitov in sicer spodbuja katabolne procese, kar predstavlja mehanizem, preko katerega bi se zunajcelični galektin-3 lahko vpletal v OA.

V povezavi z OA so raziskave pokazale, da je izražanje galektina-3 višje v hondrocitih preiskovancev z OA v primerjavi s hondrociti zdravih preiskovancev (42), poleg tega pa so ugotovili, da je koncentracija galektina-3 v plazmi in sinovialni tekočini višja pri preiskovankah z OA v primerjavi z zdravimi preiskovankami (45). Vlogo galektina-3 pri OA potrjuje tudi raziskava glikofenotipa, pri kateri so uporabili galektin-3 označen z biotinom za odkrivanje vezavnih mest za galektin-3 v hrustancu preiskovancev z OA. Galektin-3 se je srednje močno vezal pri rahlo degeneriranem tkivu, medtem ko se je zelo močno vezal pri hudo degeneriranem tkivu (hondroni in interteritorialni matriks). (46)

Iz navedenih raziskav je razvidno, da galektin-3 igra vlogo pri OA, kljub temu bodo dodatne raziskave potrebne za oceno uporabnosti galektina-3 kot biokemijskega kazalca. Na drugi strani pa ni nič znanega o morebitni vlogi galektina-3 pri OP, kar je presenetljivo, saj se galektin-3 vpleta v procese, ki igrajo vlogo v patološkem ozadju OP: v osteoklastogenezo (34), osteoblastogenezo (35), poleg tega je bila pri miših z izbitim genom za galektin-3 kostna premena subhondralne kosti povišana v primerjavi z gensko nespremenjenimi mišmi (41). V raziskavi, v kateri so proučevali polimorfizme v 81 kandidatnih genih za osteoporozo (47) so zajeli tudi gen za galektin-3, *lgals3*. Vendar pa nobena nam znana raziskava še ni proučevala vloge galektina-3 pri OP.

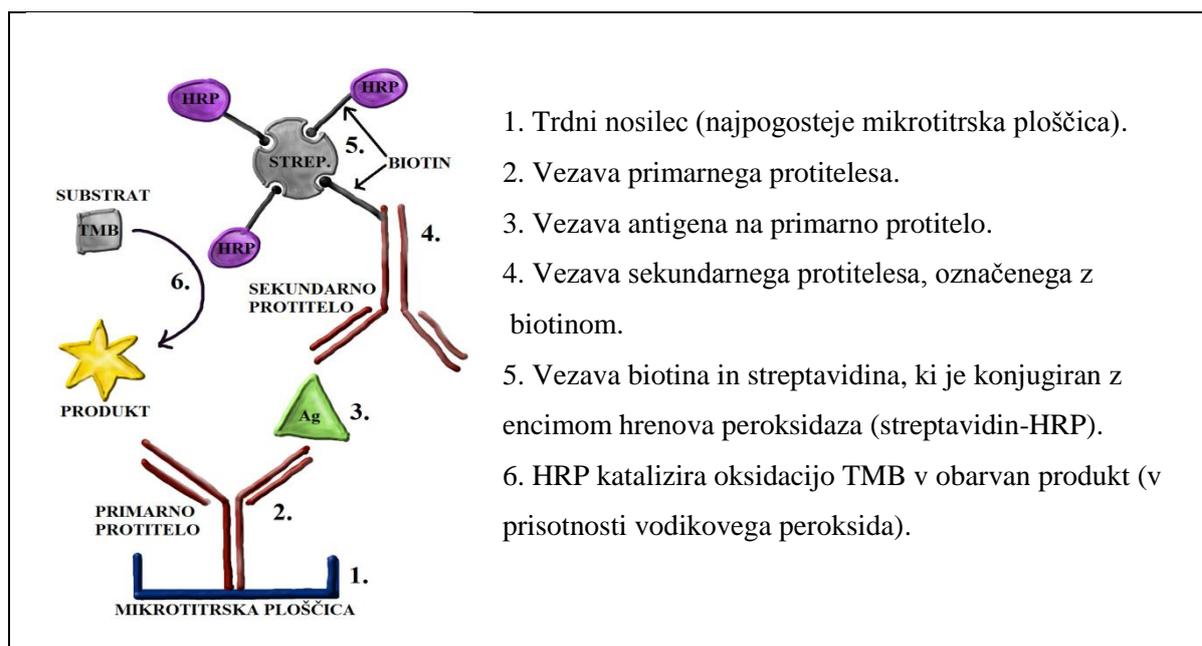
## 1.4 Metode za določanje galektina-3

Za določanje koncentracije galektina-3 v telesnih tekočinah se v klinični praksi uporabljajo imunokemijske metode. Med njimi se najpogosteje uporablja encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA, angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) proizvajalca BG Medicine (Waltham, MA, ZDA). Ker se določanje galektina-3 uporablja pri obravnavi bolnikov s srčnim popuščanjem, so na tržišču tudi avtomatizirani sistemi, ki omogočajo hitrejši analize, temeljijo pa prav tako na imunokemijskem principu. Primeri takih sistemov so ARCHITECT i1000SR, i2000SR in i4000SR proizvajalca Abbott (North Chicago, IL, ZDA). (48) V prihodnosti se bo v kliničnem laboratoriju za določanje galektina-3 lahko uporabljala tudi masna spektroskopija sklopljena s tekočinsko kromatografijo, vendar zaenkrat ostaja najpomembnejša metoda ELISA.

### 1.4.1 Encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA)

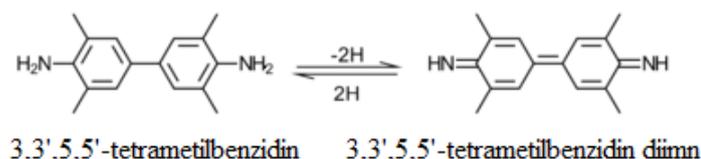
ELISA je občutljiva imunokemijska metoda, pri kateri je eden od reagentov označen z encimom, drugi reagent pa je vezan na trdni nosilec. Gre za heterogeno tehniko, pri kateri s spiranjem ločimo vezano od nevezane frakcije in pri kateri detekcija temelji na spektrofotometrični meritvi končnega obarvanega produkta. Ločimo različne izvedbe metode ELISA, ki se med seboj razlikujejo v vrstnem redu nanašanja reagentov in v vrsti reagenta, vezanega na trdni nosilec (protitelo ali antigen). (49)

V primeru nizke koncentracije antigena ali kompleksnega ozadja vzorca (kot je to v primeru seruma) je smiselna uporaba izvedbe sendvič ELISA. Pri sendvič metodi ELISA uporabimo dve specifični protitelesi: primarno, ki je vezano na trden nosilec in na katerega se veže antigen, ter sekundarno, ki se veže na antigen na drugo vezavno mesto. Pri metodi ELISA je na enega od reagentov vezan encim. Odvisno od tega, na kateri reagent je encim vezan, ločimo različne izvedbe. Ko je z encimom označeno sekundarno protitelo, govorimo o neposredni sendvič metodi ELISA. Ko je z encimom označeno tretje protitelo, ki se veže na neoznačeno sekundarno protitelo, govorimo o posredni sendvič metodi ELISA. Pogosta izvedba pa je s pomočjo interakcije streptavidin-biotin. Pri tem je sekundarno protitelo označeno z biotinom, na katerega se veže streptavidin, ki ima vezan encim. Princip izvedbe sendvič metode ELISA s streptavidin-biotinom je prikazan na *sliki 2*.



Slika 2: Princip sendvič metode ELISA s streptavidin-biotinom.

Encim, s katerim je označen eden od reagentov pri metodi ELISA, v zadnji stopnji pretvori substrat v obarvan produkt. Encim in substrat tvorita detekcijski sistem. Obstajajo številni detekcijski sistemi, med pogostejšimi pa je encim hrenova peroksidaza (HRP) in substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB). HRP katalizira oksidacijo substrata TMB in nastanek modro obarvanega produkta v prisotnosti vodikovega peroksida (slika 3). (49)



Slika 3: Oksidacija substrata TMB, ki jo katalizira encim HRP.

#### 1.4.2 Optimizacija in validacija metode ELISA

Razvoj metode ELISA je zaključen, ko so izbrana ustrezna protitelesa, detekcijski sistem in ko z metodo dobimo signal v odvisnosti od koncentracije preiskovanega analita. Sledita optimizacija in validacija metode. Optimizacija je postopek, pri katerem spreminjamo posamezne parametre tako, da dosežemo zahteve, validacija pa je postopek, pri katerem preverjamo, ali smo res zadostili našim zahtevam.

Parametri, ki jih prilagajamo pri procesu optimizacije (50,51):

1. **Koncentracija protiteles:** S spreminjanjem koncentracije primarnih in sekundarnih protiteles želimo doseči optimalno razmerje med signalom in šumom in čim nižjo vrednost ozadja.
2. **Ozadje:** Absorbanca slepega vzorca naj bi bila manjša od 0,2 enot. Na ozadje poleg koncentracije protiteles vpliva še detekcijski sistem, časi inkubacij, tehnika spiranja, reagent za blokiranje in redčitveni reagent.
3. **Višina krivulje:** Absorbanca umeritvene krivulje je običajno med 1,0 in 3,0 enotami. Na višino krivulje vplivajo koncentracije protiteles, časi in temperature inkubacij, koncentracija detekcijskega sistema, avidnost protiteles za antigene, pH in spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic.
4. **Detekcijski sistem:** Z večanjem koncentracije substrata ali zamenjavo detekcijskega sistema lahko izboljšamo občutljivost, vendar lahko to povzroči višje ozadje.
5. **Redčenje vzorcev seruma ali plazme:** Pri analizi seruma ali plazme je navadno potrebna vsaj 2-kratna redčitev zaradi vpliva ozadja vzorca, redčitev je potrebno določiti empirično. Ozadje vzorca je definirano kot vse sestavine vzorca razen določenega analita (50). Pri redčenju je pomembno, da uporabimo isti redčitveni reagent kot pri pripravi umeritvenih raztopin, poleg tega je nujno, da pri izračunu rezultatov upoštevamo redčitveni faktor.
6. **Temperature inkubacij:** Vzorec in sekundarno protitelo navadno inkubiramo pri sobni temperaturi. Z inkubacijo vzorcev preko noči na 4°C ali eno uro na 37°C lahko izboljšamo občutljivost, vendar lahko to povzroči višje ozadje.
7. **Časi inkubacij:** Z daljšimi časi inkubacij lahko izboljšamo občutljivost, vendar lahko to povzroči višje ozadje.
8. **Volumen umeritvenih raztopin/vzorcev:** Večji volumen lahko izboljša občutljivost.
9. **Uporaba stresalnika:** Uporaba stresalnika pri sobni temperaturi lahko izboljša občutljivost. Lahko se uporabi pri enem ali več korakih inkubacije.
10. **Spiranje:** Zagotoviti je potrebno zadostno spiranje pri vsakem koraku spiranja. Nezadostno spiranje lahko povzroči slabo ponovljivost in visoko ozadje.
11. **Naklon umeritvene krivulje:** Naklon mora biti takšen, da omogoča ločevanje med točkami. Vzroki za položno umeritveno krivuljo so prenizka koncentracija ali prekratek čas inkubacije konjugata streptavidin-encim oz. sekundarno protitelo-encim, nepravilen

izračun, nezadostna vezava primarnega protitelesa, neustrezna koncentracija sekundarnih ali primarnih protiteles in druge nepravilnosti v postopku.

**12. Izračun rezultatov:** Koncentracijo pri vzorcih z neznano koncentracijo določimo s pomočjo umeritvene krivulje. Včasih so se izračuni izvajali ročno, danes pa se uporabljajo različni računalniški programi, ki omogočajo enostaven izračun tako linearne kot nelinearne regresije.

Pomembne lastnosti, s katerimi opisujemo kvaliteto metode (50,52):

### 1. Točnost

Točnost nam pove, kako blizu dejanski vrednosti je povprečna izmerjena vrednost. Merilo razlik med izmerjeno in dejansko vrednostjo je bias, s katerim ocenimo netočnost. Merilo točnosti je torej stopnja netočnosti. Kljub temu da je koncept biasa enostaven, je njegovo določanje včasih izredno težavno, saj za mnoge analite ni referenčnih metod, s katerimi bi lahko določili dejansko (resnično, pravo) vrednost. V takih primerih lahko (ne)točnost najbolje ocenimo s pomočjo testa pravilnosti s pridobitvijo dodatka in testa linearnosti redčitev. (52)

*Test s pridobitvijo dodatka* naredimo tako, da pripravimo več različnih vzorcev v dvojniku. Enemu izmed vzorcev v dvojniku dodamo znano količino analita (vzorec z dodatkom), drugemu pa ne (vzorec brez dodatka). Nato izračunamo izmerjeno povečanje koncentracije in sicer je to razlika med koncentracijo določeno v vzorcu z dodatkom in koncentracijo določeno v vzorcu brez dodatka. Sledi izračun pridobitve (angl. recovery) po sledeči enačbi (52,53):

$$\text{Pridobitev (\%)} = \frac{\text{izmerjeno povečanje koncentracije}}{\text{pričakovano povečanje koncentracije}} \times 100$$

Za povprečno pridobitev (podano kot odstotek) ni potrebno, da je 100%, želena pa je, da je 80% – 120% (53). Test ima še to dobro plat, da z njim poleg točnosti ocenjujemo tudi, ali obstaja vpliv razlike med ozadjem umeritvenih raztopin in ozadjem vzorcev. V primeru, da ta razlika vpliva na določanje koncentracije analita v vzorčni raztopini, na podlagi umeritvene krivulje ne moremo določiti točne koncentracije določenega analita.

Pri *testu linearnosti redčitev* odgovarjamo na vprašanje: Ali bomo pri različnih redčitvah vzorca določili enake vrednosti – in če je odgovor ne, katera vrednost je točnejša? Test lahko izvedemo na dva načina:

- Lahko uporabimo vzorec z dodatkom analita (oziroma vzorec z visoko koncentracijo analita), ki ga nato redčimo.
- Lahko najprej pripravimo serijo redčitev in nato vsaki redčitvi dodamo znano količino analita (54).

Linearnost ocenimo tako, da na graf naneseemo na ordinatno os redčitve, na abscisno os pa izmerjeno koncentracijo analita ter s pomočjo linearne regresije določimo Pearsonov korelacijski koeficient. (55)

Pri obeh testih je najidealneje, če ju lahko izvedemo z vzorci s povišano koncentracijo analita. V primeru, ko takih vzorcev nimamo, pa testa izvedemo z dodajanjem znane količine analita v vzorec (52,53).

## **2. Natančnost**

Metoda je natančna, če daje pri več različnih meritvah istega vzorca enake vrednosti. Pri ocenjevanju natančnosti dejansko ocenjujemo nenatančnost metode, najpogosteje pa jo izrazimo s koeficientom variacije (KV), redkeje s standardnim odklonom (SD). Pri imunokemijskih metodah je nenatančnost lahko posledica različnih virov variacij:

- značilnosti protiteles: koncentracija protiteles, pH in ionska moč reagentov, razlike v vezavi primarnih protiteles na mikrotitrsko ploščico,
- inkubacije: čas in temperatura inkubacij,
- način ločevanja: nujna je ločitev proste in vezane frakcije, pri encimsko-immunskih metodah na trdnem nosilcu je pogost vzrok nenatančnosti nezadostno spiranje med vsakim korakom,
- detekcija: pri encimsko-immunskih metodah gre večinoma za optično zaznavanje obarvanih produktov, viri nenatančnosti so tako vezani na izvor svetlobe, detektor,
- manipulacija reagentov in vzorcev: napake pri pipetiranju, v vrstnem redu dodajanja reagentov, v času dodajanja reagentov ipd.

Pri ocenjevanju natančnosti se je potrebno zavedati, da lahko natančnost ocenjujemo na različnih nivojih, znotraj serije, med serijami, med različnimi serijami reagentov, znotraj metode, znotraj skupine metod ter natančnost med laboratoriji. Ocenjevanje natančnosti znotraj metode, znotraj skupine metod in med laboratoriji se uporablja v sistemih zagotavljanja kakovosti, pri ocenjevanju natančnosti kot lastnosti metode pa je smiselno določanje predvsem natančnosti znotraj serije, med serijami in med različnimi serijami reagentov.

Pri ocenjevanju natančnosti je pomembno tudi dejstvo, da natančnost pogosto ni enaka v celotnem meritvenem območju metode, saj večinoma variira v odvisnosti od koncentracije. Natančnost vedno določamo pri nekih diskretnih vrednostih koncentracij in je ni možno določiti pri čisto vseh koncentracijah. Ključnega pomena pa je, da je natančnost ustrezna v klinično pomembnih območjih, na primer na mejah referenčnega intervala. (52)

### 3. Analizno območje in meja kvantifikacije

*Analizno območje* je območje koncentracij oziroma druge količine proučevanega analita, v katerem sta tako natančnost kot točnost znotraj dopustnih mej odstopanja. Zgornjo mejo najpogosteje določa meja linearnosti metode, medtem ko spodnjo mejo določa meja kvantifikacije. *Meja kvantifikacije* je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko zanesljivo določimo s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo. (50)

### 4. Analitska občutljivost in meja detekcije

*Analitska občutljivost* je lastnost metode, da loči med majhnimi razlikami v koncentraciji oziroma drugi količini analita. Odvisna je od naklona umeritvene krivulje (bolj strm naklon omogoča boljšo analitsko občutljivost), pomembno pa vpliva tudi natančnost metode. Analitsko občutljivost je potrebno ločiti od meje detekcije. *Meja detekcije* je najnižja koncentracija oziroma druga količina analita v vzorcu, ki jo lahko detektiramo, vendar je ne moremo kvantificirati. V praksi jo najpogosteje določimo tako, da izračunani povprečni vrednosti zaporednih meritev slepega vzorca prištejemo dve ali tri standardne deviacije (SD). (50)

### 5. Analitična specifičnost, interference in navzkrižna reaktivnost

Analitična specifičnost je sposobnost metode, da loči preiskovani analit od potencialno interferirajočih snovi in drugih dejavnikov v vzorcu. Pri imunokemijskih metodah vplive na analitično specifičnost razdelimo na prisotnost navzkrižne reaktivnosti in prisotnost interferenc (50,52).

O *navzkrižni reaktivnosti* govorimo, ko protitelesa reagirajo še z drugimi snovmi v vzorcu, ki niso analit. Lahko je pozitivna ali negativna. Pozitivna navzkrižna reaktivnost je posledica vezave interferirajoče snovi na primarno in sekundarno protitelo, izmerimo lažno večje vrednosti. Pri negativni navzkrižni reaktivnosti pa izmerimo lažno nižje vrednosti in

je posledica vezave interferirajoče snovi bodisi na primarno bodisi na sekundarno protitelo, vendar ne na obe hkrati. (52)

O *interferencah* govorimo takrat, ko nek dejavnik povzroči nastanek biasa in ni snov, ki povzroča navzkrižno reaktivnost. Obstajajo številni mehanizmi, preko katerih lahko nek dejavnik interferirajoče vpliva na metodo:

- vpliv na efektivno koncentracijo analita: interferenca lahko povzroči spremembo konformacije antigena ali sprostitvev analita s proteinov, na katere je fiziološko vezan,
- interferenca z vezavo protiteles: pogost vir interferenc pri imunokemijskih metodah so heterofilna protitelesa, ali pa sprememba v konformaciji vezavnega mesta protitelesa (pH, ionska moč), prisotnost avtoprotiteles,
- interferenca pri vezavi primarnega protitelesa na trdni nosilec,
- interferenca z detekcijskim sistemom: prisotnost snovi, ki ustvarijo endogeni signal, encimski inhibitorji. (52)

## **2 Namen dela**

Osteoblasti, osteoklasti in hondrociti so celice, ki imajo pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju učinkovitosti skeletnega sistema. So tudi ključni igralci pri razvoju in napredovanju številnih bolezni, med drugim tudi OP in OA. Galektin-3 se izraža tako v osteoklastih, osteoblastih kot hondrocitih (31), njegovo izražanje je povišano med osteoblastogenezo (35), zunajcelični galektin-3 zavira osteoklastogenezo (34) in škodljivo vpliva na strukture sklepov, saj poviša katabolne procese hondrocitov (37), znotrajcelični galektin-3 v hondrocitih pa ima anti-apoptotične učinke (41). Pri OA je izražanje galektina-3 v hondrocitih povišano (42), poleg tega je tudi koncentracija galektina-3 v plazmi in sinovialni tekočini višja (45), kar kaže na pomembno vlogo galektina-3 pri OA. Nobena nam znana raziskava pa ni proučevala vloge galektina-3 pri OP, kljub njegovi vpletenosti v procese pomembne v patogenezi OP.

V sklopu magistrskega dela bomo tako poskušali opredeliti, kakšen je pomen določanja serumske koncentracije galektina-3 in sicer ali je serumska koncentracija galektina-3 pri OP in OA spremenjena in ali obstajajo povezave z različnimi kazalci obeh bolezni.

Namen našega dela je:

1. Optimizirati metodo ELISA za določitev galektina-3 v serumu.
2. Oceniti razlike v serumski koncentraciji galektina-3 med preiskovanci z OA, OP in zdravimi preiskovanci.
3. Preveriti, ali obstaja korelacija med serumsko koncentracijo galektina-3 in MKG.
4. Preveriti, ali obstaja korelacija med serumsko koncentracijo galektina-3 in koncentracijo 25-hidroksivitamina D.
5. Podrobneje opredeliti morebitno vlogo pri OP z oceno povezave med serumsko koncentracijo galektina-3 in koncentracijo kazalcev pomembnih pri OP: C-terminalni telopeptid kolagena tipa I (CTX), dickkopf 1 (DKK1), ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (RANKL), osteoprotegerin (OPG) in parathormon (PTH).

## **3 Materiali in metode**

### **3.1 Materiali**

#### **3.1.1 Kemikalije in reagenti**

- goveji serumski albumin (BSA), A3294-100G, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
- goveji serumski albumin (BSA), sc-2323, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ZDA
- komplet za razvoj metode ELISA za določanje človeškega galektina-3, ki vsebuje primarna protitelesa, sekundarna protitelesa, rekombinantni človeški galektin-3 za pripravo umeritvene krivulje in konjugat streptavidin-HRP; human Galectin-3 DuoSet ELISA Development System, DY1154, R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA
- pufer PBS, Calbiochem®, 524650-1EA, Merck Millipore, Billerica, MA, ZDA
- pufer PBS, P-3813, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
- substrat (stabiliziran vodikov peroksid in stabiliziran 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), DY999, R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA
- Tween 20, P1379-500ML, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
- Tween 20, P5927-100ML, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
- žveplova (VI) kislina (95%, pure p.a.)
- voda (ultra čista)

#### **3.1.2 Pufri in raztopine**

- Pufer PBS:  
PBS pripravimo po navodilih proizvajalca in sicer vsebino paketka oz. tableto raztopimo v 1 l destilirane vode.
- Pufer za spiranje (0,05% Tween 20 v PBS):  
Za pripravo 500 ml pufra za spiranje pipetiramo 250 µl Tween 20 in dopolnimo s PBS do 500 ml.

- Blokirni/redčitveni pufer (1% BSA v PBS):  
Za pripravo 500 ml natehemo 5 g BSA, ga raztopimo v 250 ml PBS in dopolnimo s PBS do 500 ml. Nato filtriramo z membranskimi filtri s porami 0,2 µm.
- Ustavitveni reagent (1 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):  
Za pripravo 100 ml v 50 ml destilirane vode postopoma dodamo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in nato dopolnimo do 100 ml z destilirano vodo.
- Delovna raztopina primarnih protiteles:  
Založno raztopino primarnih protiteles s koncentracijo 360 µg/ml redčimo do delovne koncentracije s PBS.
- Delovna raztopina sekundarnih protiteles:  
Založno raztopino sekundarnih protiteles s koncentracijo 18 µg/ml redčimo do delovne koncentracije z redčitvenim pufrom (1% BSA v PBS).
- Umeritvene raztopine za umeritveno krivuljo:  
Založno umeritveno raztopino z rekombinantnim človeškim galektinom-3 s koncentracijo 170 ng/ml redčimo do delovne koncentracije z redčitvenim pufrom (1% BSA v PBS).
- Delovna raztopina konjugata streptavidin-HRP:  
založno raztopino redčimo 1:200 z redčitvenim pufrom (1% BSA v PBS), za pripravo 10 ml delovne raztopine torej potrebujemo 50 µl založne raztopine in 9950 µl redčitvenega pufru (1% BSA v PBS).
- Raztopina substrata:  
V enakih volumnih zmešamo reagent A (vodikov peroksid) in reagent B (tetrametilbenzidin) ter raztopino uporabimo v roku 15 minut.

Opomba: Vsi pufrji in raztopine morajo biti pred uporabo segreti na sobno temperaturo.

### **3.1.3 Laboratorijska oprema**

- analitska tehtnica AB54-S, Mettler-Toledo, Greifensee, Švica
- brizge, Terumo, Somerset, NJ, ZDA
- centrifuga 5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- čitalec mikrotitrskih ploščic Wallac 1420 VICTOR<sup>2</sup>, ParkinElmer, Waltham, MA, ZDA

- magnetno mešalo IKAMAG RH S1, Jankel & Kunkel, IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Nemčija
- membranski filtri za filtracijo s porami 0,2 µm, Schleicher & Schuell BioScience, Dassel, Nemčija
- membranski filtri za filtracijo s porami 0,45 µm, Sartorius AG, Goettingen, Nemčija
- mikrotitrne plošče Immulon®, 2 HB, 3455, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA
- mikrotitrne plošče PolySorp®, F96, 475094, Nalge Nunc International, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA
- namizni stresalnik PSU-2T, Biosan, Riga, Latvija
- osemkanalna pipeta 20 – 200 µl, Costar, Tewksbury, MA, ZDA
- parafilm, falkonke, aluminijasta folija, epice, nastavki za pipete, nitrilne rokavice
- pipete 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl in 100 – 1000 µl, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- sistem za pridobivanje ultra čiste vode

### **3.1.4 Biološki vzorci**

Pri optimizaciji metode ELISA za določanje galektina-3 smo uporabljali biološke vzorce, serume. Uporabljeni biološki vzorci so bili ostanki vzorcev, ki so bili odvzeti bodisi v sklopu sistematskega pregleda, bodisi za diagnostiko v urgentnem laboratoriju. Serumi, odvzeti za sistematski pregled, so bili serumi zdravih preiskovancev, medtem ko so bili serumi iz urgentnega laboratorija serumi preiskovancev z različnimi boleznimi: imeli smo podatke o starosti in spolu. Vsi uporabljeni serumi so bili popolnoma anonimizirani in namenjeni uničenju.

Poleg posameznih serumov smo pri optimizaciji metode uporabljali tudi zbirni vzorec serumov zdravih preiskovancev, ki smo ga pripravili tako, da smo naključno izbranih 38 ostankov serumov zdravih preiskovancev združili, dobro premešali in alikvotirali. Tako smo dobili zbirni vzorec z nizko koncentracijo galektina-3. Nato smo delu zbirnega vzorca dodali rekombinantni človeški galektin-3 in tako dobili zbirni vzorec z visoko koncentracijo galektina-3.

### **3.2 Preiskovanci, merjenje MKG in biokemijskih kazalcev**

V raziskavo smo vključili 131 slovenskih **preiskovancev**, 106 žensk in 25 moških. 42 preiskovancev je bilo s klinično diagnozo osteoartrize (OA), ki je bila postavljena na podlagi zamenjave kolka zaradi obrabe hrustanca na Oddelku za travmatologijo Splošne bolnišnice Celje (N = 26) ali v Ortopedski bolnišnici Valdoltra (N = 16). 48 preiskovancev je bilo s klinično diagnozo osteoporoze (OP), postavljeno na podlagi nizkoenergijskega zloma kolka na Oddelku za travmatologijo Splošne bolnišnice Celje (N = 22) oziroma na podlagi merjenja MKG in kliničnega pregleda na Kliniki za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (N = 26). Poleg osteoartriznih in osteoporoznih preiskovancev smo v kontrolno skupino vključili še 41 zdravih preiskovancev iz Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, ki niso imeli ne osteoartrize ne osteoporoze. Preiskovancem so odvzeli kri (za določitev koncentracij biokemijskih kazalcev) in pridobili antropometrične podatke. Vsi vključeni preiskovanci so bili brez znanih sistemskih in drugih presnovnih bolezni, ki vplivajo na kosti in presnovo mineralov. Študija je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko.

**MKG** so preiskovancem izmerili na področju celotnega kolka, vratu stegenice in ledvenega dela hrbtenice med drugim in četrtem vretencem (L2-L4) z metodo dvoenergijske rentgenske absorpciometrije (DXA) z inštrumentom QDR-4500 (Hologic, Inc., Waltham, MA, USA). Meritve so opravili na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana ali v Splošni bolnišnici Celje.

**Meritve koncentracije biokemijskih kazalcev** so opravili na Kliniki za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in v Splošni bolnišnici Celje. Izmerili so koncentracije 25-hidroksivitamina D, C-terminalnega telopeptida prokolagena tipa I (CTX), DKK1 (dickkopf 1) in intaktnega parathormona (PTH). Vsem preiskovancem smo na Zavodu za biokemijo in molekularno biologijo na Farmaceutsko-biokemijski fakulteti Univerze v Zagrebu izmerili koncentracijo galektina-3 v serumu po postopku, ki je opisan v nadaljevanju.

### 3.3 Določanje koncentracije galektina-3 v serumu z metodo ELISA

Osnovo za razvoj metode ELISA je predstavljal reagenčni komplet human Galectin-3 DuoSet ELISA Development System proizvajalca R&D, ki je vseboval osnovne sestavine za razvoj sendvič metode ELISA:

- primarna mišja protitelesa usmerjena proti človeškemu galektinu-3,
- sekundarna biotinizirana kozja protitelesa usmerjena proti človeškemu galektinu-3,
- konjugat streptavidin-HRP in
- človeški rekombinantni galektin-3.

Princip metode je že bil podrobneje opisan v poglavju *1.4 Metode za določanje galektina-3*. Komplet je zasnovan za analizo celičnih supernatantov, zato je bilo potrebno za določanje galektina-3 v serumu metodo optimizirati in validirati.

#### 3.3.1 Priprava umeritvenih raztopin, slepega vzorca in vzorcev

Za umeritveno krivuljo pripravimo sedem **umeritvenih raztopin**. Najprej pripravimo 600 µl umeritvene raztopine S1 s koncentracijo 4000 pg/ml. Nato označimo epice z oznakami od S2 do S7 in vanje odpipetiramo 300 µl redčitvenega pufru. Sledi 2-kratno serijsko redčenje, ki ga izvedemo tako, da iz umeritvene raztopine S1 prenesemo 300 µl v S2 in premešamo. Iz S2 prenesemo 300 µl v S3 in premešamo in tako naprej do S7.

**Slepi vzorec** pripravimo tako, da uporabimo le redčitveni pufer.

**Vzorci** redčimo v razmerju 1:10 v redčitvenem pufru. Za analizo vzorca v duplikatu pripravimo 250 µl razredčenega vzorca in sicer v 225 µl redčitvenega pufru odpipetiramo 25 µl seruma.

#### 3.3.2 Postopek dela

V nadaljevanju je opisan postopek dela, ki je bil optimiziran, kot je opisano v poglavju *4.1 Optimizacija metode ELISA za določanje galektina-3 v serumu*.

1. Vezava primarnih protiteles: Na mikrotitrsko ploščico PolySorp® proizvajalca Nalge Nunc International nanesimo v vsako vdolbinico 100 µl delovne raztopine primarnih protiteles s koncentracijo 2,0 µg/ml. Zatesnimo s parafilmom in inkubiramo preko noči (20 ur) na 4°C ob blagem stresanju.

2. Korak spiranja: Vdolbinice najprej izpraznimo in nato napolnimo vsako vdolbinico s 400 µl pufru za spiranje, damo na stresalnik za nekaj sekund in ponovno izpraznimo

vdolbinice. Postopek ponovimo še dvakrat, vsako vdolbinico torej speremo trikrat. Na koncu ploščico z vdolbinicami navzdol pritisnemo ob čisto papirnato brisačo in s pipeto odstranimo morebitne ostanke pufra za spiranje v vdolbinicah.

3. Blokiranje: V vsako vdolbinico dodamo 300  $\mu$ l blokirnega pufra. Zatesnimo s parafilmom in inkubiramo 1 uro na sobni temperaturi ob blagem stresanju.

4. Ponovimo korak spiranja.

5. Nanos umeritvenih raztopin/slepega vzorca/vzorcev: V vsako vdolbinico nanesimo 100  $\mu$ l umeritvene raztopine/slepega vzorca/vzorca. Pred izvedbo poskusa si pripravimo načrt nanosa na mikrotitrsko ploščico. Vse umeritvene raztopine, slepi vzorec, vzorce, analiziramo v duplikatu. Pokrijemo s parafilmom in inkubiramo 2 uri na sobni temperaturi ob blagem stresanju.

6. Ponovimo korak spiranja.

7. Nanos sekundarnih protiteles: Nanesemo 100  $\mu$ l delovne raztopine biotiniziranih sekundarnih protiteles s koncentracijo 4 ng/ml v vsako vdolbinico. Pokrijemo s parafilmom in inkubiramo 2 uri na sobni temperaturi ob blagem stresanju.

8. Ponovimo korak spiranja.

9. Dodatek konjugata streptavidin-HRP: Dodamo 100  $\mu$ l delovne raztopine konjugata streptavidin-HRP. Zatesnimo s parafilmom in zavijemo v aluminijevo folijo, da zaščitimo pred svetlobo. Zaščiteno pred svetlobo inkubiramo 20 minut na sobni temperaturi ob blagem stresanju.

10. Ponovimo korak spiranja.

11. Dodatek substrata: Dodamo 100  $\mu$ l raztopine substrata. Pazljivi moramo biti, da od priprave raztopine do nanosa mine največ 15 minut. Zatisnemo s parafilmom, zavijemo v aluminijevo folijo in inkubiramo zaščiteno pred svetlobo 20 minut pri sobni temperaturi ob blagem stresanju.

12. Dodatek ustavitvenega reagenta: V vsako vdolbinico dodamo 50  $\mu$ l ustavitvenega reagenta. Nežno potresemo ploščico, da zagotovimo zadostno mešanje reagentov.

13. Merjenje absorbance: S čitalcem mikrotitrskih ploščic izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 450 nm in nato pri valovni dolžini 540 nm. Vrednosti, izmerjene pri valovni dolžini 540 nm, odštejemo od vrednosti, izmerjenih pri valovni dolžini 450 nm in tako izvedemo korekcijo zaradi morebitnega vpliva nepravilnosti v ploščici. Če bi čitalec mikrotitrskih ploščic to omogočal, bi lahko nastavili tudi avtomatično izvedbo korekcije. V naslednjem poglavju *Izračun rezultatov* je pod pojmom izmerjena absorbanca vedno mišljena izmerjena absorbanca s korekcijo.

### 3.3.3 Izračun rezultatov

Določanje koncentracije galektina-3 temelji na merjenju absorbance in večtočkovni umeritveni krivulji. Določitev koncentracije temelji na primerjavi absorbance vzorcev z absorbanco umeritvenih raztopin z znano koncentracijo galektina-3, saj je izmerjena absorbanca sorazmerna s koncentracijo galektina-3. Rezultate izračunamo po naslednjem postopku:

- Najprej preverimo, ali je absorbanca slepega vzorca nižja od absorbance umeritvene raztopine z najnižjo koncentracijo galektina-3. Če ni, je potrebno celoten poskus ponoviti.
- Odštejemo absorbanco slepega vzorca od posameznih absorbanc umeritvenih raztopin in vzorcev.
- Preverimo, ali je KV med absorbancami obeh meritev umeritvenih raztopin manjše od 20%. Če je pri kateri od umeritvenih raztopin KV med duplikatoma večji od 20%, je potrebno celoten poskus ponoviti.
- Izračunamo umeritveno krivuljo s programom GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla California USA) z uporabo nelinearnega regresijskega modela, pri katerem ocenjujemo štiri parametre (4PL).
- S pomočjo krivulje določimo koncentracijo galektina-3 v vzorcih za vsako meritev posebej z uporabo absorbanc z odšteto absorbanco slepega vzorca. Koncentracije množimo z redčitvenim faktorjem, v primeru redčitve 1:10 je redčitveni faktor 10.
- Izračunamo povprečno vrednost, SD in KV za vsak duplikat vzorcev.
- KV med duplikati mora biti manjši od 20%. Če je večji, je potrebno meritev za dotični vzorec ponoviti.
- Povprečna vrednost galektina-3 je koncentracija galektina-3 v vzorcu.

### 3.4 Statistične metode

Najprej smo izračunali deskriptivno statistiko. Normalnost porazdelitve smo preverjali s Shapiro-Wilkovim testom. Nadaljnjo statistično analizo smo razdelili v več sklopov:

1. Ocenjevanje povezanosti koncentracije galektina-3 z antropometričnimi lastnostmi (starostjo, višino, težo in spolom).
2. Ocenjevanje povezanosti koncentracije galektina-3 z OP in OA.
3. Ocenjevanje korelacije med koncentracijo galektina-3 in MKG oziroma koncentracijo biokemijskih kazalcev.

Pri ocenjevanju povezanosti koncentracije galektina-3 z **antropometričnimi lastnostmi** smo preiskovance glede na koncentracijo galektina-3 razdelili v kvintile. Nato smo ugotavljali, ali obstaja razlika med kvintili v frekvencah posameznega spola s  $\chi^2$ -testom ter v starosti, ITM, višini in teži s testom ANOVA.

Za ugotavljanje povezanosti koncentracije galektina-3 z **OP in OA** smo najprej preverili homogenost varianc z Levenovim testom in normalnost porazdelitve znotraj posameznih skupin s Shapiro-Wilkovim testom. Pri spremenljivkah, ki se niso normalno porazdeljevale, smo izvedli ustrezno transformacijo. Preverili smo, ali obstajajo razlike med skupinami OP, OA in zdravih preiskovancev v ITM (ANOVA), starosti (ANOVA) in spolu (Fisherjev eksaktni test). Ker so bile prisotne statistično značilne razlike, nismo zadostili kriterijem za uporabo analize kovariance (ANCOVA). ITM, starosti in spola nismo mogli upoštevati kot dodatno neodvisno spremenljivko (kovariato), zato smo za ugotavljanje povezanosti koncentracije galektina-3 z OP in OA uporabili metodo ANOVA. Podrobnejša utemeljitev se nahaja v *Rezultatih in razpravi* v podpoglavju 4.4 *Povezanost z osteoporozo in osteoartrizo*.

Korelacijo med koncentracijo galektina-3 in **MKG** oziroma **koncentracijo biokemijskih kazalcev** smo ocenjevali s Spearmanovim rho ( $\rho$ ), ko je porazdelitev odstopala od normalne, ali Pearsonovim korelacijskim koeficientov ( $r$ ), ko je bila porazdelitev normalna. Kjer je tako navedeno smo analizo naredili ločeno za posamezne podskupine OP, OA ali zdravih preiskovancev.

Za statistično analizo podatkov smo uporabili program SPSS različica 20.0 (IBM Statistical Package for the Social Sciences). Statistično značilnost smo določili pri  $p < 0,05$ .

## 4 Rezultati in razprava

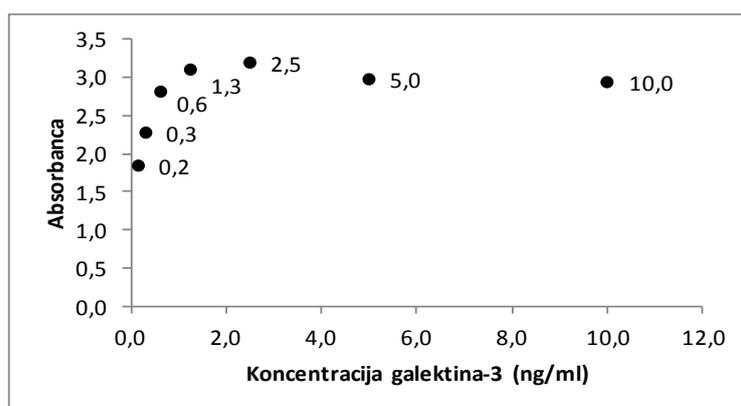
To poglavje smo tematsko razdelili v dva sklopa. Prvi sklop zajema optimizacijo postopka za določanje koncentracije galektina-3 in določanje koncentracije galektina-3 v vzorcih preiskovancev. Drugi sklop se osredotoča na pomen določanja galektina-3 in povezavo galektina-3 z OP in OA.

### A. Določanje koncentracije galektina-3 v serumu

#### 4.1 Optimizacija metode ELISA za določanje galektina-3 v serumu

##### 4.1.1 Preverjanje reagentov

Pri metodi ELISA imamo več zaporednih korakov: vezava primarnega protitelesa, vezava galektina-3 na primarno protitelo, vezava sekundarnega protitelesa, vezava konjugata streptavidin-HRP in nazadnje še pretvorba substrata v obarvan produkt. Na katerikoli stopnji lahko pride do napake, posledično ne nastane obarvan produkt in ne moremo določiti koncentracije galektina-3. Zato smo želeli najprej preveriti, ali v zadnjem koraku dobimo obarvan produkt. Poleg tega nas je zanimalo, ali je intenziteta sorazmerna s koncentracijo galektina-3. V primeru, da bi bil signal enako intenziven pri vseh umeritvenih raztopinah z različno koncentracijo galektina-3, bi bil najverjetnejši vzrok nastanka signala nespecifična vezava katerega od reagentov. Želeli smo torej preveriti, ali nastane obarvan produkt in ali je nastanek obarvanega produkta posledica vezave galektina-3. Poskus smo izvedli po postopku, priporočenem s strani proizvajalca (56), z razponom umeritvenih raztopin rekombinantnega človeškega galektina-3 od 0,156 ng/ml do 10 ng/ml. Rezultati, ki prikazujejo izmerjeno absorbanco v odvisnosti od koncentracije, so prikazani na *grafu 1*.

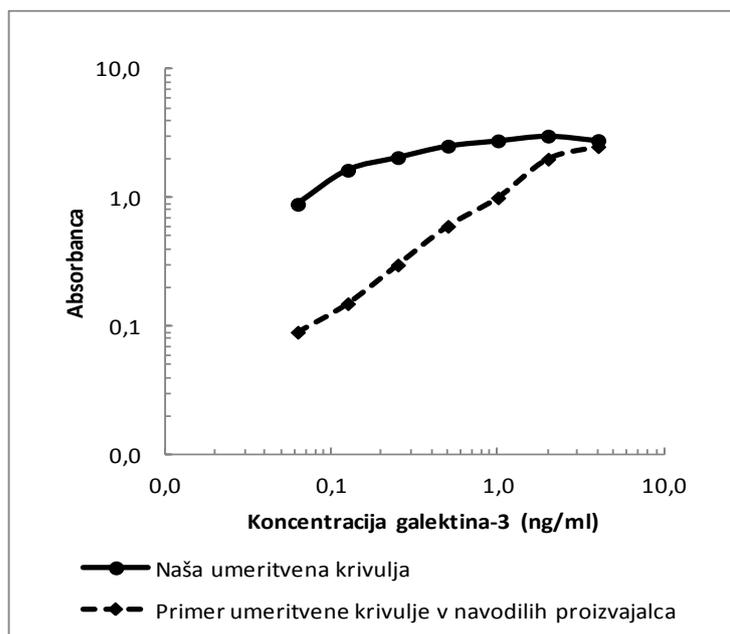


Graf 1: Rezultati poskusa preverjanja reagentov.

Pri poskusu smo v zadnjem koraku dobili obarvan produkt, kar je pomenilo, da reagenti pravilno delujejo. Poleg tega je absorbanca naraščala z naraščanjem koncentracije galektina-3, iz česar smo sklepali, da je signal posledica vezave galektina-3. Iz obeh ugotovitev smo zaključili, da so naši reagenti ustrezni. Poleg tega smo ugotovili, da signal narašča do koncentracije 2,5 ng/ml, ko doseže absorbanco 3,2 in plato. To je pomenilo, da bi bilo potrebno določiti merilno območje metode oziroma območje linearnosti.

#### 4.1.2 Določanje območja linearnosti metode

Pri poskusu preverjanja reagentov smo ugotovili, da pri koncentraciji umeritvene raztopine 2,5 ng/ml naraščanje absorbance doseže plato. V območju platoja koncentracija ni več sorazmerna s signalom, saj signal ne narašča več ne glede na višanje koncentracije galektina-3. Za umeritveno krivuljo želimo take koncentracije umeritvenih raztopin, pri katerih je večanje koncentracije sorazmerno z večanjem signala, saj nam to omogoča kvantifikacijo. Temu območju pravimo območje linearnosti metode. V skladu s priporočili proizvajalca (56) smo analizirali 7 umeritvenih raztopin s koncentracijami galektina-3 v razponu 0,06 ng/ml – 4,0 ng/ml. Rezultati so prikazani na *grafu 2*.



*Graf 2: Razpon koncentracij umeritvenih raztopin 0,06 ng/ml – 4,0 ng/ml in primerjava s primerom krivulje iz navodil proizvajalca.*

Ugotovili smo, da je pri izbranem razponu umeritvenih raztopin absorbanca lepo naraščala. Večanje koncentracije galektina-3 je bilo sorazmerno z višanjem absorbance, zato smo zaključili, da je območje linearnosti naše metode od 0,06 ng/ml do 4,0 ng/ml.

Nato smo primerjali našo umeritveno krivuljo s primerom umeritvene krivulje v navodilih proizvajalca. Naša umeritvena krivulja je imela mnogo manjši naklon v primerjavi s primerom umeritvene krivulje v navodilih proizvajalca (*graf 2*), zato smo se odločili, da bo potrebna optimizacija naklona umeritvene krivulje.

### **4.1.3 Optimizacija analitske občutljivosti**

Pri prejšnjem poskusu smo ugotovili, da ima naša umeritvena krivulja manjši naklon v primerjavi s primerom umeritvene krivulje v navodilih proizvajalca. Manjši naklon pomeni manjšo analitsko občutljivost, torej slabše razlikovanje med različnimi koncentracijami, saj že majhna razlika v izmerjenem signalu pomeni veliko razliko v določeni koncentraciji. To bi lahko vodilo v slabo točnost in natančnost metode, zato smo želeli doseči, da bi bil naklon naše umeritvene krivulje večji.

Možni vzroki položne umeritvene krivulje so (51):

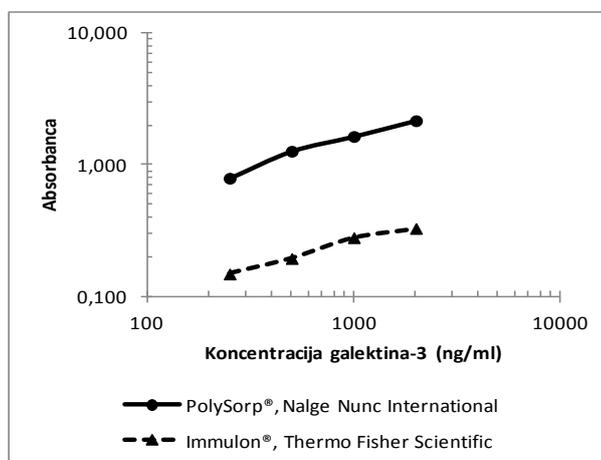
1. prenizka koncentracija konjugata streptavidin-HRP ali prekratek čas inkubacije,
2. nepravilen izračun,
3. nezadostna vezava primarnega protitelesa, vzrok je lahko neustrezna mikrotitrna ploščica,
4. neustrezna koncentracija sekundarnih in/ali primarnih protiteles,
5. druge nepravilnosti v postopku.

Koncentracija konjugata streptavidin-HRP in časi inkubacij so bili v skladu s priporočili proizvajalca (56), poleg tega niso odstopali od splošnih priporočil za izvedbo metode ELISA, zato smo sklepali, da to najverjetneje ni vzrok položne umeritvene krivulje. Preverili smo tudi vse izračune in pri tem nismo odkrili napak. Vzrok bi lahko bil v neustrezni vezavi primarnega protitelesa, zato smo se odločili, da bomo najprej preverili ustreznost mikrotitrne ploščice ter nato še različne koncentracije protiteles.

#### *4.1.3.1 Določanje ustreznosti mikrotitrne ploščice*

Izbrali smo dve različni mikrotitrski ploščici: Immulon<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific in PolySorp<sup>®</sup>, Nalge Nunc International. Obe vrsti ploščic sta primerni za metodo ELISA, vendar je možno, da bi se na katero izmed ploščic primarna protitelesa bolje ali slabše vezala, kar bi vplivalo na naklon krivulje. Na obe ploščici smo nanесли štiri različne koncentracije umeritvenih raztopin v razponu 0,25 – 2,0 ng/ml. Ugotovili smo, da je

naklon boljši pri ploščici PolySorp<sup>®</sup>, Nalge Nunc International kot pri Immulon<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific. Poleg tega je bilo pri ploščici Immulon<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific slabše razmerje med izmerjeno absorbanco umeritvenih raztopin in absorbanco slepe (graf 3).



Graf 3: Primerjava dveh različnih mikrotitrskih ploščic.

Zaključili smo, da je mikrotitrsko ploščico PolySorp<sup>®</sup>, Nalge Nunc International ustrežnejša, ker pa smo te ploščice uporabljali tudi pri vseh prejšnjih poskusih, vzrok položne krivulje najverjetneje ni bil v neustrezni mikrotitrski ploščici.

#### 4.1.3.2 Ugotavljanje ustreznosti koncentracije primarnih in sekundarnih protiteles

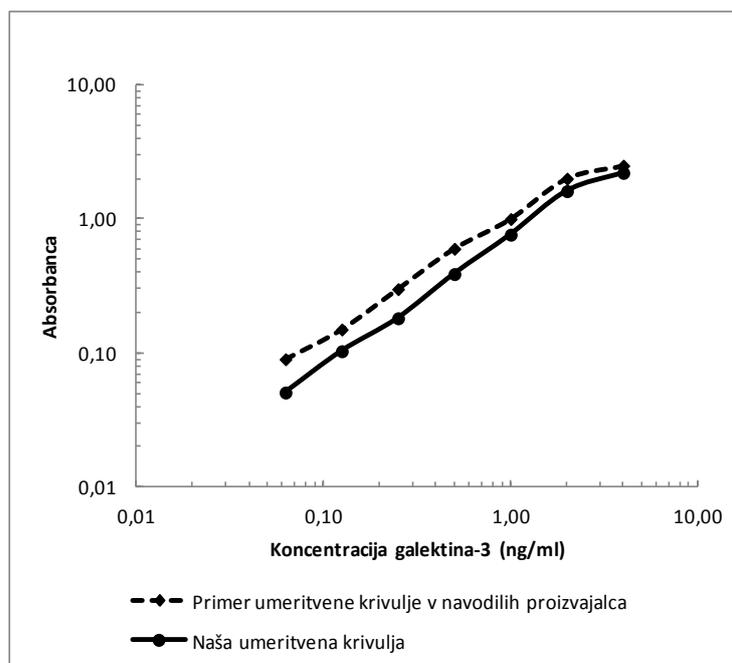
Zasnovali smo poskus, pri katerem smo mikrotitrsko ploščico razdelili na štiri pravokotnike z različnimi kombinacijami koncentracij primarnih in sekundarnih protiteles (angl. grid-experiment) in sicer smo pri primarnih protitelesih preskusili koncentracije 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  in 4  $\mu\text{g/ml}$ , pri sekundarnih protitelesih pa smo preskusili koncentracije 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml in 400 ng/ml. Preskusili smo torej 12 različnih kombinacij. Pri vsaki kombinaciji smo nanegli slepi vzorec (koncentracija galektina-3 0 ng/ml) in umeritvene raztopine s koncentracijami galektina-3 1, 2 in 4 ng/ml. Naklon je bil pri vseh kombinacijah izredno majhen, krivulje so bile skoraj popolnoma ravne, zato smo zaključili, da s spreminjanjem koncentracij primarnih ali sekundarnih protiteles ne bi mogli bistveno izboljšati naklona krivulje.

#### 4.1.3.3 Druge nepravilnosti v postopku

Nazadnje smo ponovno premislili, ali niso morda v postopku prisotne druge nepravilnosti. Ugotovili smo, da je bil pufer PBS pripravljen na napačen način in sicer je bil obravnavan kot 10-kratni koncentrat in bil zato 10-krat preveč razredčen. Ker pufer PBS predstavlja

osnovo za pripravo skoraj vseh ostalih reagentov, je obstajala zelo velika verjetnost, da je to vzrok položne krivulje.

Ponovno smo pripravili pufer PBS in vse ostale reagente. Pri poskusu smo uporabili koncentracije primarnih in sekundarnih protiteles, kot jih priporoča proizvajalec in nanesti sedem umeritvenih raztopin z razponom koncentracij 0,06 – 4,0 ng/ml, tako kot priporoča proizvajalec.



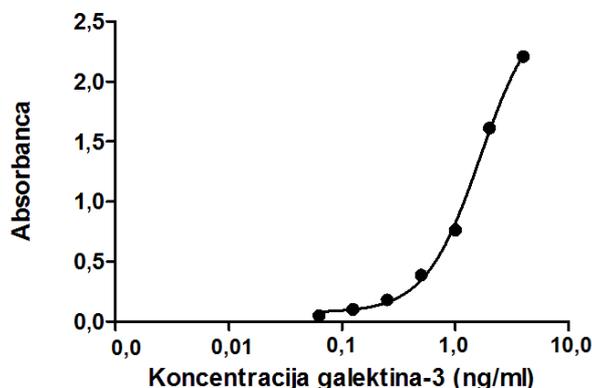
Graf 4: Optimizacija naklona umeritvene krivulje.

Umeritvena krivulja pri tem poskusu je imela zelo primerljiv naklon s primerom umeritvene krivulje v navodilih proizvajalca (graf 4), zato smo zaključili, da je bil vzrok neustreznega naklona napačna priprava pufera PBS. Najverjetneje je napačna priprava najbolj vplivala na korak vezave primarnih protiteles, saj je raztopina primarnih protiteles pripravljena v pufru PBS. Zaradi nižje ionske moči pufera kljub ustrezni koncentraciji in ustrezni mikrotitrski ploščici ni prišlo do zadostne vezave primarnega protitelesa.

#### 4.1.4 Ocenjevanje ustreznosti matematičnega modela za izračun umeritvene krivulje

Za izračun umeritvene krivulje pri metodi ELISA se lahko uporabljajo različni matematični modeli, pogosto se uporablja nelinearni regresijski model, pri katerem ocenjujemo štiri parametre (4PL, angl. 4-parameter logistic). Za izračun smo uporabili program GraphPad Prism 5, pri katerem parametre ocenjujemo z metodo Marquardta in Levenberga. Gre za računsko intenziven iterativen postopek, pri katerem prilagajamo

parametre v modelu, dokler ne dosežemo take vrednosti parametrov, pri katerih je vsota kvadratov najnižja. Primer umeritvene krivulje, ki jo dobimo s tem postopkom, je prikazan na grafu 5.



Graf 5: Primer umeritvene krivulje, izračunane z metodo nelinearne regresije.

Primernost modela smo ocenili z izračunom korelacijskega koeficienta ( $r^2$ ) in testom replikatov. *Test replikatov* je test, pri katerem si zastavimo vprašanje: ali so naše točke predaleč od krivulje? Primerjamo oddaljenost točk od krivulje z razpršenostjo replikatov, v našem primeru duplikatov. Najprej program izračuna standardno deviacijo med replikati (SD replikatov), nato standardno deviacijo odstopanja od krivulje (SD pomanjkanja ujemanja), ter nazadnje izračuna spremenljivko F, ki je kvadrat razmerja med obema SD. Poda nam p vrednost: če je le ta manjša od 0,05, smo izbrali neustrezen model (57). Kot je razvidno v preglednici I, je izbrana metoda ustrezna za analizo podatkov, naše ugotovitve pa se ujemajo tudi s priporočili proizvajalca (56).

Preglednica I: Rezultati ocene primernosti matematičnega modela za izračun umeritvene krivulje.

Primernost modela	
Prostostne stopnje	10
$R^2$	0,9956
Test replikatov	
SD replikatov	0,05615
SD pomanjkanja ujemanja	0,07053
Spremenljivka F	1,578
Vrednost p	0,2783
Ali je model ustrezen?	Ja

Zaključili smo, da je za izračun umeritvene krivulje in koncentracije v vzorcih matematični model 4PL ustrezen.

#### 4.1.5 Točnost

Pri ocenjevanju točnosti ocenjujemo, koliko povprečna izmerjena vrednost odstopa od dejanske vrednosti. Ker za določanje galektina-3 ni referenčne metode, s katero bi lahko določili dejansko vrednost, smo točnost ocenili s testom pravilnosti s pridobitvijo dodatka in testom linearnosti redčitev. Oba sta bila podrobneje predstavljena že v uvodu, v poglavju 1.4.2 *Optimizacija in validacija metode ELISA*.

Test s pridobitvijo dodatka in test linearnosti redčitev smo naredili tako, da smo najprej pripravili dve seriji redčitev zbirnega vzorca (redčitve 1:2, 1:3, 1:5 in 1:10). V eni seriji vzorcem nismo ničesar dodajali, v drugi seriji pa smo vsakemu vzorcu dodali enako količino galektina-3.

Pri *testu pravilnosti s pridobitvijo dodatka* smo najprej določili pričakovano povečanje koncentracije in sicer tako, da smo enako količino galektina-3, ki smo jo dodali vzorcem, dodali tudi v redčitveni reagent (slepo vzorca ali 1% BSA v PBS) in sicer je bila ta vrednost 0,42 ng/ml. Nato smo izračunali pridobitev po spodnji enačbi.

$$\text{Pridobitev (\%)} = \frac{\text{izmerjeno povečanje koncentracije}}{\text{pričakovano povečanje koncentracije}} \times 100$$

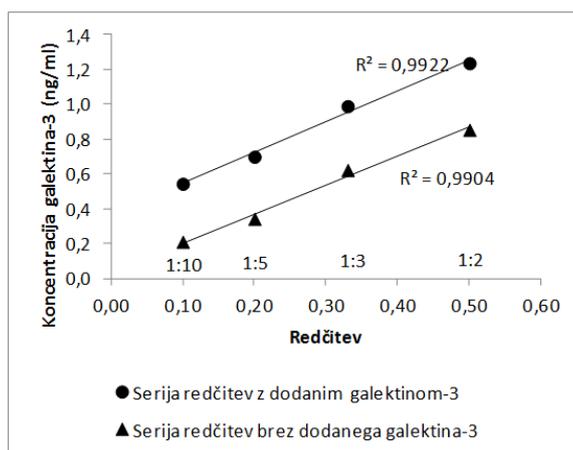
Rezultati so prikazani v *preglednici II*.

*Preglednica II: Rezultati testa pravilnosti s pridobitvijo dodatka.*

Redčitev	Koncentracija galektina-3 (ng/ml)	Koncentracija v vzorcih z dodatkom galektina-3 (ng/ml)	Izmerjeno povečanje koncentracije (ng/ml)	Pričakovano povečanje koncentracije (ng/ml)	Pridobitev (%)
1:10	0,21	0,54	0,33	0,42	79,8
1:5	0,43	0,70	0,27	0,42	64,3
1:3	0,62	0,99	0,37	0,42	87,8
1:2	0,85	1,24	0,38	0,42	91,6

Povprečna pridobitev je 80,9% in ker je za pridobitev ustrezno, če je med 80% in 120% (53) smo ocenili, da je točnost metode ustrezna ter da razlika med ozadjem umeritvenih raztopin in ozadjem vzorcev ne vpliva bistveno na točnost rezultatov.

Pri *testu linearnosti redčitev* pa smo linearnost ocenili tako, da smo na graf nanegli na ordinatno os redčitve, na abscisno os pa izmerjeno koncentracijo galektina-3 tako za serijo redčitev brez dodanega galektina-3 kot za serijo redčitev z dodanim galektinom-3 (*graf 6*). (55)



Graf 6: Rezultati testa linearnosti redčitev.

S pomočjo linearne regresije smo nato določili Pearsonov korelacijski koeficient. Pri obeh serijah je bil korelacijski koeficient 0,99, kar kaže na dobro linearnost redčitev in pomeni, da izmerimo enako vrednost ne glede na redčitev, pri redčitvah od 1:2 do 1:10.

Na podlagi testa s pridobitvijo dodatka in testa linearnosti redčitev smo torej ugotovili, da je serum ustrezen vzorec za analizo z našimi reagenti, da je linearnost redčitev pri redčitvah od 1:2 do 1:10 ustrezna in da je točnost metode ustrezna.

#### 4.1.6 Natančnost

Pomembna lastnost dobre metode je poleg točnosti tudi dobra natančnost, saj to pomeni, da daje pri več različnih meritvah istega vzorca enake vrednosti. Natančnost smo preverjali na dveh nivojih in sicer znotraj serije in med serijami. Poleg tega smo jo ocenjevali pri različnih koncentracijah galektina-3, saj ni nujno, da je enaka znotraj celotnega meritvenega območja metode. Vzorcev z znano koncentracijo galektina-3 nismo imeli, zato smo izbrali posamezne vzorce iz dveh skupin in sicer iz skupine vzorcev zdravih preiskovancev in iz skupine vzorcev preiskovancev z različnimi boleznimi. Poleg tega smo analizirali tudi oba zbirna vzorca, z visoko in nizko koncentracijo galektina-3. Vsi vzorci so bili že opisani v podpoglavju 3.1.4 *Biološki vzorci*. Natančnost smo torej določali tako pri vzorcih posameznih preiskovancev kot pri zbirnima vzorcema. S tako izbiro smo želeli, da bi zajeli različne koncentracije galektina-3 in različna ozadja vzorcev, s čimer bi se kar najbolj približali pogojem analize po zaključeni optimizaciji.

Pri ocenjevanju natančnosti s **posameznimi vzorci** smo natančnost najprej vrednotili s *serumi preiskovancev z različnimi boleznimi*. Naredili smo dva zaporedna poskusa in analizirali sedem vzorcev. Da bi ocenili natančnost **znotraj serije**, smo izračunali KV za vsak duplikat pri vsakem poskusu posebej. Povprečen KV je bil 4,0%, najvišja vrednost je bila 14,8%, najnižja pa 0,5%. Nato smo ocenili natančnost **med serijami** (*preglednica III*).

*Preglednica III: Natančnost med analizami pri vzorcih preiskovancev z različnimi boleznimi.*

Vzorec	Povprečna koncentracija galektina-3 (ng/ml)	SD (ng/ml)	KV (%)
vzorec 1	5,01	0,39	7,9
vzorec 2	1,38	0,15	10,7
vzorec 3	2,05	0,46	22,4
vzorec 5	2,00	0,18	8,8
vzorec 6	4,69	0,59	12,6
vzorec 7	16,17	4,54	28,1
vzorec 8	13,21	5,31	40,2

Očitno je bilo, da je razlika v določeni koncentraciji med obema poskusoma zelo velika. Povprečen koeficient variacije je bil 18,7%, najvišja vrednost pa kar 40,2%. Taka stopnja nenatančnosti je bila nesprejemljiva, zato je bila potrebna dodatna optimizacija, da bi zagotovili zadostno natančnost. Pri ocenjevanju možnih vzrokov slabe natančnosti smo ugotovili, da le teh ni veliko, saj je vse poskuse naredila ena oseba, z uporabo istih reagentov, enakih mikrotitrskih plošč in pri enakih koncentracijah vseh reagentov. Pomislili smo, da bi vzrok lahko bil v koraku vezave primarnih protiteles. Ta korak poteka namreč preko noči na sobni temperaturi, sobna temperatura pa je v tem obdobju variirala za kar nekaj stopinj (vročinski val in nato ohladitev). Zato smo se odločili, da bomo točno določili temperaturo in čas vezave primarnega protitelesa. Ker v laboratoriju nismo mogli zagotoviti konstantnih 20°C, smo se odločili, da bomo ta korak izvedli na 4°C v trajanju 20 ur. Poskusa smo ponovili pri optimiziranih pogojih, tokrat z devetimi vzorci. Najprej smo ocenili natančnost **znotraj serije**: Povprečen KV pri analiziranih duplikatih je bil 2,9%, najvišja vrednost je bila 5,5%, najnižja pa le 0,3%. Nato smo preverili, ali je natančnost **med serijami** sedaj, ko smo optimizirali pogoje vezave primarnega protitelesa, boljša. Rezultati so prikazani v *preglednici IV*.

*Preglednica IV: Natančnost med serijami pri vzorcih preiskovancev z različnimi boleznimi po optimizaciji pogojev vezave primarnega protitelesa.*

Vzorec	Povprečna koncentracija galektina-3 (ng/ml)	SD (ng/ml)	KV (%)
vzorec 1	4,61	0,03	0,6
vzorec 2	1,94	0,28	14,6
vzorec 3	2,42	0,11	4,4
vzorec 4	1,45	0,29	20,3
vzorec 5	2,75	0,35	12,7
vzorec 6	4,57	0,17	3,8
vzorec 7	16,45	1,43	8,7
vzorec 8	12,99	2,19	16,8
vzorec 9	9,19	0,50	5,5

Razvidno je, da je bila natančnost boljša in sicer je bil povprečen KV 9,7%, najvišja vrednost je bila 20,3% in najnižja 0,6%.

Sledilo je vrednotenje natančnosti s serumi zdravih preiskovancev. Zasnovali smo serijo štirih poskusov in analizirali sedem vzorcev. Da bi ocenili natančnost **znotraj serije**, smo izračunali koeficient variacije za vsak duplikat pri vsakem poskusu posebej. Povprečen KV je bil 2,9%, najnižja vrednost je bila 0,0%, najvišja pa 13,1%.

Natančnost **med serijami** smo ocenili tako, da smo primerjali povprečne vrednosti galektina-3 določene pri vsakem od štirih poskusov. *Preglednica V* prikazuje povzetek rezultatov.

*Preglednica V: Natančnost med serijami pri vzorcih zdravih preiskovancev.*

Vzorec	Povprečna koncentracija galektina-3 (ng/ml)	SD (ng/ml)	KV (%)
vzorec 38	2,37	0,17	7,3
vzorec 39	3,47	0,25	7,1
vzorec 45	1,91	0,17	8,8
vzorec 56	2,35	0,12	4,9
vzorec 60	1,58	0,17	10,7
vzorec 61	2,46	0,23	9,5
vzorec 64	2,14	0,19	9,1

Povprečen KV je bil 8,2%, najnižja vrednost je bila 4,9%, najvišja pa 10,7%.

Natančnost smo nato želeli še dodatno oceniti z **analizami zbirnih vzorcev**. Zbirni vzorec z nizko koncentracijo galektina-3 smo analizirali pri dvanajstih poskusih, 5-krat v kvadruplikatu in 6-krat v duplikatu. Zbirni vzorec z visoko koncentracijo galektina-3 smo analizirali pri petih poskusih v duplikatu. Natančnost **znotraj serije** smo ocenili tako, da

smo za vsak poskus posebej izračunali povprečno vrednost, SD in KV. Nato smo izračunali povprečne vrednosti teh vrednosti in tako določili povprečno natančnost znotraj analize. Natančnost **med serijami** smo ocenili tako, da smo primerjali povprečne vrednosti galektina-3 določene pri vsakem poskusu. Rezultati so prikazani v *preglednici VI*.

*Preglednica VI: Povzetek rezultatov natančnosti pri analizi zbirnih vzorcev.*

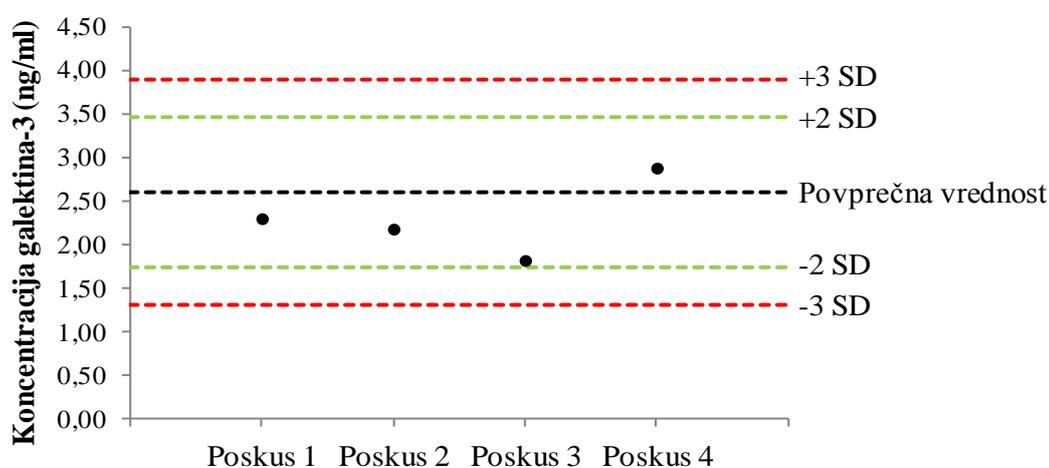
Vzorec	Povprečna koncentracija galektina-3 (ng/ml)	Natančnost znotraj serije		Natančnost med serijami	
		SD (ng/ml)	KV (%)	SD (ng/ml)	KV (%)
zbirni vzorec z nizko koncentracijo galektina-3	2,59	0,11	4,2	0,43	16,6
zbirni vzorec z visoko koncentracijo galektina-3	15,09	0,45	3,3	1,23	8,1

Pri metodi ELISA za določanje galektina-3 proizvajalca BG Medicine, Inc., ki je bila odobrena s strani FDA, je natančnost znotraj serije 2,1 – 5,7%, med serijami pa 3,0 – 10,5% (58) pri različnih koncentracijah galektina-3. Ob primerjavi z rezultati ocenjevanja natančnosti naše metode (*preglednica VI*) smo ugotovili, da je natančnost znotraj serije zelo primerljiva, saj je bila v povprečju 2,9% pri posameznih vzorcih in 4,2% oziroma 3,3% pri analizi zbirnih vzorcev. Tudi natančnost med serijami je bila zelo podobna in sicer 9,7% pri posameznih vzorcih preiskovancev z različnimi boleznimi, 8,2% pri posameznih vzorcih zdravih preiskovancev in 8,1% pri analizi zbirnega vzorca z visoko koncentracijo galektina-3. Pri analizi zbirnega vzorca z nizko koncentracijo galektina-3 je bila (ne)natančnost nekoliko višja, saj je bila 16,6%, vendar smo zaključili, da je taka natančnost zadovoljiva, saj je manjša od 20%. Namreč, kriterij pri zgoraj omenjeni metodi ELISA proizvajalca BG Medicine, Inc. je, da zavrremo vse vzorce, pri katerih je koeficient variacije med duplikati (znotraj serije) večji od 20% (59). Ta kriterij smo tudi mi privzeli in če smo torej postavili zahtevo, da mora biti variabilnost med duplikati manjša od 20%, je bilo smiselno zaključiti, da je (ne)natančnost med serijami 16,6% sprejemljiva.

Ugotovili smo torej, da je bila natančnost naše metode ELISA za določanje galektina-3 po optimizaciji pogojev vezave primarnega protitelesa ustrezna tako znotraj serije kot med serijami, pri različnih koncentracijah galektina-3 in tako ob uporabi zbirnih vzorcev kot posameznih vzorcev zdravih preiskovancev in preiskovancev z različnimi boleznimi. S tem smo zagotovili, da je metoda ustrezna in uporabna za določanje galektina-3 v serumih preiskovancev.

## 4.2 Določanje koncentracije galektina-3 v vzorcih preiskovancev

Vzorci seruma, ki so bili do analize shranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$ , smo najprej redčili in nato določili koncentracijo galektina-3, kot je že bilo opisano v podpoglavju 3.3 *Določanje koncentracije galektina-3 v serumu z metodo ELISA*. Da bi preverili ustreznost kakovosti določitev, smo pri vsakem poskusu analizirali zbirni vzorec z nizko koncentracijo galektina-3. Pri nobenem od poskusov koncentracija galektina-3 ni odstopala od povprečne vrednosti določene pri poskusih ocenjevanja natančnosti med serijami za več kot 2 SD, zato smo sklepali, da je bila kakovost ustrezna. Rezultati so prikazani na grafu 7.



Graf 7: Koncentracija zbirnega vzorca z nizko koncentracijo galektina-3 določena pri poskusih z vzorci preiskovancev.

Analizirali smo 147 vzorcev preiskovancev, vendar pri 16 določitev ni uspela. Pri 13 se izmerjena absorbanca ni razlikovala od absorbance slepega vzorca, pri 3 pa je bil KV med duplikatoma večji od 20%. Pri teh vzorcih smo želeli meritev ponoviti, vendar zaradi pomanjkanja reagentov to ni bilo možno. Sklepali smo, da je vzrok neuspešnih določitev tehnične narave, npr. napake pri pipetiranju. Poleg tega smo zaključili, da je število neuspešnih določitev dovolj majhno, da njihova izključitev iz nadaljnje analize ne bo vplivala na verodostojnost zaključkov statistične analize. V statistično analizo smo tako vključili 131 vzorcev.

## B. Klinični pomen določanja galektina-3 pri OP in OA

### 4.3 Povezanost z antropometričnimi lastnostmi

*De Boer in sod.* (60) so ugotovili, da je plazemska koncentracija galektina-3 povezana z različnimi demografskimi značilnostmi v skupini 7968 preiskovancev iz prospektivne raziskave PREVEND, med drugim je korelirala z ITM, spolom in starostjo. Na podlagi tega smo se odločili, da bomo najprej preverili, ali je tudi v naši skupini preiskovancev prisotna povezava z antropometričnimi lastnostmi. Preiskovance smo glede na koncentracijo galektina-3 razdelili v kvintile. Nato smo ugotavljali, ali obstaja razlika med kvintili v frekvencah posameznega spola s  $\chi^2$ -testom ter v starosti, ITM, višini in teži s testom ANOVA. Pred uporabo testa ANOVA smo preverili normalnost porazdelitve znotraj kvintilov s Shapiro-Wilkovim testom. Vrednosti posameznih spremenljivk v kvintilih so prikazane v preglednici VII.

*Preglednica VII: Povezava koncentracije galektina-3 z antropometričnimi lastnostmi.*

Kvintil	Koncentracija galektina-3 (ng/ml)	Starost (leta)	*Višina (cm)	*Teža (kg)	ITM (kg/m <sup>2</sup> )	*Ženski spol (%)
1	1,35 (0,95 – 1,82)	67,4 ± 11,8	165 ± 8	74,4 ± 17,3	27,0 ± 5,0	69,2
2	2,14 (1,89 – 2,40)	66,9 ± 9,4	167 ± 12	83,2 ± 14,8	30,0 ± 4,8	69,2
3	2,78 (2,42 – 3,16)	65,9 ± 9,9	162 ± 6	72,9 ± 12,3	27,8 ± 5,0	85,2
4	3,59 (3,20 – 3,95)	66,8 ± 8,0	161 ± 9	69,2 ± 15,1	26,6 ± 5,1	80,8
5	4,75 (4,02 – 6,12)	67,1 ± 12,7	160 ± 6	69,8 ± 13,1	27,4 ± 4,9	100,0
<i>p vrednost</i>		<i>p = 0,990</i>	<i>p = 0,035</i>	<i>p = 0,007</i>	<i>p = 0,119</i>	<i>p = 0,026</i>

\*statistično značilne razlike med kvintili. Vrednosti so povprečna vrednost ± SD, pri galektinu-3 so povprečna vrednost (najmanjša vrednost – najvišja vrednost), pri spolu so odstotki.

V skladu s prej omenjeno raziskavo smo tudi mi ugotovili statistično značilne razlike med kvintili v spolu ( $p = 0,026$ ,  $N = 131$ ), višini ( $p = 0,035$ ,  $N = 126$ ) in teži ( $p = 0,007$ ,  $N = 126$ ). Nasprotno pa se v naši skupini preiskovancev kvintili niso statistično značilno razlikovali v ITM ( $p = 0,119$ ,  $N = 126$ ) in starosti ( $p = 0,990$ ,  $N = 131$ ). Najverjetnejši vzrok odstopanja je manjše število preiskovancev in s tem manjša statistična moč, zelo verjeten vzrok pa so tudi razlike med vzorcema. V raziskavi *de Boerja in sod.* je vzorec zajet iz splošne belopolte populacije, pri nas pa iz OP/OA bolnikov in zdravih kontrol, poleg tega naša skupina preiskovancev zajema starejše preiskovance s povprečno starostjo  $66,8 \pm 10,3$  let, v primerjavi z zgoraj navedeno raziskavo, pri kateri je povprečna starost preiskovancev  $49,5 \pm 12,7$  let. Največja razlika pa je bila v sestavi vzorca glede na spol. Medtem ko so *de Boer in sod.* imeli primerljivo število preiskovancev obeh spolov (4001 žensko in 3967 moških) smo mi v raziskavo zajeli 106 žensk in le 25 moških, kar bi lahko

vplivalo predvsem na povezavo z ITM. Zaključili smo, da je koncentracija galektina-3 statistično značilno višja pri ženskah. Povezava z višino in težo je manj izrazita in se izniči po izračunu ITM prav tako pa v naši skupini preiskovancev nismo potrdili povezave med koncentracijo galektina-3 in starostjo. Pri interpretaciji naših zaključkov je potrebno imeti v mislih zgoraj navedene omejitve.

#### 4.4 Povezanost z osteoporozo in osteoartritozo

Galektin-3 ima vlogo pri OA, saj je izražanje galektina-3 v hondrocitih povišano (42), poleg tega so *Alturfan in sod.* (45) ugotovili, da je koncentracija galektina-3 v serumu in sinovialni tekočini višja pri preiskovankah z OA v primerjavi z zdravimi preiskovankami. Nobena raziskava do sedaj pa ni proučevala pomena galektina-3 pri OP. Na podlagi tega smo se odločili, da preverimo, ali je tudi v naši skupini preiskovancev serumska koncentracija galektina-3 povezana z OA in ali je morda povezana z OP.

Preiskovancem smo določili serumsko koncentracijo galektina-3 in jih glede na diagnozo razdelili v kontrolno skupino preiskovancev (N = 41), v skupino preiskovancev z OP (N = 48) in skupino preiskovancev z OA (N = 42). *Preglednica VIII* prikazuje osnovne značilnosti posameznih skupin.

*Preglednica VIII: Značilnosti preiskovancev po posameznih skupinah glede na diagnozo.*

	Kontrolna (N = 41)	OP (N = 48)	OA (N = 42)
Starost (leta)	61,6 ± 5,2	70,2 ± 10,2	68,0 ± 12,3
Spol (ženske/moški)	41/0	43/5	22/20
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	28,1 ± 5,2	25,7 ± 4,6	30,1 ± 4,4
MKG ledvenega dela hrbtenice (g/cm <sup>2</sup> )	0,936 ± 0,112	0,789 ± 0,180	1,075 ± 0,192
MKG kolka (g/cm <sup>2</sup> )	0,915 ± 0,109	0,741 ± 0,144	0,968 ± 0,166
MKG vratu stegenice (g/cm <sup>2</sup> )	0,752 ± 0,0973	0,620 ± 0,103	0,853 ± 0,158
Galektin-3 (ng/ml)	3,0 ± 1,1	3,1 ± 1,3	2,7 ± 1,3

*Vrednosti so aritmetična sredina ± SD, pri spolu so vrednosti frekvence.*

Sledila je statistična analiza. Koncentracija galektina-3 je povezana s starostjo, ITM in spolom (glej poglavje 4.3 *Povezanost z antropometričnimi lastnostmi*), zato se nam je zdelo smiselno, da bi te spremenljivke vključili v statistično analizo kot kovariate in naredili analizo kovariance (ANCOVA, angl. analysis of covariance). ANCOVA tako kot večina statističnih metod temelji na določenih predpostavkah in ena izmed teh je, da je kovariata neodvisna od naše neodvisne spremenljivke (61). V našem primeru to pomeni, da mora biti kovariata (starost, spol, ITM) neodvisna od postavljene diagnoze. To lahko enostavno preverimo tako, da skupine med seboj primerjamo z metodo ANOVA (starost,

ITM) ali testom  $\chi^2$  (spol). V primeru statistično značilnih razlik v kovariati med skupinami, kovariate ni smiselno vključiti v statistični model. Splošno razširjeno prepričanje, da bi z vključitvijo kovariate popravili razlike med skupinami, je namreč zmotno (61,62).

Vključitev take kovariate ne izniči razlik med skupinami, lahko pa povzroči napačno oceno vpliva neodvisne spremenljivke (62). V našem primeru imajo starost, spol in ITM poleg povezave s koncentracijo galektina-3 tudi vlogo tako pri OP kot pri OA, zato ni presenetljivo, da je statistična analiza pokazala statistično značilne razlike med skupinami v starosti ( $p = 0,000$ , ANOVA), ITM ( $p = 0,000$ , ANOVA) in spolu ( $p = 0,000$ , Fisherjev eksaktni test). Starosti, ITM in spola posledično nismo vključili kot kovariate v model, za ocenjevanje razlik v koncentraciji galektina-3 med skupinami pa smo uporabili metodo ANOVA. Pri preverjanju normalnosti porazdelitve koncentracije galektina-3 znotraj posameznih skupin s Shapiro-Wilkovim testom smo ugotovili, da porazdelitev odstopa od normalnosti v skupini OA. Naredili smo transformacijo s kvadratnim korenem in s tem dosegli normalno porazdelitev v vseh treh skupinah. Nato smo z analizo ANOVA ugotovili, da povezava med serumsko koncentracijo galektina-3 in postavljeno diagnozo ni statistično značilna ( $p = 0,277$ ,  $N = 131$ ).

Naša raziskava je prva, ki je proučevala serumsko koncentracijo galektina-3 pri OP. Ugotovitev, da serumsko koncentracija pri OP ne odstopa od koncentracije galektina-3 pri zdravih in osteoartritoznih preiskovancih bi lahko imela vrednost v smislu diferencialne diagnostike, torej ločevanja od bolezni, pri katerih je koncentracija bodisi zvišana ali znižana. Je pa potrebno imeti v mislih, da so naše skupine precej heterogene glede na starost, spol in ITM, ki vplivajo na koncentracijo galektina-3. Obstaja možnost, da je njihov vpliv prikril razlike v koncentraciji galektina-3 v naši študiji. Naši rezultati so tudi v nasprotju z rezultati *Alturfan in sod.* (45), ki so pri preiskovankah z OA ugotovili povišano plazemsko koncentracijo galektina-3. Vzrok za odstopanje bi lahko bil v različni sestavi skupin, saj smo mi vključili tako moške kot ženske, medtem ko so *Alturfan in sod.* vključili le ženske, mi smo vključili osebe stare 43 – 92 let, medtem ko so *Alturfan in sod.* vključili osebe stare 40 – 69 let, najverjetneje obstajajo tudi razlike v ITM, vendar *Alturfan in sod.* v članku tega podatka niso navedli. Spol, starost in ITM, kot že večkrat omenjeno, vplivajo na koncentracijo galektina-3 in možno je, da je njihov vpliv prikril razlike v koncentraciji galektina-3 v naši študiji. To možnost bi lahko izključili, če bi raziskavo ponovili na drugačnem naboru preiskovancev, pri katerem bi vsak preiskovanec z OA imel v kontrolni skupini preiskovanca primerljive starosti, spola in ITM.

## 4.5 Povezanost z mineralno kostno gostoto

OP in OA predstavljata nasproten kostni fenotip glede na MKG in sicer je MKG višji pri OA v primerjavi z OP (6,63). Zato smo najprej s testom ANOVA potrdili, da je med skupinami preiskovancev z OP, OA in zdravih kontrol statistično značilna razlika v MKG kolka, ledvenega dela hrbtenice in vratu stegenice. Ker do sedaj še nobena raziskava ni proučevala, ali obstaja povezava med galektinom-3 in MKG, smo se odločili, da bomo proučili to povezavo. Zanimalo nas je, ali obstaja korelacija v celotni skupini preiskovancev, nato pa še, ali se skupine OP, OA in zdravih kontrol razlikujejo v korelaciji med galektinom-3 in MKG. Podatki se niso normalno porazdeljevali, zato smo za oceno korelacije uporabili Spearmanov  $\rho$ . Ugotovili smo, da galektin-3 ne korelira statistično značilno z MKG kolka ( $p = 0,216$ ,  $\rho = -0,122$ ,  $N = 104$ ), ledvenega dela hrbtenice ( $p = 0,146$ ,  $\rho = -0,139$ ,  $N = 110$ ) in vratu stegenice ( $p = 0,090$ ,  $\rho = -0,167$ ,  $N = 104$ ) v celotni skupini preiskovancev. Analizo smo ponovili v podskupinah OP, OA in zdravih kontrol. Ugotovili smo, da korelacija med galektinom-3 in MKG na kateremkoli od merjenih mest ni statistično značilna v nobeni podskupini. Rezultati so prikazani v preglednici IX.

Preglednica IX: Korelacija med galektinom-3 in MKG v OP, OA in kontrolni skupini.

	Kontrolna	OP	OA
MKG kolka	$p = 0,738$ , $\rho = 0,054$ , $N = 41$	$p = 0,811$ , $\rho = -0,039$ , $N = 41$	$p = 0,265$ , $\rho = -0,249$ , $N = 22$
MKG ledvenega dela hrbtenice	$p = 0,514$ , $\rho = -0,090$ , $N = 41$	$p = 0,908$ , $\rho = 0,018$ , $N = 43$	$p = 0,314$ , $\rho = -0,206$ , $N = 26$
MKG vratu stegenice	$p = 0,677$ , $\rho = 0,067$ , $N = 41$	$p = 0,208$ , $\rho = -0,201$ , $N = 41$	$p = 0,408$ , $\rho = -0,186$ , $N = 22$

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da serumska koncentracija galektina-3 ni povezana z MKG. To pomeni, da če se galektin-3 v sistemskem krvnem obtoku vpleta v patogenezo OP ali OA, to počne preko mehanizmov neodvisnih od MKG.

## 4.6 Povezanost s koncentracijo 25-hidroksivitamina D v serumu

Pomanjkanje vitamina D je pomemben dejavnik tveganja za pojav OP in vpliva na metabolizem kalcija, aktivnost osteoblastov in kostno premeno (5,64). Novejše raziskave nakazujejo, da bi neravnotežje v kostni premeni subhondralne kosti lahko bilo sprožilni dejavnik pri OA (65). Vitamin D bi se lahko, podobno kot pri OP, vpletal v patološko ozadje tudi pri OA in raziskave kažejo, da pomanjkanje vitamina D vpliva na nastanek OA (64). Poleg tega so Aubin in sod. (35) ugotovili, da 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> poviša

izražanje galektina-3 v osteoblastih. Zanimalo nas je, ali morda obstaja korelacija med serumsko koncentracijo galektina-3 in serumsko koncentracijo vitamina D.

Pri 109 preiskovancih je bila določena koncentracija 25-hidroksivitamina D in sicer pri 40 zdravih preiskovancih, 47 preiskovancih z OP in pri 22 preiskovancih z OA. Podatki se niso porazdeljevali normalno, zato smo za ocenjevanje korelacije uporabili neparametrični Spearmanov  $\rho$ . Korelacija med serumsko koncentracijo galektina-3 in serumsko koncentracijo 25-hidroksivitamina D ni bila statistično značilna niti v skupini vseh preiskovancev ( $p = 0,975$ ,  $\rho = 0,003$ ,  $N = 109$ ) niti v podskupinah OP ( $p = 0,368$ ,  $\rho = -0,134$ ,  $N = 47$ ), OA ( $p = 0,711$ ,  $\rho = -0,084$ ,  $N = 22$ ) in zdravih preiskovancev ( $p = 0,515$ ,  $\rho = 0,106$ ,  $N = 40$ ). Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da med serumsko koncentracijo galektina-3 in koncentracijo vitamina D ni povezave. Vendar pa s tem še ne moremo izključiti morebitnega obstoja interakcije na celični ali molekularni ravni in s tem vpetosti v OP ali OA.

#### **4.7 Povezanost koncentracije galektina-3 s serumskimi kazalci kostne premene**

Ugotovili smo, da serumska koncentracija galektina-3 pri preiskovancih z OP ne odstopa od vrednosti pri zdravih preiskovancih, prav tako pa koncentracija ni povezana z MKG ali koncentracijo 25-hidroksivitamina D. Ker se galektin-3 vpleta v procese, ki so pomembni v patološkem ozadju OP in ker do sedaj nobena raziskava ni proučevala njegove vloge pri OP, smo želeli podrobneje opredeliti morebiten pomen pri OP. V skupini zdravih in OP preiskovancev je bila izmerjena koncentracija nekaterih kazalcev, povezanih z OP: C-terminalni telopeptid kolagena tipa I (CTX), ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (RANKL), osteoprotegerin (OPG), dickkopf 1 (DKK1) in parathormon (PTH).

##### **4.7.1 C-terminalni telopeptid kolagena tipa I**

Spremenjena kostna premena, ki jo ocenjujemo s kazalci kostne premene, je eden od dejavnikov tveganja za OP (66). Za ocenjevanje kostne premene mednarodne smernice (67) priporočajo merjenje N-terminalnega propeptida prokolagena tipa I (PINP) za oceno kostne tvorbe in C-terminalnega telopeptida kolagena tipa I (CTX) za oceno kostne razgradnje. Žal serumska koncentracija PINP ni bila izmerjena, zato smo se osredotočili na oceno povezave med galektinom-3 in CTX. K naši odločitvi je prispevalo tudi dejstvo, da

so *Li in sod.* (34) pokazali, da je zunajcelični galektin-3 vpleten v osteoklastogenezo ter da zmanjša tako površino kot število resorpcijskih vdolbinic, zavira pa tudi nastanek aktinskega obroča, strukture, ki je povezana z aktivnostjo osteoklastov. Do sedaj še nobena raziskava ni proučevala povezave med kazalci kostne razgradnje in serumsko koncentracijo galektina-3.

Na podskupini 62 preiskovank ženskega spola, 22 z diagnozo OP in 40 zdravih, je bila določena serumska koncentracija CTX. Podatki so se normalno porazdeljevali, zato smo povezavo med galektinom-3 in CTX ocenjevali s Pearsonovim korelacijskim koeficientom ( $r$ ). Korelacija ni bila statistično značilna ( $p = 0,620$ ,  $r = -0,064$ ,  $N = 62$ ). Analizo smo nato izvedli še posebej za osteoporozne in zdrave preiskovanke ter ugotovili, da korelacija ni statistično značilna v skupini preiskovank z OP ( $p = 0,215$ ,  $r = 0,275$ ,  $N = 22$ ) medtem ko je bila mejno statistično značilna v skupini zdravih preiskovank ( $p = 0,057$ ,  $r = -0,304$ ,  $N = 40$ ). Naši mejno statistično značilni rezultati v skupini zdravih preiskovancev namigujejo na povezanost med koncentracijo galektina-3 in CTX. Povezava je obratno sorazmerna, kar se sklada tudi z rezultati *Li in sod.* (34), ki so pokazali, da zunajcelični galektin-3 zavira osteoklastno kostno razgradnjo, kar bi se lahko kazalo kot nižje vrednosti CTX in bilo vzrok za povezavo med serumskimi koncentracijami CTX in galektina-3. Vendar pa bodo potrebne še nadaljnje raziskave za podrobnejšo opredelitev.

#### **4.7.2 Osteoprotegerin in RANKL**

Sistem dejavnikov RANK/RANKL/OPG ima izredno pomembno vlogo pri osteoklastogenezi. Osteoblasti proizvajajo RANKL, ki se veže na receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (RANK) na prekurzorjih osteoklastov in jih s tem spodbudi k diferenciaciji v osteoklaste. Osteoblasti proizvajajo tudi OPG, ki po vezavi na RANK prepreči signaliziranje in tako zavre nastanek in aktivacijo osteoklastov. Interakcija RANK/RANKL je nujna tako za diferenciacijo osteoklastov kot za vzdrževanje aktivnosti osteoklastov in zato predstavlja nekakšno skupno pot, na katero vplivajo patogeni dejavniki pri OP, ki delujejo tako, da povišajo kostno razgradnjo. (68) Zaradi pomena dejavnikov RANK/RANKL/OPG pri OP nas je zanimalo, ali morda obstaja povezava med koncentracijo galektina-3 ter koncentracijo RANKL oziroma OPG.

Koncentracija OPG je bila določena pri 51 preiskovankah, 26 zdravih in 25 preiskovankah z OP. Koncentracija RANKL pa je bila določena pri 48 preiskovankah, 26 zdravih in 22 preiskovankah z OP. Porazdelitev je odstopala od normalnosti, zato smo za ocenjevanje

povezanosti uporabili Spearmanov koeficient ( $\rho$ ). Koncentracija galektina-3 ni bila statistično značilno povezana s koncentracijo OPG ( $p = 0,141$ ,  $\rho = 0,209$ ,  $N = 51$ ) ali s koncentracijo RANKL ( $p = 0,957$ ,  $\rho = 0,008$ ,  $N = 48$ ). Povezava z OPG ni bila statistično značilna v podskupini zdravih preiskovank ( $p = 0,566$ ,  $\rho = 0,118$ ,  $N = 26$ ) in preiskovank z OP ( $p = 0,170$ ,  $\rho = 0,283$ ,  $N = 25$ ). Podobno tudi povezava z RANKL ni bila statistično značilna v podskupini zdravih preiskovank ( $p = 0,510$ ,  $\rho = -0,135$ ,  $N = 26$ ) in podskupini z OP ( $p = 0,393$ ,  $\rho = 0,192$ ,  $N = 22$ ). Glede na rezultate lahko sklepamo, da galektin-3 ni povezan s koncentracijo RANKL in OPG. Vendar pa odsotnost povezave v serumskih koncentracijah še ne izključuje morebitne vloge na molekularnem nivoju.

### **4.7.3 Dickkopf 1**

Signaliziranje preko poti wnt/ $\beta$ -katenin ima ključno vlogo pri uravnavanju kostne mase in sicer povišano signaliziranje spodbuja kostno tvorbo, medtem ko ima zaviranje signaliziranja nasproten učinek (69). Raziskave so pokazale, da je znotrajcelični galektin-3 regulator te poti, saj vpliva na  $\beta$ -katenin in spremeni njegovo lokalizacijo iz citoplazme v jedro (70). Ni pa še raziskano, ali ima vpletanje galektina-3 v signalno pot wnt/ $\beta$ -katenin vlogo pri OP, poleg tega se raziskave osredotočajo na znotrajcelični galektin-3, medtem ko morebitni vpliv zunajceličnega galektina-3 na to signalno pot še ni raziskan. Pri uravnavanju signaliziranja preko signalne poti wnt so pomembni tudi antagonisti wnt, ki zavirajo to signalno pot. Med najpomembnejšimi je topni inhibitor dickkopf-1 (DKK1), ki ima izredno pomembno vlogo pri uravnavanju kostne mase pri ljudeh: povišano izražanje je povezano z osteopenijo, znižano pa z višjo kostno maso (69). Zaradi pomena DKK1 v krvnem obtoku pri uravnavanju signaliziranja preko poti wnt/ $\beta$ -katenin in vpletenosti znotrajceličnega galektina-3 v to signalno pot, smo želeli oceniti, ali obstaja povezava med serumsko koncentracijo galektina-3 in DKK1.

V podskupini 48 ženskih preiskovank, 22 z osteoporozi in 26 zdravih, je bila določena serumska koncentracija DKK1. Podatki se niso normalno porazdeljevali, zato smo za ocenjevanje povezanosti uporabili Spearmanov koeficient ( $\rho$ ). Korelacija med galektinom-3 je bila statistično značilna ( $p = 0,012$ ,  $\rho = 0,365$ ,  $N = 47$ ). Analizo smo nato ponovili še posebej za skupini zdravih in osteoporoznih preiskovank. Korelacija je bila statistično značilna v skupini zdravih preiskovank ( $p = 0,023$ ,  $\rho = 0,445$ ,  $N = 26$ ) medtem ko v skupini osteoporoznih preiskovank ni bila statistično značilna ( $p = 0,222$ ,  $\rho = 0,278$ ,  $N = 21$ ). Naši rezultati kažejo, da obstaja povezava med koncentracijo DKK1 in galektina-3,

kar nakazuje na morebitno vlogo zunajceličnega galektina-3 pri signaliziranju preko poti wnt/ $\beta$ -katenin in s tem na mehanizem, preko katerega bi galektin-3 lahko vplival na kostno tvorbo. Prehitro bi bilo sklepati, da igra ugotovljena povezava vlogo v patologiji OP, saj so bili rezultati statistično značilni v kontrolni skupini. Predstavljajo pa naši zaključki zanimivo izhodišče za nadaljnje raziskave, ki bi proučile vlogo zunajceličnega galektina-3 na signaliziranje preko poti wnt/ $\beta$ -katenin.

#### 4.7.4 Parathormon

Parathormon (PTH) je poleg vitamina D eden izmed ključnih hormonov, ki uravnavajo kostni metabolizem in dolgo je veljalo prepričanje, da povišana koncentracija PTH z aktivacijo osteoklastov povzroči demineralizacijo in razgradnjo kostnega matriksa. Vendar so novejša študija pokazale, da receptor za PTH izražajo osteoblasti in ne osteoklasti. PTH povzroči povečano proliferacijo in diferenciacijo osteoblastov, poleg tega pa tudi sekrecijo RANKL. RANKL se veže na receptor RANK na prekurzorjih osteoklastov, kar spodbuja osteoklastogenezo in razgradnjo kostnine. PTH torej primarno spodbuja kostno tvorbo, sekundarno pa tudi kostno razgradnjo. (5,71) Gruson in sod. (72) so ugotovili, da pri bolnikih s srčnim popuščanjem obstaja pozitivna korelacija tako med intaktnim PTH kot bioaktivnim PTH (1 – 84) in serumsko koncentracijo galektina-3, serumsko koncentracija galektina-3 je namreč eden najnovejših kazalcev v smernica ACCF/AHA za obravnavo bolnikov s srčnim popuščanjem. Zaradi pomembne vloge PTH pri OP in njegove povezave s serumsko koncentracijo galektina-3 pri bolnikih s srčnim popuščanjem, smo želeli ugotoviti, ali je povezava prisotna pri bolnikih z OP ali zdravih preiskovancih. Pri 87 preiskovancih, 47 z OP in 40 zdravih preiskovancih, je bila izmerjena koncentracija intaktnega PTH. Porazdelitev je odstopala od normalnosti, zato smo za ocenjevanje povezave uporabili neparametrični Spearmanov koeficient ( $\rho$ ). Povezava ni bila statistično značilna niti v skupini vseh preiskovancev ( $p = 0,614$ ,  $\rho = 0,055$ ,  $N = 87$ ), niti v podskupinah preiskovancev z OP ( $p = 0,153$ ,  $\rho = 0,212$ ,  $N = 47$ ) in zdravih preiskovancev ( $p = 0,222$ ,  $\rho = -0,198$ ,  $N = 40$ ).

Kljub povezavi med serumsko koncentracijo galektina-3 in intaktnim PTH pri bolnikih s srčnim popuščanjem (72), v naši skupini preiskovancev kazalca nista korelirala statistično značilno. Najverjetnejša razlaga razlike je v drugačnem patofiziološkem ozadju srčnega popuščanja in OP.

## **5 Sklep**

V naši magistrski nalogi smo želeli ugotoviti, kakšen je pomen določanja galektina-3 v serumu pri OP in OA. Predhodne raziskave so pokazale, da je koncentracija galektina-3 v plazmi višja pri preiskovankah z OA v primerjavi z zdravimi preiskovankami (45), kar ni presenetljivo, saj zunajcelični galektin-3 spodbuja katabolne procese in s tem sodeluje pri uničenju hrustanca in subhondralne kostnine (37). Glede na to, da je po indukciji OA pri miših z izbitim genom za galektin-3 kostna premena subhondralne kosti povišana v primerjavi z gensko nespremenjenimi mišmi (41), ravno spremenjena kostna premena pa je eden izmed ključnih procesov pri nastanku OP, smo želeli oceniti morebiten pomen galektina-3 pri OP. Odločili smo se, da bomo to ocenili z določanjem koncentracije galektina-3 v serumu, saj nas je predvsem zanimala uporaba galektina-3 kot biokemijskega kazalca za OP ali OA.

Najprej smo optimizirali in validirali metodo ELISA za določanje galektina-3 v serumu. Z optimizacijo naklona umeritvene krivulje smo zagotovili ustrezno analitsko občutljivost metode, ugotovili smo, da je metoda linearna v območju od 0,06 ng/ml do 4,0 ng/ml ter da je nelinearni regresijski model, pri katerem ocenjujemo štiri parametre (4PL), ustrezen matematični model za izračun umeritvene krivulje. Tudi točnost metode je ustrezna, saj je bila pridobitev pri testu pravilnosti s pridobitvijo dodatka 80,9%, s testom linearnosti redčitev pa smo ugotovili, da lahko vzorce redčimo do 1:10. Poleg tega je natančnost metode dobra, saj je bil KV znotraj serije manjši od 4,2%, med serijami pa manjši od 16,6%.

Nato smo pri ocenjevanju povezave med koncentracijo galektina-3 in antropometričnimi lastnostmi ugotovili, da je koncentracija galektina-3 statistično značilno višja pri ženskah, medtem ko je bila statistično značilna povezava z višino in težo manj izrazita in se je izničila po izračunu ITM. Nadalje smo ugotovili, da se serumska koncentracija galektina-3 ne razlikuje med preiskovanci z OP, OA ali zdravimi preiskovanci. Koncentracija galektina-3 tudi ni bila povezana z MKG ali koncentracijo 25-hidroksivitamina D niti s serumskimi kazalci kostne premene. Izjema je bila povezava s serumsko koncentracijo DKK1 v celotni skupini preiskovancev in v podskupini zdravih preiskovank, ne pa tudi v podskupini preiskovank z OP. Poleg tega je bila povezava s CTX v skupini zdravih preiskovank mejno statistično značilna.

Glede OP je to prva raziskava, ki je proučevala morebiten pomen galektina-3, tako da naših rezultatov ne moremo primerjati s predhodnimi raziskavami. Glede OA pa so naši rezultati v nasprotju s predhodnimi raziskavami, ki so pokazale višje koncentracije galektina-3 v plazmi pri preiskovankah z OA v primerjavi z zdravimi preiskovankami (45). Najverjetnejši razlog odstopanj so razlike v skupinah preiskovancev z OP, OA in zdravih preiskovancev v starosti, spolu in ITM. Možno je, da je vpliv teh razlik prikril razlike v koncentraciji galektina-3 v naši raziskavi. Poleg tega ima naša raziskava tudi nekaj splošnejših omejitev, ki jih je potrebno upoštevati pri interpretaciji zaključkov. Raziskava na primer ne vsebuje podatkov o boleznih in spremljajočih terapijah, ki ne vplivajo na kosti in presnovo mineralov, vendar bi lahko vplivale na koncentracijo galektina-3. Nadalje niso vsi preiskovanci v istih fazah bolezni in v primeru, da se koncentracija galektina-3 spreminja z napredovanjem bolezni, bi to lahko zakrilo razlike med skupinami. Na podlagi naših rezultatov smo zaključili, da določanje galektina-3 v serumu ni uporabno kot biokemijski kazalec pri OP ali OA. Če ima galektin-3 vlogo pri OP, se to ne odraža na sistemski ravni, ne moremo pa izključiti morebitnega pomena znotrajceličnega galektina-3. V tem smislu bi bilo zelo zanimivo primerjati izražanje galektina-3 v kostnem tkivu preiskovancev z OP z zdravimi preiskovanci. Statistično značilna povezava med koncentracijo galektina-3 in DKK1 predvsem nakazuje smer, v katero bi se lahko usmerile nadaljnje raziskave, saj bi bilo možno, da ima poleg znotrajceličnega tudi zunajcelični galektin-3 vlogo pri signaliziranju preko signalne poti wnt/ $\beta$ -katenin.

## **6 Literatura**

1. Bultink IEM, Lems WF: Osteoarthritis and osteoporosis: what is the overlap? *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15: 328.
2. Adami S, Bertoldo F, Brandi ML, Cepollaro C, Filipponi P, Fiore E et al.: Guidelines for the diagnosis, prevention and treatment of osteoporosis. *Reumatismo* 2009; 61: 260-284.
3. Slovenski medicinski slovar. Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2007.
4. Mercuri LG: Osteoarthritis, osteoarthrosis, and idiopathic condylar resorption. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2008; 20: 169-183.
5. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J et al.: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17. izdaja. McGraw-Hill, New York, 2008: 2158-2165, 2365-2408.
6. Dequeker J, Aerssens J, Luyten FP: Osteoarthritis and osteoporosis: clinical and research evidence of inverse relationship. *Aging Clin Exp Res* 2003; 15: 426-439.
7. Sharon N, Lis H: Lectins. V: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, New York, 2004: 535-540.
8. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T et al.: Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598.
9. Dumic J, Dabelic S, Flögel M: Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 616-635.
10. Saraswati S, Block AS, Diekman AB: Galectins and their Role in Various Biological Processes. Poglavlje v Wang B, Boons GJ: *Carbohydrate Recognition*. John Wiley & Sons, Inc. 2011: 157-180.
11. Yang RY, Hsu DK, Liu FT: Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6737-6742.
12. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim H-RC, Hogan V, Inohara H et al.: CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63: 8302-311.
13. Newlaczyl AU, Yu LG: Galectin-3 – a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett* 2011; 313: 123-128.
14. Krześlak A, Lipińska A: Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 305-328.

15. Henderson NC, Sethi T: The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009; 230: 160-171.
16. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP et al.: Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5060-5065.
17. Wang L, Friess H, Zhu Z, Frigeri L, Zimmermann A, Korc M et al.: Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2000; 80: 1233-1241.
18. Mackinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T et al.: Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 537-546.
19. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP et al.: Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 288-298.
20. Hrynchyshyn N, Jourdain P, Desnos M, Diebold B, Funck F: Galectin-3: a new biomarker for the diagnosis, analysis and prognosis of acute and chronic heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* 2013; 106: 541-546.
21. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Drazner MH et al.: 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62: e147-239.
22. O'Seaghda CM, Hwang S-J, Ho JE, Vasan RS, Levy D, Fox CS: Elevated galectin-3 precedes the development of CKD. *J Am Soc Nephrol JASN* 2013; 24: 1470-1477.
23. Frol'ová L, Smetana K Jr, Borovská D, Kitanovicová A, Klimesová K, Janatková I et al.: Detection of galectin-3 in patients with inflammatory bowel diseases: new serum marker of active forms of IBD? *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al* 2009; 58: 503-512.
24. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, Scherer MN et al.: Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1404-1411.
25. Özden MG, Caycı YT, Tekin H, Çoban AY, Aydın F, Sentürk N et al.: Serum galectin-3 levels in patients with Behçet's disease: association with disease activity over a long-term follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* 2011; 25: 1168-1173.

26. Wanninger J, Weigert J, Wiest R, Bauer S, Karrasch T, Farkas S et al.: Systemic and hepatic vein galectin-3 are increased in patients with alcoholic liver cirrhosis and negatively correlate with liver function. *Cytokine* 2011; 55: 435-440.
27. Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Klinzing S et al.: Galectin-3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2788-2795.
28. Ezzat MHM, El-Gammasy TMA, Shaheen KYA, Osman AOY: Elevated production of galectin-3 is correlated with juvenile idiopathic arthritis disease activity, severity, and progression. *Int J Rheum Dis* 2011; 14: 345-352.
29. Balan V, Wang Y, Nangia-Makker P, Kho D, Bajaj M, Smith D et al.: Galectin-3: a possible complementary marker to the PSA blood test. *Oncotarget* 2013; 4: 542-549.
30. Yu LG: Circulating galectin-3 in the bloodstream: An emerging promoter of cancer metastasis. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2: 177-180.
31. Colnot C, Sidhu SS, Poirier F, Balmain N: Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999; 45: 1191-1202.
32. Niida S, Amizuka N, Hara F, Ozawa H, Kodama H: Expression of Mac-2 antigen in the preosteoclast and osteoclast identified in the op/op mouse injected with macrophage colony-stimulating factor. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1994; 9: 873-881.
33. Higuchi Y, Ito M, Tajima M, Higuchi S, Miyamoto N, Nishio M et al.: Gene expression during osteoclast-like cell formation induced by antifusion regulatory protein-1/CD98/4F2 monoclonal antibodies (MAbs): c-src is selectively induced by anti-FRP-1 MAb. *Bone* 1999; 25: 17-24.
34. Li Y-J, Kukita A, Teramachi J, Nagata K, Wu Z, Akamine A et al.: A possible suppressive role of galectin-3 in upregulated osteoclastogenesis accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2009; 89: 26-37.
35. Aubin JE, Gupta AK, Bhargava U, Turksen K: Expression and regulation of galectin 3 in rat osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 1996; 169: 468-480.
36. Stock M, Schäfer H, Stricker S, Gross G, Mundlos S, Otto F: Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. *J Biol Chem* 2003; 278: 17360-17367.
37. Janelle-Montcalm A, Boileau C, Poirier F, Pelletier JP, Guevremont M, Duval N et al.: Extracellular localization of galectin-3 has a deleterious role in joint tissues. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R20.

38. Mercer N, Ahmed H, McCarthy AD, Etcheverry SB, Vasta GR, Cortizo AM: AGE-R3/galectin-3 expression in osteoblast-like cells: regulation by AGEs. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 17-24.
39. Mercer N, Ahmed H, Etcheverry SB, Vasta GR, Cortizo AM: Regulation of advanced glycation end product (AGE) receptors and apoptosis by AGEs in osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem* 2007; 306: 87-94.
40. Colnot C, Sidhu SS, Balmain N, Poirier F: Uncoupling of chondrocyte death and vascular invasion in mouse galectin 3 null mutant bones. *Dev Biol* 2001; 229: 203-214.
41. Boileau C, Poirier F, Pelletier JP, Guévremont M, Duval N, Martel-Pelletier J et al.: Intracellular localisation of galectin-3 has a protective role in chondrocyte survival. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 175-181.
42. Guévremont M, Martel-Pelletier J, Boileau C, Liu FT, Richard M, Fernandes JC et al.: Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes: a potential substrate for collagenase-3. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 636-643.
43. Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: Galectin-3 in osteoarthritis: when the fountain of youth doesn't deliver its promises. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 595-598.
44. Forsman H, Islander U, Andréasson E, Andersson A, Onnheim K, Karlström A et al.: Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 445-454.
45. Alturfan AA, Eralp L, Emekli N: Investigation of inflammatory and hemostatic parameters in female patients undergoing total knee arthroplasty surgery. *Inflammation* 2008; 31: 414-421.
46. Toegel S, Bieder D, André S, Altmann F, Walzer SM, Kaltner H et al.: Glycophenotyping of osteoarthritic cartilage and chondrocytes by RT-qPCR, mass spectrometry, histochemistry with plant/human lectins and lectin localization with a glycoprotein. *Arthritis Res Ther* 2013; 15: R147.
47. Kim KS, Kim GS, Hwang JY, Lee HJ, Park MH, Kim K et al.: Single nucleotide polymorphisms in bone turnover-related genes in Koreans: ethnic differences in linkage disequilibrium and haplotype. *BMC Med Genet* 2007; 8: 70.
48. Gaze DC, Prante C, Dreier J, Knabbe C, Collet C, Launay J-M et al.: Analytical evaluation of the automated galectin-3 assay on the Abbott ARCHITECT immunoassay instruments. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC* 2014; 1-8.

49. Crowther J: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). V: Walker JM, Rapley R: Molecular Biomethods Handbook. Springer, Totowa, New Jersey, 2008: 657-682.
50. Linnet K, Boyd JC: Selection and Analytical Evaluation of Methods – With Statistical Techniques. V: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Tietz NW: Tietz fundamentals of clinical chemistry. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2008: 201-228.
51. R&D Systems, Inc. ELISA Development Guide: a guide for the use of antibodies in ELISA development. <http://www.rndsystems.com/resources/images/5670.pdf> (18. september 2013).
52. Wild D: Šesto poglavje: Concepts. V: The Immunoassay Handbook. Elsevier, Amsterdam, Boston, 2005: 103-135.
53. Quansys Biosciences. An Explanation of Recovery and Linearity. <http://www.quansysbio.com/recovery-and-linearity> (20. september 2013).
54. Thermo Scientific. Tech Tip #58: Spike-and-recovery and linearity-of-dilution assessment. <http://www.piercenet.com/files/TR0058-Spike-and-Recovery.pdf> (19. september 2013).
55. PerkinElmer. Linearity and spike-and-recovery experiments. [http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/TCH\\_AlphaLISA\\_Linearity\\_Spike.pdf](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/TCH_AlphaLISA_Linearity_Spike.pdf) (20. september 2013).
56. R&D Systems, Inc. human Galectin-3 DuoSet ELISA Development System, DY1154. <http://www.rndsystems.com/pdf/DY1154.pdf> (2. oktober 2013).
57. GraphPad Software, Inc. GraphPad Curve Fitting Guide. <http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/> (2. oktober 2013).
58. BG Medicine, Inc. 510(k) Summary for BGM Galectin-3™. [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf9/K093758.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf9/K093758.pdf) (2. oktober 2013).
59. BG Medicine, Inc. BGM Galectin-3® (Galectin-3 Assay). <http://www.galectin-3.com/wp-content/uploads/2012/12/LAB-IVD-001-R13-BGM-Gal3-PI-US-Version.pdf> (23. september 2013).
60. De Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT, Muller Kobold AC, van Gilst WH, Hillege HL et al.: The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med* 2012; 272: 55-64.
61. Field A: Discovering Statistics using IBM SPSS Statistics. SAGE 2013
62. Miller GA, Chapman JP: Misunderstanding analysis of covariance. *J Abnorm Psychol* 2001; 110: 40-48.

63. Stewart A, Black AJ: Bone mineral density in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 464-467.
64. Christodoulou S, Goula T, Ververidis A, Drosos G: Vitamin D and bone disease. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 396541.
65. Kwan Tat S, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J: Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010; 24: 51-70.
66. Lee J, Vasikaran S: Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med* 2012; 32: 105-112.
67. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A et al.: Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 2011; 22: 391-420.
68. Raisz LG: Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005; 115: 3318-3325.
69. Daoussis D, Andonopoulos AP: The emerging role of Dickkopf-1 in bone biology: is it the main switch controlling bone and joint remodeling? *Semin Arthritis Rheum* 2011; 41: 170-177.
70. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V et al.: Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res* 2005; 65: 3535-3537.
71. Baron R, Hesse E: Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 311-325.
72. Gruson D, Lepoutre T, Ahn SA, Ketelslegers JM, Rousseau MF: Comparison between intact and bioactive parathyroid hormone assays in patients with severe heart failure. *Clin Biochem* 2013; 46: 391-394.

## Priloga

Vzorec	Diagnoza	Spol	Starost (leta)	Višina (cm)	Teža (kg)	ITM (kg/m <sup>2</sup> )	galektin-3 (ng/ml)	MKG ledvenega dela hrbtenice (g/cm <sup>2</sup> )	MKG kolka (g/cm <sup>2</sup> )	MKG vratu stegenice (g/cm <sup>2</sup> )	25-hidroksi vitamin D (nmol/l)	CTX (pmol/l)	OPG (pmol/l)	RANKL (pmol/l)	DKK1 (pmol/l)	intaktni PTH (ng/l)
VR8	OA	M	77	180	97	29,9	1,74									
VR7	OA	M	92	173	85	28,4	1,77									
VR6	OA	F	70	160	75	29,3	2,49									
VR26	OA	F	46				5,05									
VR25	OA	F	51	160	67	26,2	1,32									
VR23	OA	F	61	164	95	35,3	3,30									
VR21	OA	M	63				3,95									
VR20	OA	F	52				2,76									
VR2	OA	M	67	180	135	41,7	2,07									
VR19	OA	F	43				2,40									
VR18	OA	F	84				4,21									
VR17	OA	F	86	162	85	32,4	1,61									
VR15	OA	M	54	190	87	24,1	1,99									
VR14	OA	F	47	162	78	29,7	5,35									
VR10	OA	M	58	180	94	29,0	3,74									
VR1	OA	F	88	154	63	26,6	1,24									
s97	OA	M	72	156	80	32,9	2,09	1,207	1,064	0,949						
92	OP	F	85	168	88	31,2	4,04	1,118			42					40
80	OP	M	68	180	80	24,7	3,77	0,847	0,712	0,695						
74	OP	F	77	162	80	30,5	2,00	1,028	0,880	0,763	46					62
s73	OA	F	72	173	92	30,7	1,38	1,130	0,950	0,738						
s67	OA	F	66	155	72	30,0	2,42	0,755	0,763	0,734						

Vzorec	Diagnoza	Spol	Starost (leta)	Višina (cm)	Teža (kg)	ITM (kg/m <sup>2</sup> )	galektin-3 (ng/ml)	MKG ledvenega dela hrbtenice (g/cm <sup>2</sup> )	MKG kolka (g/cm <sup>2</sup> )	MKG vratu stegenice (g/cm <sup>2</sup> )	25-hidroksi vitamin D (nmol/l)	CTX (pmol/l)	OPG (pmol/l)	RANKL (pmol/l)	DKK1 (pmol/l)	intaktni PTH (ng/l)
67	OP	M	72	197	100	25,8	2,33	1,318	0,967	0,789	50					20
65	OP	F	88	160	56	21,9	2,50				71					67
62	OP	F	87	155	50	20,8	5,30	0,757	0,493	0,421	46					131
55	OP	F	83	153	57	24,3	3,06	0,780	0,548	0,462	33					59
54	OP	F	76	158	58	23,2	1,30	0,600	0,702	0,651	45					74
51	OP	F	76	155	83	34,5	2,78	0,946			46					58
50	OP	F	77	160	80	31,2	2,14	0,803	0,565	0,664	48					85
49	OP	F	79	150	60	26,9	3,74				49					108
45	OP	F	81	160	70	27,3	2,27	0,750	0,671	0,603	27					49
340	OA	F	67	169	90	31,5	5,93	0,768	0,931	0,669	10					
339	OA	M	76	173	85	28,4	3,91	0,937	0,979	0,911	54					
336	OA	M	64	168	82	29,1	2,42	1,305	1,042	1,030	42					
335	OA	F	87	156	80	32,9	3,68	1,240	0,721	0,761	12					
333	OA	F	81	168	82	29,1	2,16	1,239	0,869	0,828	13					
332	OA	M	48	167	105	37,6	1,00	1,178	1,173	0,925	31					
331	OA	M	71	172	82	27,7	0,97	1,094	0,922	0,749	30					
327	OA	F	64	165	85	31,2	3,12	0,937	0,847	0,744	10					
325	OA	M	79	169	65	22,8	2,60	0,899	0,793	0,708	30					
324	OA	M	65	170	118	40,8	1,43	1,116	1,042	0,916	16					
323	OA	M	74	183	92	27,5	2,05	1,136			37					
320	OA	M	67	168	80	28,3	2,07	1,306	1,121	0,875	48					
315	OA	M	77	180	80	24,7	1,58	1,401	1,314	1,102	68					
313	OA	F	65	167	65	23,3	6,12	1,034	1,005	0,935	43					
312	OA	F	74	160	68	26,6	3,01	1,161	0,909	0,707	28					

Vzorec	Diagnoza	Spol	Starost (leta)	Višina (cm)	Teža (kg)	ITM (kg/m <sup>2</sup> )	galektin-3 (ng/ml)	MKG ledvenega dela hrbtenice (g/cm <sup>2</sup> )	MKG kolka (g/cm <sup>2</sup> )	MKG vratu stegenice (g/cm <sup>2</sup> )	25-hidroksi vitamin D (nmol/l)	CTX (pmol/l)	OPG (pmol/l)	RANKL (pmol/l)	DKK1 (pmol/l)	intaktni PTH (ng/l)
311	OA	M	72	180	90	27,8	2,11	1,133			14					
309	OA	M	55	166	84	30,5	1,82	1,032	1,153	1,158	23					
308	OA	F	53	163	68	25,6	2,60	0,899	0,945	0,800						
306	OA	F	83	165	90	33,1	0,98	0,764	0,749	0,718	10					
305	OA	M	69	165	100	36,7	2,82	0,889			23					
304	OA	F	77	159	70	27,7	4,20	0,793	0,758	0,639	12					
302	OA	M	74	158	84	33,6	3,12	1,329	1,255	1,179	42					
301	OA	F	65	167	90	32,3	2,36	1,258			25					
186	OP	F	88	160	56	21,9	4,39	0,779	0,469	0,401	100		7,73			31
179	OP	F	85	160	56	21,9	4,20	0,785	0,402	0,386	15		11,29			188
174	OP	F	72	160	90	35,2	4,61	1,004	0,959	0,749	37					56
171	OP	F	71	160	60	23,4	3,84	0,905	0,728	0,638	10					75
170	OP	F	76	161	88	33,9	4,84	1,461	0,941	0,798	10		6,78			44
156	OP	F	77	158	58	23,2	2,97				13					65
140	OP	F	70	160	65	25,4	0,95				35					25
136	OP	M	77	176	70	22,6	2,36	0,903	0,500	0,490	16					40
133	OP	M	72	183	83	24,8	1,63	0,885	0,974	0,740	19					65
128	OP	M	79	170	57	19,7	3,58				24					139
1107	OP	F	77	161	77	29,7	2,94	0,677	0,669	0,505	48	5792				62
1102	OP	F	70	154	66	27,8	3,62	0,755	0,747	0,636	37	4829				67
1100	OP	F	71	159	49	19,4	0,95	0,680	0,595	0,566	10	4912				23
1098	OP	F	55	157	65	26,4	4,02	0,730	0,770	0,636	100	6339	5,00	0,09	0,18	19
1094	N	F	64	158	64	25,6	3,20	0,868	0,851	0,659			6,34	0,87	0,11	
1093	N	F	65	155	89	37,0	2,01	0,844	1,037	0,729	17	4124	6,14	0,00	0,04	34

Vzorec	Diagnoza	Spol	Starost (leta)	Višina (cm)	Teža (kg)	ITM (kg/m <sup>2</sup> )	galektin-3 (ng/ml)	MKG ledvenega dela hrbtenice (g/cm <sup>2</sup> )	MKG kolka (g/cm <sup>2</sup> )	MKG vratu stegenice (g/cm <sup>2</sup> )	25-hidroksi vitamin D (nmol/l)	CTX (pmol/l)	OPG (pmol/l)	RANKL (pmol/l)	DKK1 (pmol/l)	intaktni PTH (ng/l)
1092	N	F	71	159	88	34,8	4,72	0,867	1,051	0,844	30	1647	6,10	0,16	0,17	34
1091	N	F	74	150	67	29,8	2,08	1,099	0,836	0,653	41	3476	8,31	0,08	0,07	60
1090	OP	F	69	156	78	32,1	1,94	0,689	0,884	0,681	54	1924	5,42	0,00	0,06	45
1089	N	F	58	162	68	25,9	2,75	0,874	0,762	0,641	46	3486	6,73	0,15	0,00	18
1087	N	F	54	166	68	24,7	1,56	0,833	0,849	0,689	48	5310	5,82	1,07	0,00	51
1085	N	F	55	162	91	34,7	3,25	1,057	1,116	0,913	29	3440	5,58	0,00	0,05	72
1083	N	F	71	152	54	23,4	3,85	0,936	0,908	0,747	34	1829	5,38	0,18	0,03	20
1082	OP	F	65	157	60	24,3	1,89	0,714	0,663	0,524	34	4181	6,41	0,00	0,05	39
1081	N	F	67	160	82	32,0	3,31	0,898	0,810	0,659	46	4449	6,40	0,87	0,00	18
1078	N	F	59	176	77	24,9	3,16	1,042	1,030	0,812	39	4591	6,32	0,22	0,26	33
1077	OP	F	57	166	57	20,7	1,32	0,756	0,665	0,577	40	4701				47
1075	N	F	64	156	69	28,4	5,31	0,836	0,879	0,650	50	3563	4,16	0,66	0,05	27
1074	N	F	63	162	64	24,4	3,62	0,993	0,925	0,719	38	2474	4,80	0,00	0,05	53
1072	N	F	65	154	50	21,1	3,20	0,776	0,807	0,576	12	3300	6,98	0,44	0,03	59
1071	N	F	51	166	70	25,4	5,12	1,211	1,033	0,890	36	3061	7,01	1,23	0,32	31
1069	N	F	60	161	95	36,6	2,20	1,010	1,096	0,926	32	1332	5,57	0,00	0,02	23
1068	N	F	57	155	90	37,5	2,49	0,980	1,097	0,829	51	6136	5,83	0,20	0,02	36
1064	N	F	62	159	49	19,4	3,51	0,795	0,800	0,658	29	2489	4,89	0,14	0,03	18
1063	N	F	63	149	53	23,9	1,32	0,919	0,927	0,677	17	2081				22
1061	OP	F	64	170	68	23,5	2,06	0,637	0,721	0,570	67	4293	6,48	0,10	0,48	25
1060	OP	F	57	159	70	27,7	1,68	0,766	0,984	0,770	39	2247	5,50	0,00	0,00	16
1059	OP	F	69	162	57	21,7	2,86	0,762	0,721	0,653	49	6123	7,45	1,26	0,19	33
1057	OP	F	73	157	88	35,7	2,27	0,769	1,005	0,723	27	2173	8,31	0,29	0,00	60
1054	OP	F	65	173	63	21,0	2,84	0,661	0,680	0,639	72	4225	6,77	0,00	0,08	41

Vzorec	Diagnoza	Spol	Starost (leta)	Višina (cm)	Teža (kg)	ITM (kg/m <sup>2</sup> )	galektin-3 (ng/ml)	MKG ledvenega dela hrbtenice (g/cm <sup>2</sup> )	MKG kolka (g/cm <sup>2</sup> )	MKG vratu stegenice (g/cm <sup>2</sup> )	25-hidroksi vitamin D (nmol/l)	CTX (pmol/l)	OPG (pmol/l)	RANKL (pmol/l)	DKK1 (pmol/l)	intaktni PTH (ng/l)
1053	N	F	59	159	83	32,8	2,02	0,975	0,863	0,757	47	4200	6,25	0,23	0,02	37
1052	N	F	59	157	81	32,9	2,67	0,857	0,960	0,833	30	7218	6,18	0,43	0,02	48
1051	OP	F	56	158	57	22,8	3,23	0,723	0,716	0,591	41	2072	5,83	0,00	0,04	23
1049	N	F	58	166	81	29,4	4,39	0,916	0,943	0,772	70	2361	7,40	0,00	0,11	40
1048	N	F	59	157	55	22,3	2,51	1,049	0,882	0,737	36	2157				30
1045	N	F	57	168	71	25,2	3,83	0,850	0,890	0,745	25	3986	7,60	0,00	0,00	69
1043	N	F	62	154	70	29,5	2,93	0,907	0,787	0,640	75	2415	5,35	0,44	0,01	18
1042	N	F	73	158	98	39,3	3,20	0,771	0,735	0,697	17	5268	10,09	0,52	0,00	103
1041	N	F	62	164	81	30,1	3,58	1,032	0,996	0,880	42	593	6,80	0,00	0,00	20
1038	OP	F	51	170	60	20,8	2,91	0,740	0,772	0,659	44	4109	5,03	0,14	0,11	22
1036	N	F	66	160	71	27,7	4,32	0,801	0,869	0,748	15	5147	6,50	0,08	0,32	72
1035	OP	F	71	157	66	26,8	4,10	0,457	0,690	0,527	22	6806	5,63	0,13	0,13	58
1034	OP	F	73	143	55	26,9	3,87	0,643	0,724	0,524	23	1555	5,68	0,00	0,15	29
1033	OP	F	49	149	63	28,4	4,71	0,764	0,763	0,646	40	3697	6,70	1,12		24
1032	OP	F	71	145	78	37,1	4,79	0,667	0,801	0,572	18	2861	8,22	0,17	0,13	91
1031	OP	F	66	154	46	19,4	5,93	0,639	0,794	0,635	43	5769	8,10	0,00	0,05	26
1028	OP	F	51	160	71	27,7	2,15	0,689	0,805	0,760	8	1650	1,81	0,06	0,00	23
1027	N	F	55	169	91	31,9	2,83	1,286	1,176	1,049	11	2638				45
1026	N	F	61	162	64	24,4	1,74	0,961	0,782	0,665	54	3516				42
1025	N	F	63	159	93	36,8	1,95	1,056	0,911	0,747	21	4405				76
1024	N	F	57	163	72	27,1	4,16	1,021	1,012	0,816	13	3226				27
1023	N	F	59	163	78	29,4	1,03	0,922	0,892	0,691	25	3685				59
1022	N	F	58	163	84	31,6	2,60	0,856	0,939	0,704	38	3200				48
1021	N	F	67	171	64	21,9	1,04	0,926	1,003	0,879	76	4252	4,37	0,88	0,00	14

Vzorec	Diagnoza	Spol	Starost (leta)	Višina (cm)	Teža (kg)	ITM (kg/m <sup>2</sup> )	galektin-3 (ng/ml)	MKG ledvenega dela hrbtenice (g/cm <sup>2</sup> )	MKG kolka (g/cm <sup>2</sup> )	MKG vratu stegenice (g/cm <sup>2</sup> )	25-hidroksi vitamin D (nmol/l)	CTX (pmol/l)	OPG (pmol/l)	RANKL (pmol/l)	DKK1 (pmol/l)	intaktni PTH (ng/l)
1020	N	F	68	166	58	21,0	3,58	0,961	0,731	0,658	56	3503				31
1019	N	F	62	164	68	25,3	2,59	1,040	0,964	0,813	3	2692				42
1018	N	F	65	153	53	22,6	1,20	0,845	0,866	0,718	19	6476				56
1016	N	F	56	172	85	28,7	2,31	0,914	0,916	0,816	30	2460				44
1015	N	F	61	161	68	26,2	2,31	0,826	0,770	0,715	3	2488				59
1014	N	F	58	154	59	24,9	4,88	0,862	0,865	0,694	78	1633				19
1013	N	F	57	161	61	23,5	3,50	0,902	0,934	0,781	40	1890				34
1010	OP	F	63	167	61	21,9	3,64	0,763	0,797	0,652	51	3707	7,94	0,00	0,03	32
1009	OP	F	57	163	66	24,8	1,13	0,769	0,821	0,659	54	2659	8,81	0,00	0,00	26
1007	OP	F	73	151	58	25,4	4,11	0,748	0,757	0,625	14		6,73	0,00	0,01	45
1004	OP	F	58	162	57	21,7	1,36	0,749	0,738	0,569	43		6,78	0,93	0,00	41
1003	OP	F	69	151	58	25,4	3,82	0,681	0,845	0,667	27		6,59	0,07	0,00	42
1002	OP	F	55	170	58	20,1	4,65	0,628	0,735	0,621	34		8,22	0,47	0,00	102

### Legenda

Diagnoza: N – zdrav preiskovanec, OP – osteoporoza, OA – osteoartroza

Spol: F – ženska, M – moški

ITM: indeks telesne mase

MKG: mineralna kostna gostota

CTX: C-terminalni telopeptid kolagena tipa I

OPG: osteoprotegerin

RANKL: ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB

DKK1: dickkopf 1

PTH: parathormon