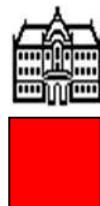


UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA



MANJA CEDILNIK

**VPLIV SISTEMA RANKL/RANK/OPG NA KOSTNO RESORPCIJO PRI
ŽIVALSKEM MODELU SLADKORNE BOLEZNI TIPA 2**

**INFLUENCE OF RANKL/RANK/OPG SYSTEM ON BONE RESORPTION IN
ANIMAL MODEL OF DIABETES TYPE 2**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Janji Marc in somentorici izr. prof. dr. Martini Drevenšek, za vso njuno pomoč pri dokončanju naloge; obema članoma komisije, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in izr. prof. dr. Tomažu Vovku za hitro popravo naloge; Alji Meh, dr. dent. med., katera je priskrbela vzorce podgan, mi svetovala pri komentarjih rezultatov ter pregledala nalogo in mi s svojimi predlogi pomagala pri pisanju razprave, najlepša hvala za vse; svoji delovni mentorici in sodelavki asist. dr. Janji Zupan za vse njene nasvete ter vodenje med praktično izvedbo naloge.

Še posebno se zahvaljujem moji mami, ki me je ves čas študija vzpodbjala in mi stala ob strani; prijateljici in sodelavki Petri Ferkov (s katero sva skupaj »gulili« šolske klopi), za njeno prijateljstvo ter spodbudo tekom študija in vsakodnevno dobro voljo v službi; sodelavki Simoni Mencej Bedrač za pomoč pri statistični obdelavi naloge, za vse njene praktične nasvete o izdelavi predstavitve, spodbujanju k dokončanju naloge in ker vedno najde prijazne besede, ko jih najbolj potrebujem; Bošjanu, ker me je spodbudil k vpisu na magistrski študij in bil vedno moj dober prijatelj...; ter vsem ostalim sodelavcem katedre, za dobro vzdušje v službi...

IZJAVA

Magistrsko naložko sem izdelala samostojno na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za Farmacijo, Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, spec. med. biokem. in somentorstvom izr. prof. dr. Martine Drevenšek, dr. dent. med.

Ljubljana, junij 2015

Manja Cedilnik

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Član komisije: izr. prof.. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

KAZALO

1. UVOD.....	1
1.1. SLADKORNA BOLEZEN.....	1
1.2. ŽIVALSKI MODELI V RAZISKAVAH SB2.....	2
1.3. KOSTNA REMODELACIJA IN SB2	4
1.3.1. Proces normalne kostne remodelacije pri ljudeh.....	4
1.3.2. Uravnavanje kostne resorpcije s sistemom RANKL/RANK/OPG.....	6
1.3.3. Živalski model pospešene kostne remodelacije.....	8
1.3.3.1. Ortodontski premik zoba (OPZ) kot model za kostno resorpcijo – mehanizem kostne remodelacije pri premiku zoba.....	8
1.3.4. Vpliv SB2 na kostno remodelacijo.....	10
2. NAMEN DELA.....	12
3. MATERIALI IN METODE.....	13
3.1. PREISKOVANA SKUPINA/ŽIVALSKI MODEL SB2.....	13
3.2. KOSTNI VZORCI IN ROKOVANJE Z NJIMI DO IZOLACIJE.....	15
3.3. IZOLACIJA CELOKUPNE RNA.....	17
3.4. OCENA IZOLIRANE CELOKUPNE RNA.....	19
3.4.1. Merjenje koncentracije celokupne RNA.....	20
3.4.2. Preverjanje razgrajenosti izolirane celokupne RNA na čipu.....	21
3.5. POLIMERAZNA VERIŽNA REAKCIJA Z REVERZNO TRANSKRIPCIJO (RT-PCR).....	23
3.6. IZBOR REFERENČNEGA GENA.....	26
3.7. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV ZA RANKL, RANK, OPG in GAPDH.....	26
3.7.1. Kvantitativni PCR v realnem času/verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR).....	26
3.7.2. Merjenje izražanja genov za RANKL, OPG in GAPDH (qPCR z uporabo hidrolizirajočih TaqMan sond).....	27
3.7.3 Merjenje izražanja genov za RANK in GAPDH (qPCR z uporabo	

oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila EvaGreen).....	30
3.7.4. Statistična analiza.....	35
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	36
4.1. IZOLACIJA RNA IZ KOSTNIH VZORCEV IN NJENO VREDNOTENJE.....	36
4.2. PREPISOVANJE IN PRIPRAVA VZORCEV ZA MERJENJE GENETSKEGA IZRAŽANJA.....	40
4.3. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV RANKL, RANK IN OPG V KOSTNEM TKIVU.....	41
4.3.1. Rezultati preverjanja sond RANKL in OPG ter optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za RANK in GAPDH.....	42
4.4. OCENA VPLIVA SB2 NA IZRAŽANJE GENOV SISTEMA RANKL/RANK/OPG.....	45
5. SKLEP.....	54
6. LITERATURA.....	55
7. PRILOGA.....	59

POVZETEK

Trdnost in integriteta človeškega okostja je odvisna od občutljivega ravnovesja med kostno resorpcijo s strani osteoklastov in nastanka nove kosti s strani osteoblastov. Ravnotežje je kontinuirano porušeno zaradi različnih genetskih, humoralnih in mehanskih sprememb. Molekularni mehanizem, ki regulira tvorbo in aktivnost osteoklastov, je signalni sistem RANKL/RANK/OPG, ki igra pomembno vlogo v regulaciji metabolizma kosti preko regulacije kostne remodelacije, z regulacijo kostne razgradnje in formacije nove kosti. Eden izmed modelov, s katerim lahko preučujemo resorpcijo in izgradnjo kosti, je model ortodontskega premika zoba na živalskem modelu, ki dobro posnema mehanizem (pospešene) kostne remodelacije. Namen naše magistrske naloge je bil ugotoviti, kakšen vpliv ima sistem RANKL/RANK/OPG na kostno resorpcijo pri prisotni sladkorni bolezni tipa 2. Uporabili smo živalski model podgane s sladkorno boleznijo tipa 2 (Goto-Kakizaki podgane) z vstavljenim zobnim aparatom oziroma vzmetjo, ki je omogočal pospešeno kostno remodelacijo. Kontrolna skupina so bile podgane brez sladkorne bolezni tipa 2 (Wistar podgane). V vzorcih čeljustnic podgan z in brez prisotne sladkorne bolezni tipa 2 ter z vstavljeni in brez vstavljeni vzmeti oz. aparatom, smo izmerili izražanje genov za RANKL, RANK in OPG. Poskušali smo ugotoviti, ali je izražanje teh genov spremenjeno, saj bi na ta način dokazali vpliv najpomembnejšega regulatornega sistema kostne razgradnje, na kostne zaplete pri sladkorni bolezni tipa 2. V preiskavo smo vključili 45 podganjih samcev, ki smo jih razdelili v štiri skupine – živali s prisotno sladkorno boleznijo tipa 2 Goto-Kakizaki podgane brez nameščene vzmeti ($n = 8$) in z vzmetjo ($n = 13$) ter živali brez prisotne sladkorne bolezni tipa 2 Wistar podgane brez vzmeti ($n = 9$) in z vzmetjo ($n = 15$). Za normalizacijo izražanja preiskovanih genov smo uporabili referenčni gen za GAPDH. Z namenom ugotoviti, ali sladkorna bolezen tipa 2 vpliva na proces kostne remodelacije, smo dobljene rezultate statistično ovrednotili. Rezultati naših meritev kažejo na povečano razmerje izraženih genov RANKL/OPG pri sladkorni bolezni tipa 2, v primerjavi brez prisotne sladkorne bolezni tipa 2. Učinek sladkorne bolezni tipa 2 na izražanje genov je bil največji pri živalih z najdaljšo vstavitvijo aparata (0.dan $p = 0,963$; 7 dan $p = 0,035$; 42 dan $p = 0,009$; statistično značilne razlike med vzorci so bile pri vrednostih $p < 0,05$). Zaključili smo, da je v pospešeno kostno razgradnjo pri sladkorni bolezni tipa 2 vpletten regulatorni sistem RANKL/RANK/OPG.

Ključne besede: sladkorna bolezen tipa 2, kostna resorpcija, razmerje RANKL/OPG

ABSTRACT

Strength and integrity of human skeleton depends on delicate balance between bone resorption with osteoclast and bone formation with osteoblasts. Balance is continuously ruined due to a variety of genetic, humoral and mechanical changes. A molecular mechanism that regulates the formation and activity of osteoclasts is a signaling system RANKL/RANK/OPG which plays an important role in regulation of bone metabolism through the regulation of bone remodeling, with regulation of bone resorption and formation of a new bone. One of the models for studying bone resorption and formation is a model of orthodontic tooth movement on an animal model that mimics the mechanism of (accelerated) bone remodeling very well. The aim of our master thesis study was to find out what kind of influence has a RANKL/RANK/OPG system on bone resorption in the presence of type 2 diabetes. We used an animal model of rats with type 2 diabetes (Goto-Kakizaki rats) with inserted orthodontic appliance or spring, which enabled an accelerated bone remodeling. Control group were rats without type 2 diabetes (Wistar rats). In bone samples of rats with or without the presence of type 2 diabetes, and with or without inserted spring as well, we measured the gene expression for RANKL, RANK and OPG. We tried to determine whether the expression of these genes is changed, because in this way we could prove the influence of the most important regulatory system of bone degradation on bone complications in type 2 diabetes. In the study were included 45 male rats, which we devided into four groups – animals with type 2 diabetes Goto-Kakizaki rats without inserted tooth spring ($n = 8$) and with inserted tooth spring ($n = 13$), and animals without the presence of type 2 diabetes Wistar rats without inserted tooth spring ($n = 9$) and with inserted tooth spring ($n = 15$). For normalization of expressed genes we used a reference gene for GAPDH. In order to determine whether type 2 diabetes has an influence on bone remodelation, we statistically evaluated obtained results. The results of our measurements indicate an increased ratio of the RANKL/OPG expressed genes in the presence of type 2 diabetes compared with no presence of type 2 diabetes. The influence of type 2 diabetes on gene expression was highest in animals with the longest insertion of tooth spring, for 42 days (0.day $p = 0.963$; 7 days $p = 0.035$; 42 days $p = 0.009$; statistically characteristic difference between the samples were at levels $p < 0.05$). Our conclusion is that the regulatory system RANKL/RANK/OPG is involved in the accelerated bone degradation in the presence of type 2 diabetes.

Key words: diabetes type 2, bone resorption, RANKL/OPG ratio

SEZNAM OKRAJŠAV

cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (ang. complementary deoxyribonucleic acid)
cN	merska enota za silo (centiNewton)
Cq	kvantifikacijski cikel (ang. quantification cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
FU	fluorescencija
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
gDNA	genomska DNA
GK	Goto-Kakizaki podgane (s sladkorno boleznijo tipa 2)
g ×	gravitacijski pospešek
IL	interlevkin
MKG	mineralna kostna gostota
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
NTC	negativna kontrola (ang. no template control)
OPG	osteoprotegerin
OPZ	ortodontski premik zob
PTH	paratiroidni hormon
PPAR- γ	receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov gama (ang. peroxisome proliferator activated receptor- γ)
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (receptor NF κB)
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB
RIN	vrednost integritete izolirane RNA (ang. RNA integrity number)

RNA	ribonukleinska kislina
mRNA	informacijska RNA (ang. messenger RNA)
rRNA	ribosomalna RNA (ang. ribosomal RNA)
rpm	obrati na minuto (ang. revolutions per minute)
RT – PCR	polimerazna verižna reakcija z reverzno transkripcijo
» – RT« vzorec	negativni RT vzorec
Σ	grška črka Sigma (znak za vsoto)
SB	sladkorna bolezen
SB1	sladkorna bolezen tipa 1
SB2	sladkorna bolezen tipa 2
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Tm	temperatura taljenja (ang. melting temperature)
TNF	dejavnik tumorske nekroze
TZD	tiazolidindioni
Ur. 1. RS	Uradni list Republike Slovenije
UV/Vis	ultravijolična/vidna svetloba
Wi	Wistar podgane (kontrolna skupina podgan za GK podgane – brez SB2)
18s in 28s rRNA	podenoti rRNA

SEZNAM SLIK

slika 1: Inzulinsko signaliziranje	1
slika 2: Živalski model glodalca (Goto-Kakizaki podgana)	4
slika 3: Shema cikla kostne remodelacije	6
slika 4: Osteoklastogeneza	7
slika 5: Shematski prikaz sil, ki delujejo na zob pri nameščenem ortodontskem aparatu/ superelastični vzmeti – prikazane so smeri sil pritiska in smeri sil vleka	9
slika 6: Vstavljen ortodontski aparat: a) shematski prikaz namestitve aparata za OPZ pri podgani; b) slika OPZ aparata pri podgani; c) prikaz namestitve OPZ aparata na zobe podgane - pogled s strani	15
slika 7: Ločba suspenzije v tri plasti po dodatku kloroformu (vodna faza, interfaza in spodnja faza)	18
slika 8: Uporaba membranskih kolon s silikatno membrano - epruvete s kolono (RNA Spin Cartridge) iz PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion®)	18
slika 9: Protokol izolacije celokupne RNA s kolono – PureLinkTM RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)	18
slika 10: Potovanje vzorca skozi mikrokanalčke in njegova elektroforetska ločba na RNA Nano čipu	21
slika 11: Prikaz nastanka fluorescence po hidrolizi sonde	27
slika 12: Shema nanosa standardov in kontrolnih vzorcev na mikrotitersko ploščico s 384 vdolbinicami (A - RANKL, B - OPG, C - GAPDH)	29
slika 13: Shema nanosa standardov in kontrolnih vzorcev na mikrotitersko ploščico s 384 vdolbinicami (A – pet standardov s koncentracijo oligo. začet. 100nM, NTC in »-RT vzorci za optimizacijo RANK«, B – standard 2 s konc. oligo. začet. 200 nM, 300 nM in 600nM , C – pet standardov s koncentracijo oligo. začet. 100 nM za optimizacijo GAPDH, D – standard 2 s koncentracijo 100 nM za GAPDH)	32
slika 14: Primer izpisa naših rezultatov aparata Bioanalyzer 2100 (različni zapisi rezultatov)	37
slika 15: RNA 6000 Nano lestvica (graf prikazuje vseh šest ločenih vrhov lestvice s koncentracijo 150 ng/µL; označene so tudi znane dolžine posameznih RNA molekul) ...	38
slika 16: Razgrajenost RNA in vrednosti RIN	39

slika 17: Primer talilne krivulje - odvisnost negativne vrednosti prvega odvoda fluorescence po temperaturi (-dF/dT) od temperature (na sliki je viden nastanek dimerov oligonukleotidnih začetnikov - zelena krivulja in se nahaja na levi strani od specifičnega produkta - rdeča krivulja; modra krivulja je NTC vzorec; Tm = 83 °C za specifični produkt)44

slika 18: Izpis na ekranu po zaključeni qPCR reakciji45

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Hormoni, citokini ter drugi dejavniki, ki vplivajo stimulativno ali zavirajoče na RANKL in OPG.....	8
Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi za prvo stopnjo prepisa RT - priprava mešanice »matrica-začetniki«.....	24
Preglednica III: Pogoji reakcije prve stopnje prepisa RT.....	24
Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za drugo stopnjo prepisa RT - priprava mešanice »RT Master mix«.....	24
Preglednica V: Pogoji reakcije druge stopnje prepisa RT.....	25
Preglednica VI: Priprava reakcijske zmesi za qPCR pri uporabi TaqMan sond za RANKL, OPG in GAPDH (Applied Biosystems).....	28
Preglednica VII: Program na aparatu LC480II za TaqMan sonde (prilagojen za $5 \times$ HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (no Rox), Solis Biodyne, Estonija).....	28
Preglednica VIII: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov RANK in GAPDH (Sigma Aldrich) za qPCR.....	30
Preglednica IX: Sestava reakcijske zmesi za optimizacijo oligonukleotidnih začetnikov za genov za RANK in GAPDH, za reakcijo qPCR.....	31
Preglednica X: Program in pogoji reakcije qPCR na aparatu LC480II (Roche) za oligonukleotidne začetnike proizvajalca Sigma (pogoji so prilagojeni za $5 \times$ HOT FirePol® EvaGreen qPCR Mix Plus (no Rox), Solis Biodyne, Estonija).....	33
Preglednica XI: Povprečne koncentracije izolirane celokupne RNA po skupinah živali.....	36
Preglednica XII: Rezultati čistote izolirane RNA (razmerje A _{260/280}) in vrednosti RIN po skupinah vzorcev.....	40
Preglednica XIII: Priprava reakcijske zmesi za qPCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov za GAPDH (koncentracija: 100 nM, Sigma Aldrich).....	43
Preglednica XIV: Priprava reakcijske zmesi za qPCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov za RANK (koncentracija: 200 nM, Sigma Aldrich).....	44
Preglednica XV: Testiranje normalnosti izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerje RANKL/OPG v kostnem tkivu čeljustnic v kontrolni skupini Wi podgan, glede na čas vstavljenega aparata – brez aparata (0D), 7 dni (7D) ali 42 dni (42D) z aparatom.....	46

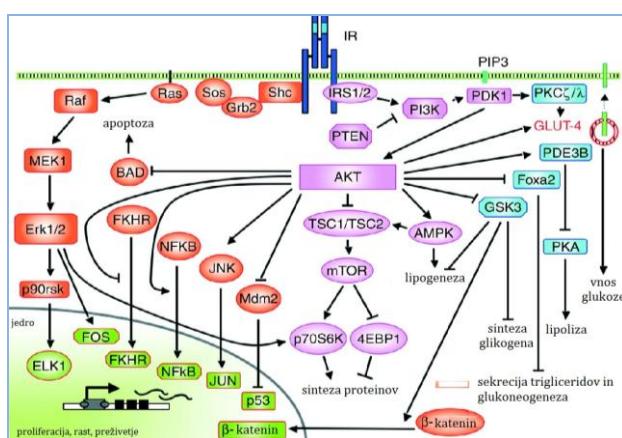
Preglednica XVI: Testiranje normalnosti izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerje RANKL/OPG v kostnem tkivu čeljustnic v skupini GK podgan, glede na čas vstavljenega aparata – brez aparata (0D), 7 dni (7D) ali 42 dni (42D) z aparatom.....	47
Preglednica XVII: Primerjava izražanja genov za RANKL, RANK in OPG v kostnem tkivu čeljustnic v kontrolni skupini Wi podgan, glede na to ali so imele živali vstavljen aparat (42D) ali ne (0D); enako primerjavo smo naredili še za GK podgane	47
Preglednica XVIII: Primerjava izražanja genov za RANKL, RANK in OPG v kostnem tkivu čeljustnic med podskupinama Wi podgan, glede na to ali so imele živali vstavljen aparat 7 dni (7D) ali 42 dni (42D); enako primerjavo smo naredili še za podskupini GK podgan	49
Preglednica XIX: Primerjava med skupinami Wi podgan (brez SB2) in GK podgan (s SB2) – podgane, ki niso imele vstavljenega aparata (0D), z vstavljenim aparatom 7 dni (7D) in 42 dni (42D)	50
Preglednica XX: Rezultati izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerje RANKL/OPG med tremi podskupinami pri Wi podganah (brez SB2), glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), aparat 7 dni (7D) in aparat 42 dni (42D)	51
Preglednica XXI: Rezultati izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerje RANKL/OPG med tremi podskupinami pri GK podganah (s SB2), glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), aparat 7 dni (7D) in aparat 42 dni (42D)	52
Preglednica XXII: Vrednosti koncentracije RNA, razmerje absorbanc (A _{260/280}) in RIN ter normalizirane vrednosti izražanja genov za RANKL, RANK in OPG.....	59

1. UVOD

1.1. SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorna bolezen (SB) je skupina bolezni, pri katerih so vrednosti glukoze v krvi zvišane nad normalo. Glede na merila, ki jih je objavila Svetovna zdravstvena organizacija (WHO -World Health Organization), opredelimo hiperglikemijo kot sladkorno bolezen, če je koncentracija glukoze v krvi na tešče (brez vnosa hrane vsaj 8 ur) 7,0 mmol/L ali več oz., če je koncentracija glukoze v krvi kadarkoli 11,0 mmol/L ali več. Zgornja meja normalne koncentracije glukoze v krvi na tešče je 6,2 mmol/L. Pri človeku poznamo štiri oblike sladkorne bolezni: sladkorno bolezen tipa 1, sladkorno bolezen tipa 2, gestacijsko sladkorno bolezen in moteno toleranco na glukozo (1). Medseboj se razlikujejo glede na vzrok, pa tudi starost bolnikov, pri kateri se bolezen pojavi.

Sladkorna bolezen tipa 2 (SB2) – je pogostejša pri starejših in zanjo je značilna zmanjšanja sposobnost ali popolno prenehanje izločanja inzulina iz beta celic trebušne slinavke, lahko pa nastane tudi zaradi zmanjšane občutljivosti organizma na inzulin oz. nastanka inzulinske rezistence pri metabolnem sindromu (1). Neodzivnost tkiv na inzulin je posledica napak v inzulinskem signaliziraju, pri katerem po vezavi inzulina na inzulinski receptor (IR), pride do avtofosforilacije znotrajceličnega dela receptorja in do aktivacije substratov IR (IRS). Slednji aktivirajo fosfoinozitol 3-kinazo (PIP3), kar povzroči kaskado celičnih reakcij (Slika 1), ki vodijo do translokacije prenašalca glukoze GLUT-4 na plazemsko membrano mišičnih, maščobnih in drugih celic, v katere vstopa glukoza s pomočjo inzulinskega signaliziranja.



Slika 1: Inzulinsko signaliziranje (2)

Pri SB2 se pogosto pojavijo pozni zapleti SB, kot so retinopatija, nefropatija, nevropatija ter makro in mikrovaskularne bolezni (npr. koronarni sindrom in možganska kap). V zadnjem času ta tip SB vedno pogosteje odkrivajo tudi pri otrokih in mladostnikih, za katere je sicer značilnejši pojav SB1 (3).

Raziskave vedno pogosteje nakazujejo povezanost SB s povečano krhkostjo kosti in povečanim tveganjem za zlome kosti, čeprav je pri bolnikih s SB2 mineralna kostna gosotota (MKG) normalna ali celo povisana, kar nekateri znanstveniki razlagajo s povisano telesno težo teh bolnikov. Kljub normalni ali povisani MKG, pa je lahko odpornost kosti na obremenitve zmanjšana in je tveganje za zlome celo povečano. Vzrok za to naj bi bile spremembe v sestavi in mikroarhitekturi kosti, ki so posledica kroničnih zapletov SB2, mehanizem sam pa še ni popolnoma pojasnjen (4). Neravnovesje med kostno resorpcijo in tvorbo nove kosti pri bolnikih s SB2 lahko vodi v izgubo MKG in posledično do krhkih kosti ter povečanega tveganja za zlome kosti že pri manjših obremenitvah. Največ do sedaj objavljenih raziskav je obravnavalo vpliv SB1 na metabolizem kosti, le redke pa so se ukvarjale z vplivom SB2 na ta isti metabolizem. Ker je še veliko neznanega glede razumevanja vpliva SB2 na dogajanje v kosteh na molekularnem in celičnem nivoju ter nezmožnosti izvedb vseh potrebnih raziskav na bolnikih, je uporaba živalskih modelov v tem namene še vedno neprecenljiva (5).

1.2. ŽIVALSKI MODELI V RAZISKAVAH SB2

Živalske modele danes še vedno uporabljamo v različnih medicinskih raziskavah, saj veliko znanstvenih in raziskovalnih poskusov ni možno izvesti neposredno na ljudeh, predvsem zaradi etičnih zadržkov. Kot živalske modele se največkrat uporablja različne glodalce (npr. miši, podgane, budre), lahko pa tudi kunce, mačke, pse in včasih druge živali. Uporaba živalskih modelov oz. poskusnih živali v eksperimentalne namene in vsak poseg na živalih mora biti odobren s strani Etične komisije za poskuse na živalih. V Sloveniji mora izvajalec poskusa, poleg dovoljenja, ki ga pridobi s strani Etične komisije za poskuse na živalih in Veterinarske uprave Republike Slovenije, pri svoji raziskavi upoštevati tudi Zakon o zaščiti živali – uradno prečiščeno besedilo (Ur. l. RS, št. 38/2013 – ZZZiv-UPB3) (6) in Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih (Ur. l. RS, št. 37/2013) (7,8).

V tej magistrski nalogi smo žeeli preučiti vpliv SB2 na kostnino. Na tržišču obstaja več različnih živalskih modelov SB2, med katerimi se največkrat uporablajo glodalci (npr. podgane in miši) (9). Razlogov, zakaj so glodalci tako priljubljeni kot živalski modeli je več, npr. kratka življenjska doba živali, nezahtevna vzreja, majhna teža in velikost živali, visoka rodnost živali in številni potomci, spontani razvoj hiperglikemije in/ali debelosti živali ter dobavljivost protiteles za celične in molekularne tehnike, prav tako pa so gensko manipulirane živali navadno glodalci (večina protiteles za molekularne tehnike je namenjenih poskusnim živalim, kot so miši in podgane). Ker so miši zelo majhne za vstavitev ortodontskega aparata, je bil za naš poskus, kot živalski model, boljša izbira podgana (10). Prednosti uporabe podgan kot živalskih modelov pred ostalimi glodalci so predvsem dostopnost živali, kar omogoča izvajanje raziskav na velikem številu vzorcev, velikost podgan, saj so večje od miši in dobavljivost oligonukleotidnih začetnikov in sond za molekularne tehnike. Slabost uporabe podgan kot živalskih modelov pa je v tem, da je dobljene rezultate oz. ugotovitve včasih težko uspešno prenesti na človeka (11, 12). Konkretna slabost pri delu s podganjem živalskim modelom in nato prenosom dobljenih rezultatov na človeka je ta, da je oblika in delovanje zob ter obzobnih tkiv pri podgani drugačna kot pri človeku (sekalci pri podganah stalno izraščajo in sočasno je stalno prisoten tudi fiziološki pomik kočnikov navzad, potrebna je tudi aplikacija manjših sil na podganje zobe zaradi manjše velikosti zob, itd). Vsi ti dejavniki lahko vplivajo na končne rezultate, zato je potrebno pri delanju zaključkov in prenosu zaključkov na človeka vsa ta dejstva tudi upoštevati. (10, 13).

Med znanstveniki velja za najboljši živalski model SB2 poligenski živalski model Goto-Kakizaki (GK) podgana. To je živalski model spontane SB2 brez prekomerne teže, katerega lahko uporabimo za preučevanje lastnosti kosti pri tej bolezni. GK vrsto podgan so »razvili« iz Wistar podgan, s selektivnim križanjem le tistih živali s povišanimi vrednosti glukoze v krvi. Za GK podgane je značilna milejša spontana oblika kronične hiperglikemije brez prisotne ketoze in debelosti živali. SB2 se pri temu živalskem modelu razvije kot odgovor na nenormalno sekrecijo inzulina in/ali rezistence tkiv na njegovo delovanje že zgodaj po skotitvi. Prav tako se razvijejo vsi kronični zapleti diabetesa, kot so nevropatija, retinopatija in nefropatija enako kot pri dolgotrajni SB2 pri človeku. (10, 14, 15).

Kot smo že omenili, ima ta živalski model SB2 podobne karakteristike bolezni, kot jih imajo bolniki s SB2. Pomembne značilnosti so, da je pri GK podganah in pri bolnikih s SB2 inzulinski odziv na glukozo znižan, prav tako je pri obeh znižana oksidacija glukoze, znižana je aktivnost GAPDH in tudi aktivnost glukokinaze, zvišano pa je razmerje proinsulin/inzulin ter lipidni profil. Pomembno dejstvo je tudi, da ima ta tip živalskega modela (GK podgane) normalno telesno težo, kar je za preučevanje presnovnih procesov kostnine pomembno, ker s tem izključimo morebitni vpliv debelosti na kosti. (15, 16).



Slika 2: Živalski model glodalca (Goto-Kakizaki podgana) (17)

1.3. KOSTNA REMODELACIJA IN SB2

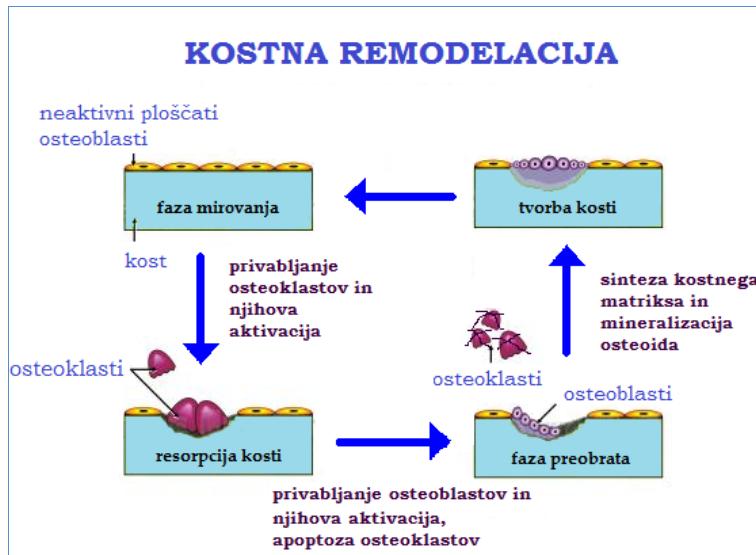
1.3.1. Proces normalne kostne remodelacije pri ljudeh

Kostna remodelacija je normalni oz. fiziološki proces, ki se v organizmu odvija stalno tekom celega življenja. Namen kostne remodelacije je ohranjanje kvalitete in celovitosti okostja, vzdrževanje homeostaze nivoja kalcija pri odraslih ter nadomeščanje poškodovanih kosti. Pri tem procesu gre za uravnovežen odnos med procesom kostne resorpcije (razgradnja kosti s strani osteoklastov) in osteogeneze oz. kostne tvorbe (izgradnja novega osteoida s strani osteoblastov). Tekom življenja se razmerje med kostno resorpcijo in tvorbo nove kosti fiziološko spreminja – pri otrocih je razmerje povečano v korist povečane tvorbe kosti zaradi rasti okostja, med 25. in 35. letom starosti je v odsotnosti bolezni razmerje uravnoveženo, po 35. letu pa se razmerje počasi nagiba v smeri povečane razgradnje kosti, posledica česar je upadanje MKG. Normalno se celotno okostje obnovi nekako v roku 10. let, kar naj bi pomenilo, da se letno zamenja približno 5-10 % kostnine (18, 19).

Sam cikel kostne remodelacije lahko razdelimo v več faz (18, 20):

1. faza: **mirovanje** – neaktivni ploščati osteoblasti v fazi mirovanja prekrivajo površino kosti
2. faza: **razgaljanje površine kosti** – ob ustreznih stimulacijah s citokini in lokalnimi hormoni se neaktivni ploščati osteoblasti na površini kosti skrčijo, razmaknejo in razgalijo površino kosti. Zaradi delovanja paratiroidnega hormona (PTH), IL-1, IL-6 in kalcitriola se na površini osteoblastov izrazi ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (RANKL).
3. faza: **aktivacija osteoklastov** – razgaljena površina kosti kemotaktično privabi osteoklaste, ki se zlijejo v večjedrine osteoklaste in se pritrdijo na kostno površino. Na izražen receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (RANK) preosteoklastov in osteoklastov, se veže RANKL. Vezava RANKL na RANK in prisotnost M-CSF (makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik), ki ga izločajo osteoblasti, omogoči diferenciacijo preosteoklastov v zrele osteoklaste in njihovo aktivacijo (21).
4. faza: **resorpcija kostnine z osteoklasti** – osteoklasti začnejo izločati vodikove ione (H^+), ki omogočijo razgradnjo mineralov v kosti ter proteolitične encime (npr. katepsin K, kolagenaze), ki razgradijo organski matriks kosti.
5. faza: **faza preobrata in privabljanje osteoblastov** – prekine se osteoklastna razgradnja kostnine, osteoklasti se odmaknejo in sledi njihova apoptoza. Nastalo Howshipovo lakuno dokončno očistijo različne makrofagne celice ter jo obložijo s cementno plastjo. Različni kemotaktični dejavniki začnejo privabljati in diferencirati osteoblaste.
6. faza: **sinteza kostnega matriksa in mineralizacija osteoida** – aktivni osteoblasti začnejo sintetizirati in izločati osteoid – novo kost. Pod vplivom osteokalcina in alkalne fosfataze se zaradi nalaganja kristalov hidroksiapatita začne mineralizacija osteoida. Del osteoblastov ujetih v kostnem matriksu se pretvori v osteocite.

Kostno remodelacijo uravnavajo številni regulatorni mehanizmi, ki vključujejo estrogene in androgene hormone, kalciotropne hormone ter nekatere lokalne dejavnike. Glavni regulatorni mehanizem, ki je odgovoren za normalno osteoblastogenezo, je sistem Wnt/B-kateninska signalna pot, medtem ko je glavni sistem za uravnavanje osteoklastogeneze in posredno kostne razgradnje, sistem RANKL/RANK/OPG (22).



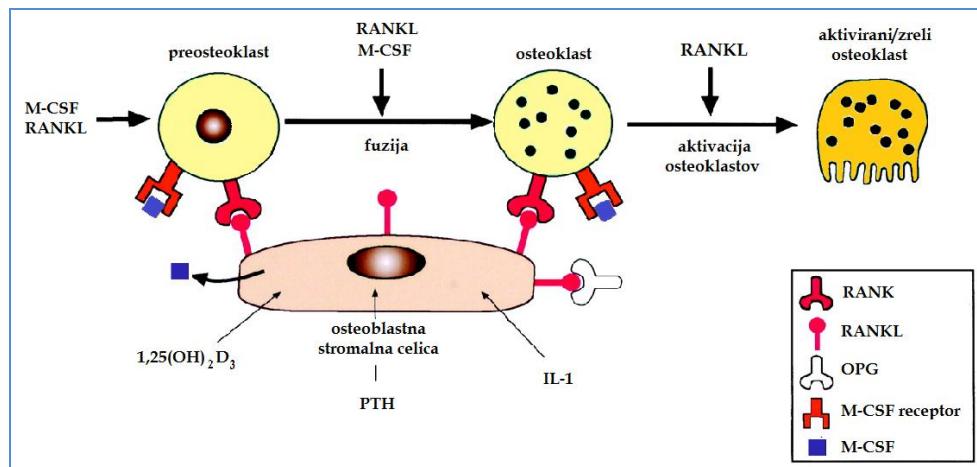
Slika 3: Shema cikla kostne remodelacije (23)

1.3.2. Uravnavanje kostne resorpcije s sistemom RANKL/RANK/OPG

Cikel kostne remodelacije poteka na različnih mestih v skeletu kot odgovor na mehanske (mikro)poškodbe in različne metabolne vplive. Za kostno remodelacijo sta ključni dve vrsti kostnih celic. To so osteoklasti, ki so vključeni v resorpcijo kosti ter osteoblasti, ki nato tvorijo novo kost. Obe vrsti celic vzdržujeta kostno homeostazo z medsebojnim vplivom ene celične vrste na drugo (19, 24).

Začetek osteoklastogeneze (nastanek večjedrnih osteoklastov s fuzijo enojedrnih preosteoklastov in njihova aktivacija) na molekularnem nivoju, sprožijo različni lokalni faktorji, ki jih izločajo celice osteoblastne vrste (preosteoblasti, zreli osteoblasti, neaktivni ploščati osteoblasti in osteociti) in citokini, ki stimulirajo nastanek osteoklastov. Citokine, ki stimulirajo osteoklaste, poleg osteoblastov lahko izločajo tudi druge vrste celic (npr. imunske celice v kostnem mozgu). Le-ti privabijo prekurzorske celice hematopoetsko monocitno-makrofagne vrste na mesto resorpcije kosti, čemur sledi njihova fuzija in pritrdiritev večjedrnih celic osteoklastov na površino kosti. Ker pa so receptorji za te in veliko drugih parakrinskih dejavnikov, ki vplivajo na resorpcijo kosti, izraženi na osteoblastnih celicah, morajo ti dejavniki delovati najprej na osteoblaste za začetek kaskadne reakcije, ki vodi do nastanka osteoklastov (25). Za začetek osteoklastogeneze morata biti nujno prisotna dva citokina - makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (M-CSF) kot preživetveni dejavnik ter RANKL kot diferenciacijski dejavnik za osteoklaste. M-CSF izločajo osteoblastne stromalne celice in je pomemben dejavnik za začetek

diferenciacije preosteoklastnih celic v zrele osteoklaste (26). Citokin RANKL pa spodbuja nastanek novih osteoklastov, pospeši delovanje zrelih osteoklastov in z vezavo na funkcionalni receptor preprečuje njihovo apoptozo. Ko se RANKL na osteoblastih veže s svojim receptorjem RANK, ki ga na svoji membrani izražajo preosteoklasti in tudi zreli osteoklasti, se sproži kaskada signalov za začetek osteoklastogeneze, katera vodi diferenciacijo preosteoklastov v zrele osteoklaste ter njihovo aktivacijo.



Slika 4: Osteoklastogeneza (27)

Osteoblasti poleg RANKL-a (izraženega na membrani ali v topni obliki) izločajo tudi citokinski receptor v topni obliki, imenovan osteoprotegerin (OPG). Skupaj z RANK receptorjem, izraženim na celicah osteoklastne vrste, tekmuje za vezavo z RANKL. Po uspešni vezavi OPG na RANKL oz. s preprečitvijo vezave RANKL na RANK, OPG inhibira osteoklastogenezo (prepreči nastanek novih osteoklastov in njihovo končno diferenciacijo do zrelih osteoklastov, prepreči aktivacijo osteoklastov in inducira apoptozo osteoklastov), posledica česar je inhibirana kostna resorpcija (22).

Kostna resorpcija in posredno tudi tvorba nove kosti sta kontrolirani z uravnoteženjem med RANKL in OPG. Relativno razmerje med RANKL in OPG je pomembno za lokalno uravnavanje resorpcije kosti, ker predstavlja najpomembnejšega pokazatelja aktivnosti osteoklastov. Aktivirani osteoklasti namreč začnejo izločati encime (npr. lizosomne proteaze, katepsin K) potrebne za razgradnjo kostnega matriksa (28). Ker je izražanje RANK na osteoklastih razmeroma konstantno, uravnavata obseg kostne razgradnje le RANKL in OPG. Razmerje RANKL/OPG nam tako poda informacijo, v katero smer se bo ravnovesje kostne remodelacije prevesilo - v smer povečane razgradnje ali v smer

povečane tvorbe nove kosti. Patološko povišanje razmerja v korist RANKL ali znižanje OPG, prevesi ravnotežje kostne razgradnje in kostne tvorbe v smer povečanje kostne resorpcije (29, 30). To lahko vodi do nastanka različnih bolezni npr. osteoporoze, periodontalne bolezni, revmatoidnega artritisa, Pagetove bolezni ali različnih tumorjev kosti. Obratno pa se pri patološkem povišanju razmerja v korist OPG zmanjša kostna resorpcija in poveča osteogeneza, kar lahko vodi do patološkega stanja osteopetroze (31). Izražanje RANKL in OPG uravnavajo različni dejavniki, ki ju lahko stimulirajo in/ali zavirajo, vendar je vpliv dejavnikov na RANKL in OPG večinoma ravno obraten. V preglednici I so navedeni nekateri dejavniki in njihov način delovanja na RANKL in OPG.

Preglednica I: Hormoni, citokini ter drugi dejavniki, ki vplivajo stimulativno ali zavirajoče na izražanje RANKL in OPG

lokalni dejavnik	stimulirajo	inhibirajo
RANKL	PTH, prostaglandin E ₂ (PGE ₂) vnetni citokini (IL-1, TNF- α , IL-6...) 1,25-dihidroksivitamin D ₃ , glukokortikoidi	TGF- β , Estrogeni, IL-10, IL-13
OPG	1,25-dihidroksivitamin D ₃ , IL-1, TGF- β	PTH, glukokortikoidi, PGE ₂

1.3.3. Živalski model pospešene kostne remodelacije

V medicini se vedno pogosteje srečujejo z različnimi bolezenskimi stanji, ki posredno vplivajo na kostnino. Lahko gre za izgubo kostnine pri raznih vnetnih procesih, tumorjih in cistah v kosti. Za zagotavljanje uspešnega zdravljenja in pravilnih postopkov zdravljenja, je potrebno poznavanje mehanizma kostne remodelacije. Eden izmed znanih modelov, s katerim lahko preučujemo resorpcijo in izgradnjo kosti, je model ortodontskega premika zoba (OPZ). V začetni stopnji OPZ je navadno prisotno vnetje, ki pa kasneje izzveni tako, da ta model dobro posnema mehanizem (pospešene) kostne remodelacije (32).

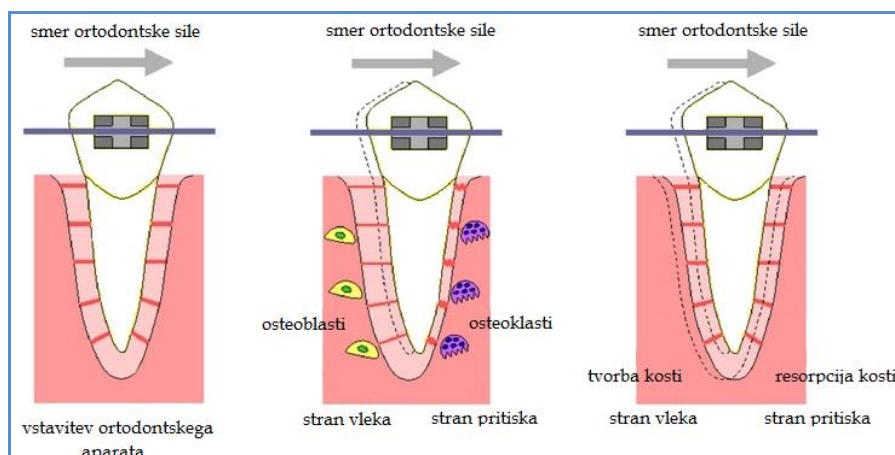
1.3.3.1. Ortodontski premik zoba (OPZ) kot model za kostno resorpcijo – mehanizem kostne remodelacije pri premiku zoba

OPZ je vsiljen proces, med katerim se preoblikujejo obzobna tkiva, tudi alveolna kostnina. Pri tem gre za biološki odziv obzobnih tkiv na aplicirano delovanje ortodontske sile. Za zagotovitev primerne velikosti in stalnosti uravnotežene sile na zob, se navadno uporabi superelastično vzmet. Zaradi delovanja sile na zob pride do kostne resorpcije z osteoklasti na strani pritiska (v smeri delovanja ortodontske sile poteka resorpcija kostnine z osteoklasti) in do tvorbe nove kosti na strani vleka zuba z osteoblasti. V celotnem procesu

gre za biokemijske in celične reakcije kot odgovor na mineralizirano tkivo (alveolna kost) in nemineralizirana obzobna tkiva (periodontalni ligament) (33). Resorpcija in tvorba alveolne kostnine sta ključna procesa, ki omogočata OPZ (10, 20, 32).

OPZ lahko razdelimo v tri faze (34):

1. faza: **začetna faza** - po namestitvi vzmeti in delovanju sile na zob lahko opazimo takojšen premik zoba v območju pozobnice.
2. faza: **faza zastoja oz. zakasnjenega premika zoba** – tu je premik zoba odvisen od velikosti apliciranih sil. Pri majhnih silah, se zob pomika enakomerno, medtem ko se pri delovanju velikih sil zob skoraj ne premika, ker se v tem času odstranjuje nekrotično tkivo in celice pozobnice na strani pritiska. V predelih, kjer je prisotna nekroza, se pojavijo fagocitne celice, kot so osteoklasti in makrofagi. Ko omenjene fagocitne celice odstranijo nekrotično tkivo pozobnice in sosednje čeljustne kosti, se začne zadnja faza, faza enakomernega premika zoba.
3. faza: **faza enakomernega premika zoba** – pri zadnji fazi pride do enakomernega premika zoba, ob stalnem delovanju sile na zob. Sočasno premiku zoba, začnejo na strani vleka osteoblasti na površini kosti tvoriti novo kost, na strani pritiska pa se z osteoklasti kostnina razgrajuje. Do enakomernega premika zoba pride v nekaj dneh do nekaj tednih, po začetku delovanja sile na zob. Zaradi tega morajo poskus, ki proučujejo biološke mehanizme premikanja zob, trajati vsaj 14 dni. V našem primeru je poskus trajal 42 dni. (10, 13, 20, 32).



Slika 5: Shematski prikaz sil, ki delujejo na zob pri nameščenem ortodontskem aparatu/superelastični vzmeti – prikazane so smeri sil pritiska in smeri sil vleka (povzeto po 35)

1.3.4. Vpliv SB2 na kostno remodelacijo

SB2 oziroma kronično hiperglikemijo uvrščamo med najbolj pogoste metabolne bolezni pri starejših. Ima negativne vplive na različne organe v telesu, med njimi tudi na kosti. Večina raziskav pri bolnikih s SB2 je pokazala zmanjšano tvorbo kosti, z normalno resorpcijo in normalno mineralizacijo kosti. Kljub temu so kosti bolnikov s SB2 bolj krhke, povečano je tveganje za zlome kosti, zlomi kosti se slabše in počasneje zaraščajo ali pa se pojavijo komplikacije pri njihovem zaraščanju (36). Vedno več raziskav se zato ukvarja z vplivom SB1 in SB2 na kostno remodelacijo (37). Do sedaj narejene raziskave, glede kostne remodelacije pri bolnikih s SB, so bile izvedene le na manjšem številu bolnikov s SB1 in SB2. Več raziskav je bilo narejenih na različnih živalskih modelih glodalcev (npr. miši, podgane, puščavske podgane) obeh tipov SB. Ker se živalski modeli razlikujejo med seboj, so si tudi rezultati lahko nasprotujoči in jih težko primerjamo med seboj (9).

Vzrok za vpliv SB na kosti različni znanstveniki različno razlagajo. Nekateri znanstveniki zagovarjajo dejstvo, da je za vpliv na kosti krivo stanje hiperglikemije, medtem ko drugi zagovarjajo, da je za negativni vpliv na kosti krivo pomanjkanje učinka inzulina ali pa neobčutljivost tkiv na inzulin. Pomanjkanje inzulina naj bi imelo škodljive učinke na biomehanske lastnosti kosti, ker inzulin pospešuje sintezo kostnega kolagena in tvorbo hrustanca. Pri nezdravljenih stanjih pomanjkanja inzulina so znanstveniki ugotovili zmanjšano čvrstost kosti, zmanjšanje mineralizacije na površini kosti, zmanjšanje površine kosti, zmanjšano aktivnosti osteoblastov in manjše število osteoklastov. Zaradi tega nekateri znanstveniki zagovarjajo, da ima inzulin anabolni učinek na kosti. Terapija z inzulinom vse zgoraj naštete procese normalizira in izboljša odpornost kosti na zlome (36). Pri SB1 je znan vpliv na strukturo kosti in njene lastnosti, kar se odraža v slabšemu zaraščanju zlomov kosti tako pri živalskih modelih, kot tudi bolnikih s to boleznjijo. Pojavlja se osteopenija ali celo osteoporoz, kar v literaturi razlagajo kot posledico, da je zaradi povečanega števila in aktivnosti osteoklastov pospešena kostna razgradnja, istočasno pa je tvorba nove kosti zmanjšana zaradi manjšega števila osteoblastov (38). Pri SB2 pa je veliko nasprotujočih si raziskav, ki preučujejo vpliv SB na kostno remodelacijo. Do sedaj je znano, da je pri SB2 spremenjena normalna kostna remodelacija. Nekatere raziskave so ugotovile, da pri bolnikih s SB2 počasna kostna remodelacija

zmanjša izgubo kosti in naj bi to pojasnjevalo višjo MKG pri teh bolnikih. Druge raziskave pa zaključujejo, da SB2 zvišuje krhkost kosti neodvisno od vrednosti MKG, najverjetnejše zaradi kopičenja mikropoškodb kosti, ker je proces remodelacije kosti upočasnen (4). Na nivoju kostnih celic naj bi bil metabolizem kosti spremenjen zaradi zavrite tvorbe kosti s strani osteoblastov. Vzrok za zmanjšano delovanje osteoblastov je lahko več, npr. spremenjen metabolizem vitamina D, hipoparatiroidizem, kronična hiperglikemija in zmanjšan učinek inzulina. Za razliko od osteoblastov, pa je delovanje osteoklastov (resorpcija kosti) povečano. Počasni kostni obrat prav tako potrjuje ugotovitve zdravnikov, da se zlomi kosti pri bolnikih s SB2 dlje časa zaraščajo. Nekateri znanstveniki negativni vpliv na kosti pripisujejo povišanim vrednostim glukoze in njenega direktnega učinka na kostne celice ter nastanka končnih produktov glikacije in oksidacije, drugi z odvisnostjo od tipa SB, načinom zdravljenja (uporaba antidiabetikov, inzulina,...) in časom trajanja bolezni. Pri večih raziskavah naj bi tudi dokazali povezavo med uporabo nekaterih antidiabetičnih zdravil, predvsem tiazolidindioni (TZD) in njihovimi neželenimi učinki na kosti (39). Uporaba antidiabetičnih zdravil prav tako posredno vpliva na sestavo kosti, ker ta zdravila delujejo na osteoblaste tako, da delujejo agonistično na PPAR- γ receptor (40-42). Aktivacija tega receptorja povzroči, da se mezenhimske matične celice usmerijo v nastanek adipocitnih celic, namesto v osteoblastne celice. Posledica je zmanjšano število osteoblastov in zmanjšana tvorba kosti (43).

Večina do sedaj opravljenih raziskav se ukvarja z vprašanjem vpliva SB2 na remodelacijo kosti ali z vplivom OPZ na remodelacijo alveolne kosti pri živalskem modelu (miš ali podgana) na celičnem nivoju (44). Manj raziskav je bilo narejenih na temo dogajanja na molekularnem nivoju (45, 46), skoraj nobena pa ne odgovarja na vprašanje, kaj se dogaja pri remodelaciji alveolne kosti ob OPZ pri sočasno prisotni SB2 na molekularnem nivoju. Ker spremembe v metabolnem stanju posameznika lahko vplivajo na kostno remodelacijo in s tem na različno hitrost OPZ, to pomeni, da SB2 lahko vpliva na OPZ (37). Odziv kostnih celic osteoklastov na kostno resorpcijo pri bolnikih s SB2 v povezavi z OPZ, do sedaj še ni dobro pojasnjen.

2. NAMEN DELA

Obstajajo podatki, da sladkorna bolezen tipa 2 (SB2) vpliva na kostno remodelacijo (4, 36, 37), vendar ključni mehanizmi vpleteni v ta proces še niso zadostno pojasnjeni. Prav tako še niso opisane raziskave o povezanosti enega najpomembnejših sistemov za uravnavanje kostne remodelacije sistema RANKL/RANK/OPG s kostno remodelacijo pri sladkornih bolnikih. Raziskave dejavnikov, ki vplivajo na kostno remodelacijo, so izjemno težavne, saj je kostna remodelacija počasen proces. Motnje tega procesa pa se klinično izrazijo šele čez nekaj let. Zaradi tega so živalski modeli s pospešeno kostno remodelacijo najprimernejši za študije mehanizmov kostne resorpcije.

Namen naše naloge je ugotoviti ali SB2 vpliva na kostno remodelacijo preko sistema RANKL/RANK/OPG. Glede na namen naše naloge, bomo izbrali podganji živalski model za SB2 – model Goto-Kakizaki podgane (9, 15). Te podgane bodo podvržene ortodontskemu premiku zob (OPZ), za kar je potrebna sila, ki jo dosežemo z uporabo superelastične vzmeti. Ta vzmet ali aparat zagotavlja primerno velikost in stalno delovanje sile na zob. Med OPZ pride do resorpcije alveolne kostnine čeljustnice na strani pritiska sile ter tvorbe nove kostnine na strani vleka vzmeti – to je model za kostno remodelacijo.

Preveriti želimo hipotezo:

Pri SB2 je izražanje genov za RANKL zvišano, za OPG pa znižano oziroma pri SB2 se razmerje izražanje genov RANKL/OPG zviša.

Analizirali bomo kostne vzorce čeljusti podgan s SB2. Zanimalo nas bo vpliv SB2 na presnovo alveolne kostnine med OPZ na živalskem modelu SB2. Primerjali bomo izražanje genov za RANKL, RANK in OPG med GK podganami (živalski model za SB2) in Wi podganami (živali brez SB2 – kontrolna skupina) v različnih časovnih obdobjih na 0. dan (brez vzmeti oz. aparata), 7. dan in 42. dan po začetku delovanja sile na zob (po aplikaciji aparata oz. vzmeti). Zanimalo nas bo tudi razmerje med RANKL/OPG vrednostjo med posameznimi skupinami živali.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. PREISKOVANA SKUPINA/ŽIVALSKI MODEL SB2

Živalski model Goto-Kakizaki (GK) podgane so načrtno vzrejene podgane, ki že v prvih tednih življenja razvijejo SB2 in služijo kot dober živalski model za raziskave SB2. Model sta leta 1975 »razvila« znanstvenika Goto in Kakizaki na Tohoku Univerzi, Sendai na Japonskem, tako da sta medseboj križala le Wistar (Wi) podgane s zvišanimi vrednostmi koncentracije glukoze v krvi (47).

GK podgane so poligenski živalski model, ki že zelo zgodaj spontano razvijejo milejšo obliko hiperglikemije, hiperinzulinemijo in so neodzivne na učinke inzulina. Imajo podobne karakteristike SB2 kot bolniki (npr. oboji imajo zmanjšan inzulinski odziv na glukozo, znižane aktivnosti encima glukokinaze in GAPDH, spremenjen lipidni profil ter zvišano razmerje proinzulin/inzulin). Posebnost tega živalskega modela je, da nima povisane telesne teže, ki bi v našem primeru lahko prikrila učinke SB2 na presnovo kostnine. Kot edina relevantna kontrolna skupina za GK podgane so primerne le Wi podgane (15, 48). Zaradi vseh teh lastnosti služijo kot zelo dober živalski model za raziskave SB2 in v našem primeru so dober model za preučevanje kostne remodelacije pri OPZ.

OPZ je vsiljen oz. pospešen proces normalne kostne remodelacije. V okviru te magistrske naloge nas je najbolj zanimal vpliv SB2 na normalno kostno remodelacijo, ker ti mehanizmi še niso dobro raziskani in pojasnjeni.

Za vključitev živali v raziskavo, je bilo potrebno živalim določiti koncentracijo glukoze v krvi po celonočnem stradanju. Kri so jim odvzeli iz repne vene in izmerili koncentracijo glukoze z glukometrom. Goto-Kakizaki podgane (GK), ki so imele koncentracijo glukoze nad 8 mmol/L in Wistar podgane (Wi) s koncentracijo glukoze pod 8 mmol/L, so bile vključene v našo raziskavo. V raziskavo je bilo tako vključenih 45 podganjih samcev starih od 13 do 14 tednov. Od tega jih je bilo 21 GK podgan s SB2 (teža: 300-340 g) in 24 Wi podgan brez SB2 (teža: 300-340 g). Vsaka od teh dveh skupin pa je bila nato razdeljena še v dve skupini – v skupino z nameščeno superelastično vzmetjo oz. aparatom in skupino brez vzmeti oz. aparata. Kontrolna skupina so bile Wi podgane.

Živali vključene v raziskavo smo razdelili v štiri skupine:

1. skupina: Wi podgane brez nameščene vzmeti ($n = 9$) – kontrolna skupina (0D)
2. skupina: GK podgane brez nameščene vzmeti ($n = 8$) – kontrolna skupina (0D),
3. skupina: Wi podgane z nameščeno vzmetjo ($n = 15$) in
4. skupina: GK podgane z nameščeno vzmetjo ($n = 13$);

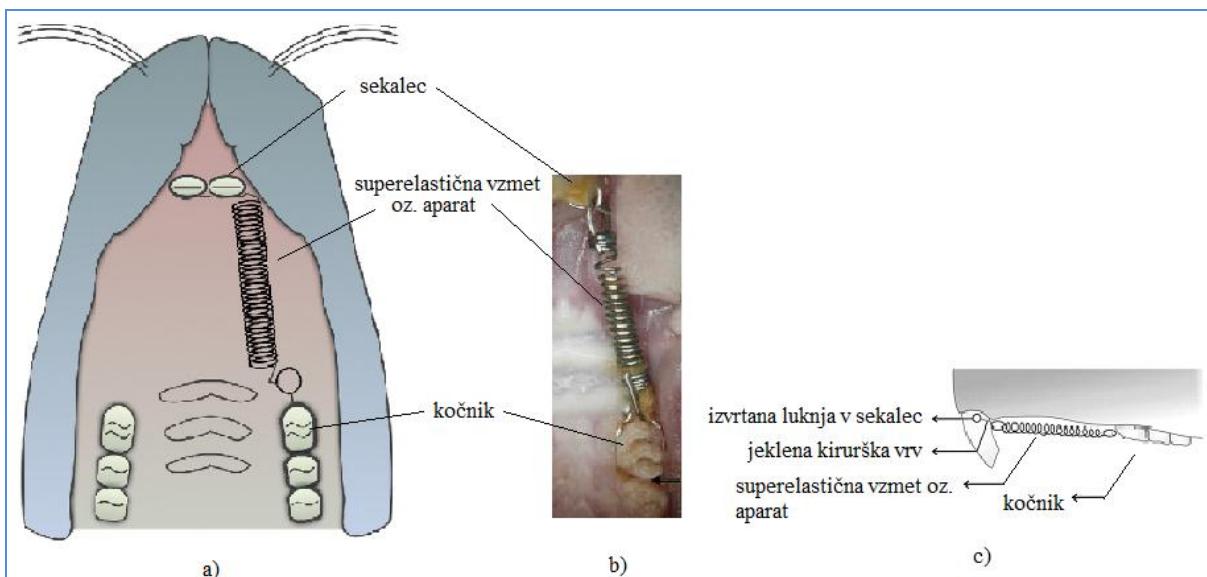
Živali, ki so imele nameščeno vzmet oz. aparat (3. in 4. skupina) pa smo razdelili še v dve podskupini, glede na čas, v katerem so imele živali aplicirano vzmet oz. aparat:

- a) z apliciranim aparatom 7. dni (7D); (Wi podgane $n = 7$; GK podgane $n = 6$)
- b) z apliciranim aparatom 42. dni (42D); (Wi podgane $n = 8$; GK podgane $n = 7$).

Ortodontski premik zoba (OPZ) so dosegli s pomočjo superelastične vzmeti, ki zagotavlja stalno delovanje sile na zob. Živali, ki so imele nameščeno vzmet oz. aparat, so dobivale hrano namočeno z vodo za lažje hranjenje. Podgane z nameščeno vzmetjo ($n = 15$ Wi podgan in $n = 13$ GK podgan) so imele le-to nameščeno med sekalcema in dvema kočnikoma v zgornji čeljustnici tako, da so za dodatno pričvrstitev superelastične vzmeti izvrtali luknjo skozi zobno krono sekalcev v nivoju dlesni, kar prikazuje slika 6. S tem se je preprečilo popuščanje ali snetje vzmeti z zoba. Ta vzmet je povzročala stalno silo na zob velikosti 25cN (49, 50). Pri delovanju sile vzmeti na zob, se je na strani pritiska kostnina čeljustnice resorbirala, medtem ko se je na strani vleka tvorila nova kost. Premik zob se je merit enkrat tedensko od dneva 0 do 42. dneva in sicer na strani z vzmetjo in istočasno na drugi strani čeljusti brez vzmeti, ki je služila kot kontrola oz. primerjava premika zob. Takrat se je tudi ponovno namestilo vzmet zaradi izraščanja sekalcev (49). Podgane iz prve in druge skupine brez nameščenega aparata (0D), Wi podgane ($n = 9$) in GK podgane ($n = 8$), so služile kot kontrolne skupine (10).

Zgoraj opisan poskus je trajal 42 dni in to je tudi čas, v katerem so nekatere podgane iz 3. in 4. skupine najdlje imele aplicirano vzmet oz. aparat. Pri drugih znanstvenikih so bile podobne raziskave veliko krajše, npr. od 48 ur pa do 12 dni pri nekaterih raziskavah, čeprav za raziskave enakomernega premika zob priporočajo vsaj 14-dnevni vlek zob (13). Živali so nato žrtvovali z izkrvavitvijo po vbrizganju mešanice anestetikov. Na 7. dan (7D) so bile žrtvovane živali iz 3. skupine ($n = 7$) in živali iz 4. skupine ($n = 6$). Pri tem so jim odvzeli levi del čeljustnice z nameščeno vzmetjo, skupaj s pripadajočimi zobmi. Na 42.

dan (42D) so bile žrtvovane preostale živali vseh štirih skupin. Živali brez nameščene vzmeti smo obravnavali, kot da so žrtvovane na 0. dan (0D).



Slika 6: Vstavljen ortodontski aparat: a) shematski prikaz namestitve aparata za OPZ pri podgani; b) slika OPZ aparata pri podgani; c) prikaz namestitve OPZ aparata na zobe podgane - pogled s strani (51)

Živali uporabljene v naši nalogi, so bile vzgojene na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani. Veterinarska uprava Republike Slovenije Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, je dne 12.2.2009 izdala dovoljenje številka 34401-62/2008/9, za izvajanje našega poskusa na živalih, sama raziskava pa je bila izvedena tudi v skladu z Zakonom o zaščiti živali (Ur. l. RS. 98/99 in Ur. l. 126/03). Vse delo s podganami do zamrzovanja vzorcev čeljustnic v tekočem dušiku, je potekalo na zgoraj omenjenem inštitutu.

3.2. KOSTNI VZORCI IN ROKOVANJE Z NJIMI DO IZOLACIJE

Če primerjamo DNA z RNA, je RNA relativno nestabilna molekula. Da zagotovimo čim boljšo kvaliteto izolirane RNA, je zelo pomembno zagotoviti stabilnost RNA v odvzetih vzorcih. Zaradi tega je potrebno preprečiti razgradnjo RNA, ki se prične takoj po odvzemu biološkega materiala. Vzrok razgradnje RNA molekul so encimi RNAAze, ki so prisotni tako v samem tkivu, kot tudi v našem neposrednem okolju (na površini kože, prašnih delcih, plastiki,...). Za preprečevanje razgradnje RNA moramo sveže odvzeto tkivo takoj

zamrzniti v tekočem dušiku ($T = -196^{\circ}\text{C}$; izredno nizka temperatura tekočega dušika inhibira delovanje RNAAZ, nima pa nobenega drugega vpliva na vzorce) ali pa mu moramo dodati stabilizacijski reagent, ki prav tako inhibira RNAAZE in nadomesti uporabo tekočega dušika (npr. Trizol[®], Qiazol[®], RNAlater[®] raztopina,...). Med delom in rokovanjem z vzorci moramo paziti, da v naše vzorce ne vnašamo RNAAZ iz okolja ali mikroorganizmov ter s tem eksterno DNA, ki nato v naših vzorcih predstavlja kontaminacijo iz okolice. Prav tako moramo vse delovne površine očistiti s posebnimi reagenti (npr. RNaseZap[®]) in presvetliti z UV lučjo, kar inhibira encime RNAAZE in sterilizira delovno površino. Med delom moramo obvezno uporabljati le sterilni pribor, lateksne ali nitrilne zaščitne rokavice brez pudra in epruvete ter pipetne nastavke brez prisotnih RNAAZ.

V našem primeru je bil odvzeti vzorec tkiva kost - odvzete so bile zgornje čeljustnice podgan skupaj s tremi kočniki. Po odvzemuh in očiščenju so bili vzorci čeljustnic takoj zamrznjeni v tekočem dušiku in nato v njem tudi shranjeni, do začetka izolacije celokupne RNA. Ta del eksperimenta je bil opravljen na Inštitutu za farmakologijo in toksikologijo, Medicinske fakultete. Vzorci kosti so bili nato preneseni na Katedro za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo, kjer je bil nato eksperiment dokončan. Med odvzemom čeljustnic so uporabljali sterilne inštrumente. Vse površine, na katerih so opravljali odvzeme vzorcev, so očistili z RNaseZap[®] reagentom, bile pa so tudi predhodno ohlajene.

Med samo izolacijo in nadaljnjam delom z izolirano RNA smo pazili, da v vzorce nismo vnesli RNAAZ iz okolice in da se vzorci tkiva med samim delom niso odtajali. S tem smo preprečili morebitno nadaljnjo razgradnjo RNA, ki se začne takoj po odvzemuh vzorcev tkiva iz živali (nujno je hitro delo in čimprejšnje zamrznjenje tkiv v tekočem dušiku). V primeru, da pride do popolne ali le delne razgradnje RNA iz vzorcev, posledično taka RNA ni zadovoljive kvalitete ali pa jo je količinsko premalo in je v nadaljnih poskusih zato ne moremo uporabiti.

Kvaliteto izolirane celokupne RNA smo po končani izolaciji ovrednotili z merjenjem koncentracije in čistosti celokupne RNA s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA) ter z oceno razgrajenosti izolirane celokupne RNA na aparatu Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, ZDA).

3.3. IZOLACIJA CELOKUPNE RNA

Vzorce čeljustnic podgan smo do izolacije celokupne RNA hranili v tekočem dušiku (na T = – 196 °C). Poleg preprečitve razgradnje RNA z RNazami, smo morali za dobro izolacijo celokupne RNA zagotoviti tudi učinkovito trenje in homogenizacijo tkiva. S trenjem smo samo mehansko zdrobili vzorce, za popolno razbitje celičnih sten in organelov ter popolno sprostitev molekul RNA iz vzorcev tkiva, pa smo izvedli še lizo (npr. z lizatnim pufom TRIzol® reagentom) in kratko homogenizacijo vzorcev z ultrazvokom.

Postopek izolacije se sestoji iz dveh faz dela:

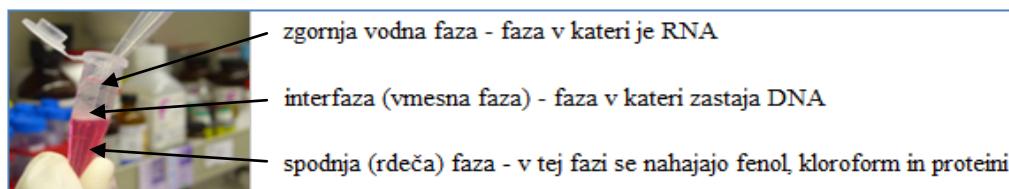
1) faza: predpriprava vzorca – mehansko drobljenje vzorcev kosti

Pred izolacijo smo morali vzorce kosti čeljustnic najprej primerno mehansko zdrobiti in uprašiti v tekočem dušiku. Vzorec tkiva smo s pomočjo terilnice in pestila, ob stalni prisotnosti tekočega dušika, strli v fin prah. Po uprašitvi smo kostno tkivo takoj prenesli v 1,5 mL epruveto z dodanim 1 mL lizatnega pufra TRIzol® reagenta (TRIzol® Plus RNA Purification System). TRIzol® reagent, ki vsebuje fenol in gvanidinijev izotiocianat, učinkuje na vzorec tkiva tako, da inhibira morebitno prisotne RNAAze v tkivu in obori ter denaturira proteine ter istočasno zagotovi tudi optimalno lizo tkiva.

Suspenzijo lizata smo nato še dodatno homogenizirali z ultrazvočnim homogenizatorjem, da smo zmanjšali njegovo viskoznost (52). Med postopkom lize celic in kratke homogenizacije tkiva ohranimo strukturo RNA, medtem ko je vpliv na celice in celične komponente tak, da ultrazvok povzroči dokončno lizo celičnih membran in s tem omogoči popolno sprostitev celokupne RNA, DNA in proteinov iz celic (52).

2) faza: izolacija celokupne RNA iz lizata zdrobljenih in uprašenih vzorcev kosti

Pripravljenemu lizatu smo dodali 200 µL kloroforma, ročno močno stresali epruveto 15 sekund ter nato vse skupaj inkubirali 3 minute na sobni temperaturi. Suspenzijo smo nato centrifugirali 15 minut na $12\ 000 \times g$, pri T = 4 °C. Med centrifugiranjem se je suspenzija ločila v tri plasti, zgornjo vodno fazo, kamor preide celokupna RNA, srednjo fazo ali interfazo, kjer zastaja DNA in spodnjo organsko fazo, kjer se nahajajo fenol, kloroform, proteini in ostale primesi.



Slika 7: Ločba suspenzije v tri plasti po dodatku kloroformata (vodna faza, interfaza in spodnja faza) (53)

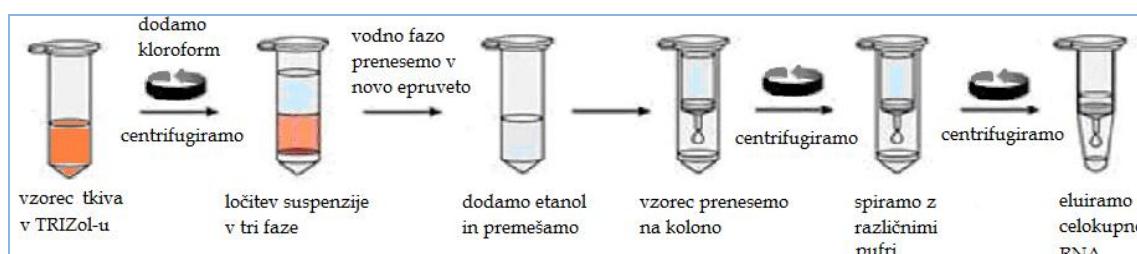
Celokupno RNA smo izolirali s tovarniško pripravljenim kompletom PureLinkTM RNA Mini Kit, po navodilih in priporočilih proizvajalca Ambion (54).

Tehnologija, ki jo uporablja ta komplet, je uporaba posebnih membranskih kolon s silikatno membrano. Ker je ta membrana pozitivno nabita, se nanjo vežejo negativno nabite molekule RNA iz vodne faze vzorca. Vezavna kapaciteta membranske kolone je približno 1 mg nukleinske kisline (54).



Slika 8: Uporaba membranskih kolon s silikatno membrano - epruvete s kolono (RNA Spin Cartridge) iz PureLinkTM RNA Mini Kit-a (Ambion[®]) (55)

Po centrifugiranju smo zgornjo vodno fazo prenesli v novo epruveto, kateri smo dodali enak volumen 70 % etanola in vse skupaj močno premešali z vibracijskim mešalnikom. (etanol je oboril celokupno RNA in omogočil boljšo vezavo celokupne RNA na membrano kolone). Mešanico vodne faze in etanola smo nanesli na »RNA Spin Cartridge« kolono (del kita PureLinkTM RNA Mini Kit). Celokupna RNA se je pri tem vezala na silikatno membrano kolone. Kolono smo nato spirali z različnimi pufri (Wash Buffer I in Wash Buffer II), s katerimi smo odstranili preostale nečistoče, ki so se prav tako vezale na membrano kolone. Na koncu postopka smo z dodatkom vode brez RNaz eluirali celokupno RNA iz kolone. V eluatu smo dobili izolirano celokupno RNA, primerno za nadaljnje delo.



Slika 9: Protokol izolacije celokupne RNA s kolono – PureLinkTM RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) (56)

Materiali in reagenti:

- tekoči dušik (T = –196 °C) (Messer Slovenija d.o.o., Ruše, Slovenija)
- RNaseZap® Reagent (Ambion®, NY, ZDA)
- TRIZol® Plus RNA purification Reagent Kit (Ambion®, Carlsbad, CA, ZDA) vsebuje:
 - ✓ TRIZol® Reagent, #15596-026 (vsebuje fenol in gvanidinijev izotiocianat) (Life Technologies, Ambion®, NY, ZDA)
 - ✓ PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies, Ambion, NY, ZDA) (Ambion®, Carlsbad, CA, ZDA); komplet sestoji iz naslednjih reagentov:
 - Wash Buffer I,
 - Wash Buffer II,
 - voda brez RNaz,
 - epruvete s kolono (RNA Spin Cartridge) in
 - epruvetke za eluirano RNA (Recovery Tube)
- kloroform p.a. (CHCl₃, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- absolutni etanol p.a. (C₂H₅OH, 100 % EtOH, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- 70 % etanol (pripravljen iz absolutnega etanola)
- pipete in pipetni nastavki brez DNaz/RNaz
- keramična terilnica in pestilo, spatula, stojalo za epruvete in štoparica
- 1,5 mL plastične epruvete s stojalom
- zaščitne rokavice lateks ali nitril brez pudra

Aparati:

- ultrazvočni homogenizator (Ultrasonic Homogenizer 470 Series, Cole-Parmer, Illinois, ZDA)
- vibracijsko mešalo – IKA Vortex Genie II (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, ZDA)
- komora za izolacijo RNA UVC/T-M-AR (UV-cleaner DNA/RNA, BioSan, Riga, Latvija)
- centrifuga Centrifuge 5415R (Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija)
- mini centrifuga z vibracijskim mešalom Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija)

3.4. OCENA IZOLIRANE CELOKUPNE RNA

Po izolaciji celokupne RNA smo morali preveriti ali je naša izolirana RNA ustrezne kvalitete za nadaljnje delo. Kvaliteto izolirane celokupne RNA smo ovrednotili na dva načina – najprej z merjenjem koncentracije in čistote celokupne RNA s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA), za tem pa še z oceno razgrajenosti izolirane celokupne RNA na aparatu Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, ZDA).

3.4.1. Merjenje koncentracije in ocena čistote celokupne RNA

Koncentracijo in čistost izolirane celokupne RNA smo kvantitativno izmerili z uporabo UV-Vis spektrofotometra Nanodrop ND-1000. Prednost uporabe tega spektrofotometra je v zelo majhni porabi dragocenih vzorcev RNA (potrebujemo 1 - 1,5 µL vzorca). Z merjenjem absorbance vzorcev pri $\lambda = 260$ nm, kjer je absorpcijski maksimum nukleinskih kislin, smo neposredno določili koncentracijo vzorcev ($c = (A \times e) / b$; $b = 1$ cm; $e_{RNA} = 40$ ng - cm/µL; $A_{260\text{nm}} = 1$ pri 40 ng/µL RNA). Čistost celokupne RNA pa smo preverili z merjenjem absorbance pri dveh valovnih dolžinah (260 in 280 nm). Razmerje med valovnima dolžinama $A_{260/280}$ nam je podalo oceno čistosti naše izolirane celokupne RNA. Če je vrednost razmerja ~2,0, to pomeni, da imamo izolirano čisto RNA, brez prisotnih nečistot. V primeru, da so v vzorcu prisotni proteini, fenoli ali druge nečistote, z absorbcijo blizu ali pri valovni dolžini $\lambda = 280$ nm, pa se vrednost tega razmerja posledično zniža (proteini imajo absorpcijski maksimum pri $\lambda = 280$ nm, fenol pa pri $\lambda = 270$ nm) (57).

Razmerje $A_{260/280}$ nam poda informacijo o čistosti izoliranih vzorcev celokupne RNA (o prisotnosti proteinov in drugih kontaminacij), ne pa tudi informacije o kakovosti izolirane RNA oz. o integriteti RNA. Integriteta RNA pomeni, kako intaktna in nerazgrajena je RNA izolirana iz vzorcev. Prav tako nam spektrofotometrična analiza ne poda informacij o morebitno prisotnih molekulah DNA v vzorcu, ki bi se lahko izolirale skupaj z RNA in predstavljal motnjo za nadaljnje delo. Odgovore na ta vprašanja ter vse potrebne informacije o kvaliteti izolirane RNA dobimo s postopkom avtomatizirane elektroforeze na čipu in podatkom o vrednosti RIN (ang. RNA integrity number - število, ki oceni integriteto RNA) (58).

Materiali in reagenti:

- voda brez RNaz (HyClone Water, Molecular Biology Grade Water, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA)
- pipete in pipetni nastavki brez RNaz in DNaz
- stojala za epruvete

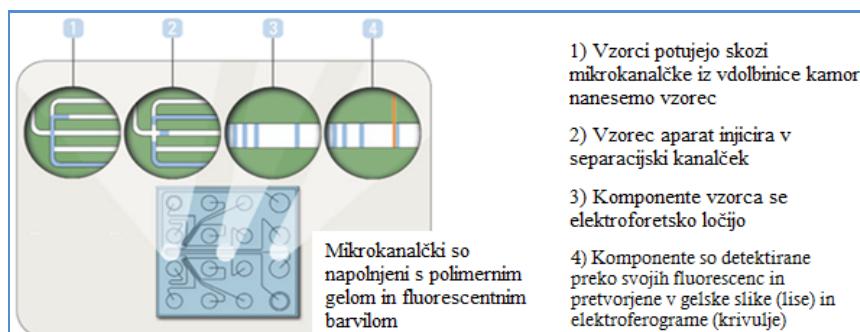
Aparati:

- UV-Vis spektrofotometer Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA)
- mini centrifuga z vibracijskim mešalom Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija)

3.4.2. Preverjanje razgrajenosti izolirane celokupne RNA na čipu

Po merjenju koncentracije izolirane RNA smo, z aparatom Bioanalyzer 2100, naredili še oceno razgrajenosti oz. intaktnost izolirane celokupne RNA. Tehnologija, ki jo uporablja aparat, je imenovana »Lab-on-a-chip« tehnologija. Gre za kombinacijo tehnologije mikrokapilarne elektroforeze s tehnologijo mikrofluidov na posebnih tovarniško pripravljenih čipih in istočasno predstavlja zelo dobro alternativo klasični denaturacijski agarozni gelski elektroforezi. Za izvedbo te metode potrebujemo zelo majhne količine reagentov in vzorcev (potrebujemo le 1 µL vzorca ter od 1 do 9 µL ostalih reagentov), je hitrejša in bolj preprosta za izvedbo od prej omenjene klasične denaturacijske elektroforeze.

Analizo na čipih smo izvedli po navodilih proizvajalca Agilent Technologies in uporabili tovarniško pripravljen komplet Agilent RNA 6000 NanoKit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Komplet vsebuje tovarniško pripravljene čipe in naslednje reagente: polimerni gel, fluorescentno barvilo, marker in lestvico (ang. ladder), ki predstavlja zunanji standard (59). Čipi so narejeni iz plastike, na katere je, na spodnjo stran nameščeno steklo, ki ima na svoji površini vdolbinice povezane med seboj v sistem mikrokanalčkov. Le-te med pripravo čipa napolnimo s polimernim gelom, kateremu smo predhodno dodali fluorescentno barvilo. Gel, ki ga nanesemo na čip, omogoča ločbo RNA molekul glede na njihovo velikost. V električnem toku namreč negativno nabite molekule RNA potujejo po gelu in se na osnovi velikosti in naboja molekul ločijo (majhne molekule potujejo skozi gel hitreje kot velike). Kompleks fluorescentnega barvila in molekul RNA aparat Bioanalyzer 2100 zazna kot fluorescenco (FU), ki je inducirana s pomočjo laserja (aparat meri fluorescenco med $\lambda = 650 - 700$ nm) (59).



Slika 10: Potovanje vzorca skozi mikrokanalčke in njegova elektroforetska ločba na RNA čipu (60)

Rezultati, ki jih po koncu analize dobimo, so podani v različnih oblikah:

- ✓ elektroferogrami (krivulje na grafu; fluorescensa v odvisnosti od časa),
- ✓ gelske slike (lise kot pri klasični agarozni gelski elektroforezi),
- ✓ razmerja med 18s in 28s rRNA vrhovoma (28s rRNA/18s rRNA; razmerje mora biti približno 2:1)
- ✓ vrednost RIN (ang. RNA integrity number)

Za uspešno nadaljnjo analizo (npr. prepis RNA v cDNA in kasneje določanje izražanja genov) je pomembno, da so izolirani vzorci RNA čim manj razgrajeni in da imajo čim višjo vrednost RIN (med 7 in 10) (61).

Materiali in reagenti:

- voda brez RNaz (HyClone Water, Molecular Biology Grade Water, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA)
- komplet RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, CA, ZDA) sestavljen iz:
 - ✓ čistilni čipi za čiščenje elektrod (2 Electrode Cleaners),
 - ✓ RNA čipi za vzorce (25 RNA Nano Chips),
 - ✓ polimerni gel (Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix),
 - ✓ fluorescentno barvilo (RNA Nano Dye Concentrate),
 - ✓ marker (Agilent RNA 6000 Nano Marker),
 - ✓ lestvica/zunanji standard (Agilent RNA 6000 Ladder)
 - ✓ filtri (4 Spin Filters)
- RNaseZap® reagent (Ambion, Life Technologies Corporation, NY, ZDA)
- pipete in pipetni nastavki brez RNaz in DNaz

Aparati:

- 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, ZDA)
- termostat CH-100 Cooling/Heating (BioSan, Riga, Latvija)
- centrifuga Centrifuge 5415R (Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija)
- mini centrifuga z vibracijskim mešalom Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija)
- stresnik za čipe IKA Works Vortexer model MS3 (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, ZDA – hitrost stresanja nastavljena na 2400 rpm)

3.5. POLIMERAZNA VERIŽNA REAKCIJA Z REVERZNO TRANSKRIPCIJO (RT-PCR)

Ker molekula RNA ne more služiti kot matrica za izvedbo PCR metode, je potrebno najprej celokupno RNA pretvoriti v komplementarno DNA (cDNA). Metoda, s katero prepišemo enoverižno RNA v cDNA, se imenuje polimerazna verižna reakcija z reverzno transkripcijo oz. prepisom (RT-PCR). Ta prepis nam omogoči uporaba encima reverzna transkriptaza. RT-PCR je občutljiva metoda, ki nam omogoča detekcijo in tudi kvantifikacijo mRNA iz zelo majhnih količin vzorcev ter se danes veliko uporablja v diagnostiki malignih obolenj, virusov, DNA-mikromrežah, itd. (62).

Po končani reakciji prepisa je količina cDNA enaka količini celokupne RNA, ki nam je služila kot matrica. S prepisom dobljena cDNA v nadaljnji kvantitativni verižni reakciji s polimerazo v realnem času (qPCR) služi kot substrat za PCR reakcijo.

Pri reakciji reverznega prepisa smo uporabili reagente tovarniško pripravljenega kompleta »Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit« podjetja Roche (Roche Applied Science). Komplet je vseboval pufer, encim reverzno transkriptazo, vse štiri deoksinukleotid trifosfate (dNTP-je), ditiotreitol (DTT), inhibitor RNaz in vodo brez RNaz ter različne oligonukleotidne začetnike (uporabimo lahko specifične začetnike ali naključne začetnike t.i. naključne heksamere ali pa oligo-dT začetnike) odvisno od želenega produkta. Pri našem delu smo žeeli prepisati celokupno RNA, zato smo kot začetnike uporabili naključne heksamere (angl. random heksamer primer). Prepis smo izvedli po navodilih proizvajalca (postopek za kvantitativni RT-PCR - »Standard Procedure for Quantitative RT-PCR«) (63). Zaradi preprečevanja kontaminacij in zmanjšanja možnosti vnosa RNaz v vzorce, smo delo izvedli v čisti komori za izolacijo RNA.

Postopek dela:

1) stopnja prepisa: priprava mešanice »matrica – začetniki«

V prvi stopnji prepisa smo najprej pripravili reakcijsko zmes imenovano mešanica »matrica – začetniki« (ang. Template – Primer Mix). V reakcijo smo dali 50 ng/ μ L celokupne RNA (ki je služila kot matrica), zato smo najprej vse vzorce redčili do te koncentracije z vodo brez RNaz. Nato smo dodali še naključne heksamere in epruvete prenesli v ciklični termostat z ogrevanim pokrovom. Pripravljeno zmes smo denaturirali v

cikličnem termostatu na 65 °C, 10 min. Nato smo zmes takoj ohladili na ledu. Pri tem so se denaturirale sekundarne strukture RNA in začeli so se nalegati naključni heksameri na matrico. Sestava reakcijske zmesi in pogoji reakcije so navedeni v preglednici II in III.

Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi za prvo stopnjo prepisa RT - priprava mešanice »matrica-začetniki«

sestava reakcijske zmesi	volumen (µL)
celokupna RNA (konc. 50 ng/µL)	23,5
naključni heksameri (600 pmol/µL)	5
voda brez RNaz	različno (do končne konc. 50 ng/µL)
končni volumen	28,5

Preglednica III: Pogoji reakcije prve stopnje prepisa RT

faza	temperatura	čas
denaturacija zmesi »matrica-začetniki«	65 °C	10 min
prekinitev reakcije in ohladitev na ledu	8 °C	takoj

2) stopnja prepisa: **priprava mešanice »RT Master mix«**

Končani prvi stopnji je sledila druga stopnja prepisa RT-PCR. Iz reagentov (RT pufer, encim reverzna transkriptaza, inhibitorji RNaz, DTT in dNTP-ji) smo pripravili mešanico »RT Master mix«. To mešanico reagentov smo dodali v epruvete z zmesjo iz prve stopnje in epruvete prenesli v ciklični termostat z ogrevanim pokrovom. V tej stopnji je potekla dokončna reakcija sinteze cDNA. Po končani reakciji smo dobili 50 µL prepisane cDNA, katero smo do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalniku (T = - 80 °C). Sestava reakcijske zmesi in pogoji reakcije so navedeni v preglednici IV in V.

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za drugo stopnjo prepisa RT - priprava mešanice »RT Master mix«

sestava reakcijske zmesi	volumen (µL)
pufer za RT (5 × konc.)	10
inhibitor RNaz (40 U/µL)	1,25
zmes dNTP (dNTP mix, 1 mM vsakega)	5
DTT (5mM)	2,5
encim reverzna transkriptaza	2,75
končni volumen	50

Preglednica V: Pogoji reakcije druge stopnje prepisa RT

faza	temperatura	čas
prva inkubacija - prileganje dNTP jev	29 °C	10 min
prepisovanje RNA v cDNA (sinteza cDNA)	48 °C	60 min
inaktivacija encima reverzne transkriptaze	85 °C	5 min
prekinitev reakcije	ohladitev na ledu	

Material in reagenti:

- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostic Corporation, Mannheim, Nemčija), # 05 091 284 001, vsebuje:
 - ✓ reverzno transkriptazo (Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase)
 - ✓ reakcijski pufer (5 × Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer)
 - ✓ inhibitor RNaz (Protector RNase Inhibitor)
 - ✓ mešanica dNTP-jev (Deoxynucleotide Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 - ✓ naključne heksamerne oligonukleotidne začetnike (Random Hexamer Primer)
 - ✓ DTT
 - ✓ voda brez RNaz (Water, PCR grade)
- voda brez RNaz (HyClone Water, Molecular Biology Grade Water, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA) – za redčenje vzorcev celokupne RNA pred prepisom
- RNaseZap® reagent (Ambion®, Life Technologies Corporation, NY, ZDA)
- pipete in pipetni nastavki
- 0,5 mL epruvete za PCR reakcijo, stojalo
- led
- zaščitne rokavice lateks ali nitril brez pudra

Aparati:

- komora za izolacijo RNA UVC/T-M-AR (UV- cleaner DNA/RNA, BioSan, Riga, Latvija)
- mini centrifuga z vibracijskim mešalom Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija)
- ciklični termostat PeqSTAR 96 Universal (PeqLab Biotechnologie GMBH, Erlangen, Nemčija)

3.6. IZBOR REFERENČNEGA GENA

Da lahko zagotavimo pravilnost rezultatov izmerjenih izražanj genov, moramo vse rezultate izražanj oz. ekspresij vzorcev normalizirati na ustrezeni referenčni gen. Pri normalizaciji končnih rezultatov na ta referenčni gen zmanjšamo razlike, ki nastanejo zaradi variabilnosti med vzorci. Le-te lahko nastanejo zaradi večih vzrokov, npr. zaradi nemogoče zagotovitve vnosa enakih količin celokupne RNA v qPCR reakcijo za vse vzorce, variabilnosti med vzorci se lahko pojavijo tudi pri izolaciji celokupne RNA in pri prepisu RNA v cDNA z RT-PCR postopkom. V naši nalogi smo kot referenčni gen uporabili gen za GAPDH, za katerega smo se odločili na podlagi podatkov iz literature in ker se je pri prejšnjih eksperimentih na enakih vzorcih, ta gen izkazal kot najmanj variabilen (48, 50, 64, 65). S tem smo tudi omogočili kasnejšo možnost primerjave med rezultati teh eksperimentov.

3.7. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV ZA RANKL, RANK, OPG in GAPDH

3.7.1. Kvantitativni PCR v realnem času/verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

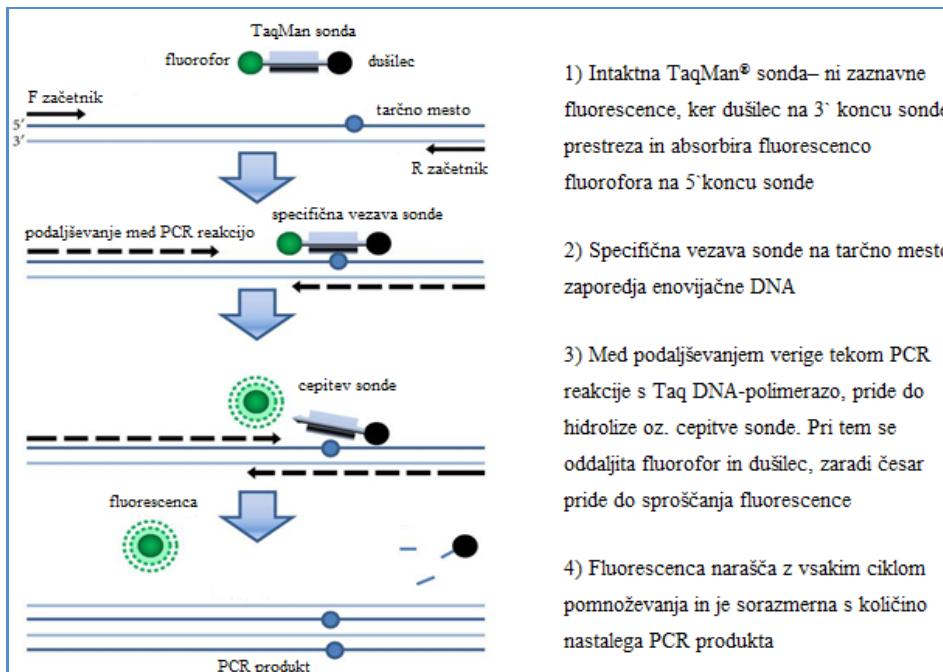
Izražanje genov smo merili z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času ali kvantitativno reakcijo PCR (qPCR). Metoda qPCR omogoča pomnoževanje določenega odseka DNA (v našem primeru je to cDNA) istočasno s fluorescenčno detekcijo nastalih produktov PCR. Količina nastalih produktov PCR je odvisna od količine matrične cDNA, zato lahko iz izmerjene količine nastalih produktov PCR sklepamo na količino izhodne cDNA oz. mRNA (66, 67).

Končne rezultate za vzorce podamo kot normalizirane vrednosti. Izračunamo jih tako, da delimo C_q vrednosti tarčnega gena s C_q vrednostmi referenčnega gena - končni rezultat za vzorec je količnik normalizirane vrednosti vzorca z normaliziranimi vrednostmi referenčnega gena (67).

$$\text{normalizirane vrednosti} = (\text{koncentracija tarčni gen} / \text{koncentracija referenčni gen})$$

3.7.2. Merjenje izražanja genov za RANKL, OPG in GAPDH (qPCR z uporabo hidrolizirajočih TaqMan sond)

Pri svojem delu smo za merjenje izražanja preiskovanih genov za RANKL in OPG ter referenčnega gena GAPDH uporabili komercialno pripravljene specifične TaqMan® sonde (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). Pri komercialno pripravljenih sondah njihovo oligonukleotidno zaporedje in mesto vezave sonde ni poznano. TaqMan® sonde uvrščamo med hidrolizirajoče sonde. Intaktne TaqMan® sonde imajo na 5` koncu vezano reportersko barvilo ali fluorofor (npr. FAM), katerega fluorescenco absorbira na 3` koncu vezano akceptorsko barvilo, imenovano tudi dušilec (angl. quencher). Zaradi specifičnega zaporedja sonde, se med PCR reakcijo le-te vežejo na tarčno zaporedje enovijačne DNA verige. Tekom podaljševanjem verige pride, zaradi 5`-3` eksonukleazne aktivnosti uporabljeni TaqDNA-polimeraze, do hidrolize sonde. Posledično se reportersko in akceptorsko barvilo oddaljita in akceptorsko barvilo ne more več prestrezati fluorescence reporterskega barvila. Količina fluorescence, ki pri tem naraste in se povečuje z vsakim cikлом pomnoževanja PCR produkta, je direktno sorazmerna s količino nastalega PCR produkta (66 - 70).



Slika 11: Prikaz nastanka fluorescence po hidrolizi sonde (71)

Pred merjenjem izražanja genov v vzorcih z začetno optimizacijo vedno najprej preverimo ali morda sonde ne pomnožujejo tudi gDNA v naših vzorcih. Samo delo smo opravili v

čisti komori z laminarnim pretokom zraka, da smo preprečili morebitne kontaminacije iz okolice.

Reakcijsko zmes za sonde genov za RANKL, OPG in GAPDH smo pripravili iz reagentov navedenih v preglednici VI ter jih nanesli na mikrotitrsko ploščico. V preglednici VII je naveden program na qPCR inštrumentu LC 480II (Roche, Nemčija), prilagojen za uporabo univerzalne zmesi reagentov 5×HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus, no Rox (Solis Biodyne, Estonija).

Preglednica VI: Priprava reakcijske zmesi za qPCR pri uporabi TaqMan sond za RANKL, OPG in GAPDH (Applied Biosystems):

sestava reakcijske zmesi	volumen (μL)
voda brez DNaz/RNaz	6,25
20 × TaqMan sonda	0,75
5×HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus	3,0
cDNA	5,0
Σ volumen zmesi	15,0

Preglednica VII: Program na aparatu LC480II za TaqMan sonde (prilagojen za 5 × HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus, Solis Biodyne, Estonija)

faza	temperatura	čas	št. ciklov
začetna denaturacija	95 °C	15 min	1
denaturacija	95 °C	15-20 s	50 ×
prileganje in podaljševanje	60 °C	60 s	kvantifikacija

Postopek preverjanja sond:

1) priprava osnovnega standarda

Najprej smo pripravili osnovni standard tako, da smo zmešali po 2 μL cDNA vseh 45 vzorcev. Iz tega osnovnega standarda cDNA z izhodiščno koncentracijo 50 ng/ μL , smo nato pripravili pet standardov s koncentracijami 4, 2, 1, 0,5 in 0,25 ng/ μL . Te redčitve standardov so nam služile za pripravo standardne krivulje (za vsak gen posebej, tudi za referenčni gen).

2) priprava različnih kontrolnih vzorcev (NTC in »-RT vzorci«)

Poleg različnih koncentracij standardov, smo pripravili tudi različne kontrolne vzorce. S kontrolnim vzorcem »negativne kontrole« NTC (ang. no template control), ki je zmes vseh reagentov brez dodane cDNA (namesto cDNA dodamo enak volumen vode brez RNaz), smo preverili morebitno kontaminacijo reagentov ali nastanek dimerov. Z drugim kontrolnim vzorcem, imenovanim »negativni RT« vzorec (»-RT« vzorec), preverimo, če morda naše sonde podvajajo gDNA. »-RT« vzorec je prepisana RNA v cDNA, kjer v prepis dodamo vse reagente in vzorec RNA, ne dodamo pa encima reverzne transkriptaze.

3) priprava reakcijske zmesi

Za vsak posamezni gen smo pripravili svojo reakcijsko zmes po preglednici VI. Vsak gen smo pipetirali v svojo vrstico na mikrotiterski ploščici. Najprej smo v ustreerne vrstice ploščice s 384 vdolbinicami nanesli pripravljeno reakcijsko zmes. Nato smo dodali še standarde, NTC in RT-kontrolne vzorce po priloženi shemi nanosa, navedenega na sliki 12.

4) nanos standardov in kontrolnih vzorcev na mikrotitersko ploščico

Vseh pet standardov (konc. 4, 2, 1, 0,5 in 0,25 ng/µL) smo na mikrotitersko ploščico nanesli v duplikatih. NTC vzorec smo nenesli na ploščico v trojniku, oba »-RT« vzorca pa v dvojniku (slika 12).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17....
A	st1	-	st2	-	st3	-	st4	-	st5	-	NTC	-	-	3-RT	-	10-RT	-
B	st1	-	st2	-	st3	-	st4	-	st5	-	NTC	-	-	3-RT	-	10-RT	-
C	st1	-	st2	-	st3	-	st4	-	st5	-	NTC	-	-	3-RT	-	10-RT	-
D																	
E																	
F																	
G...																	

Slika 12: Shema nanosa standardov in kontrolnih vzorcev na mikrotitersko ploščico s 384 vdolbinicami (A – RANKL, B – OPG, C – GAPDH)

5) Napipetirano ploščico smo prekrili s samolepilno folijo (Lightcyler sealing Foil, Roche) in nato ploščico prenesli v qPCR aparatu LC 480II (Roche, Nemčija) ter nastavili ustrezen program (preglednica VII). Po končani reakciji smo izvedli kvantifikacijo z metodo maksimuma drugega odvoda (2nd derivative maximum, Roche), s pomočjo standardne krivulje.

Ker se je pri optimizaciji qPCR izkazalo, da se pri sondi za GAPDH podvaja tudi v vzorcih prisotna gDNA, smo to sondo zamenjali z oligonukleotidnimi začetniki za GAPDH. Sondi za RANKL in OPG nista podvajali gDNA in smo ju uporabili za merjenje izražanja genov v naših vzorcih.

3.7.3. Merjenje izražanja genov za RANK in GAPDH (qPCR z uporabo oligonukleotidnih začetnikov in interkelirajočega barvila EvaGreen)

Za merjenje izražanja gena za RANK ni komercialno pripravljenih sond, zato je bilo potrebno samostojno oblikovati smerni (F) in protismerni (R) oligonukleotidni začetnik. Oblikovala ju je dr. Janja Dragojevič, mag. farm. s pomočjo računalniškega programa QuantPrime qPCR Primer Design Tool (Universitat Postdam, AG Bioinformatics, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Nemčija) in znanega zaporedja tega gena.

Ker je sonda za GAPDH pomnoževala gDNA, smo jo morali zamenjali z oligonukleotidnima začetnikoma za GAPDH, ki smo ju našli v članku (72) in ju preverili s pomočjo računalniškega programa Primer BLAST (NCBI, ZDA). V preglednici VIII je navedeno nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za RANK in GAPDH.

Preglednica VIII: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za RANK in GAPDH (Sigma Aldrich) za qPCR:

gen	začetnik	zaporedje (5`- 3`)	Tm
Rn-RANK	F-začetnik	5`TTCGGAGCTAACATCCCTTGC3`	71,4 °C
	R-začetnik	5`ACATCTGAGAAGAAGGCCAGGAG3`	66,9 °C
Rn-GAPDH	F-začetnik	5`TGATTCTACCCACGGCAAGTT3`	65,5 °C
	R-začetnik	5`TGATGGTTCCCATTGATGA3`	67,2 °C

Z uporabo oligonukleotidnih začetnikov moramo za detekcijo fluorescence in kvantifikacijo nastalega PCR produkta uporabiti fluorescentna DNA interkelirajoča barvila. Mi smo uporabili barvilo EvaGreen (Solis Biodyne). Ko barvilo ni vezano v dvovijačno DNA ima nezaznavno fluorescenco, med PCR reakcijo pa se s povečano količino nastale dvovijačne DNA vrine v mali žleb (ang. minor groove) dvovijačnice. Pri tem se posledično poveča intenziteta fluorescence in količina nastale florescence je tako

sorazmerna s količino nastale dvovijačne DNA (66 – 70). Ker se barvilo veže v vse dvovijačne DNA prisotne v zmesi, tudi v nespecifične dvovijačne produkte in nastale dimere oligonukleotidnih začetnikov, je ta način detekcije nespecifičen. Prisotnost nespecifičnih produktov preverimo z analizo talilne krivulje (T_m – temperatura taljenja; ang. melting temperature) (69, 70). Analizo T_m izvedemo po končani qPCR reakciji, ko aparat počasi segreje zmes od 40 °C do 95 °C in pri tem kontinuirano meri količino fluorescence. Količina fluorescence bo visoka pri nizkih temperaturah (vsi PCR produkti so dvovijačni), z zviševanjem temperature pa se bo zmanjševala - nastalo bo vse več enovijačnih produktov zaradi disociacije dvovijačnic, pri tem se bo barvilo sprostilo. Največji padec fluorescence bomo zaznali okoli T_m PCR produkta, ko je polovica DNA verige v obliki enovijačnice (66, 67, 69, 70).

Postopek optimizacije oligonukleotidnih začetnikov:

1) priprava različnih koncentracij oligonukleotidnih začetnikov

Liofiliziranim oligonukleotidnim začetnikom za RANK in GAPDH smo dodali ultra čisto vodo po navodilih proizvajalca. S tem smo pripravili osnovno koncentracijo 100 μM , iz katere smo nato pripravili delovno raztopino s koncentracijo 20 μM . Za optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov smo pripravili reakcijsko zmes z naslednjimi koncentracijami oligonukleotidnih začetnikov: 600 nM, 300 nM, 200 nM in 100 nM.

2) priprava reakcijske zmesi

Za vsak posamezni gen smo pripravili reakcijsko zmes, kot je navedeno v preglednici IX.

Preglednica IX: Sestava reakcijske zmesi za optimizacijo oligonukleotidnih začetnikov genov za RANK in GAPDH, za reakcijo qPCR

koncentracija oligonukleotidnih začetnikov	600 nM	300 nM	200 nM	100 nM
sestava reakcijske zmesi	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)	volumen (μL)
ultra čista voda	6,85	6,7	6,4	6,1
F-oligonukleotidni začetnik ($c = 20 \mu\text{M}$)	0,075	0,15	0,225	0,45
R-oligonukleotidni začetnik ($c = 20 \mu\text{M}$)	0,075	0,15	0,225	0,45
5×HOT FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus (no Rox)	3,0	3,0	3,0	3,0
cDNA (2 ng/ μL)	5,0	5,0	5,0	5,0
Σ volumen zmesi	15	15	15	15

3) priprava različnih koncentracij standardov

Za določitev standardne krivulje uporabimo iste standarde, ki smo jih pripravili že za preverjanje sond (standardi s koncentracijami 4, 2, 1, 0,5 in 0,25 ng/µL cDNA),

4) priprava različnih kontrolnih vzorcev (NTC in »-RT vzorci«)

Uporabili smo iste kontrolne vzorce kot pri sondah (NTC kontrolne vzorce in »-RT vzorce«). S kontrolnim vzorcem NTC smo preverili morebitno kontaminacijo reagentov in nastanek dimerov. Z »negativnim RT« vzorcem (»-RT« vzorec), smo preverili, če naši oligonukleotidni začetniki morda podvajajo gDNA.

5) nanos standardov in kontrolnih vzorcev na mikrotitersko ploščico

Vseh pet standardov s koncentracijami 4, 2, 1, 0,5 in 0,25 ng/µL smo na mikrotitersko ploščico nanesli v dvojniku, NTC vzorec v trojniku, oba »-RT« vzorca pa prav tako v dvojniku. Shema nanosa standardov in kontrolnih vzorcev je navedena na sliki 13.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
A	St1	-	St2	-	St3	-	St4	-	St5	-	NTC	-	-	3-RT	-	10-RT	-
B	200 nM	-	NTC	-	300 nM	-	NTC	-	600 nM	-	NTC	-					
C	St1	-	St2	-	St3	-	St4	-	St5	-	NTC	-	-	3-RT	-	10-RT	-
D	100 nM	-	NTC	-													
E																	
F																	
G....																	

Slika 13: Shema nanosa standardov in kontrolnih vzorcev na mikrotitersko ploščico s 384 vdolbinicami (A – pet standardov s koncentracijo oligo. začet. 100 nM, NTC in »-RT vzorci za optimizacijo RANK«, B – standard 2 s konc. oligo. začet. 200 nM, 300 nM in 600 nM , C – pet standardov s koncentracijo oligo. začet. 100 nM za optimizacijo GAPDH, D – standard 2 s koncentracijo oligo. začet. 100 nM za GAPDH)

6) Napipetirano ploščico smo prekrili s samolepilno folijo (LightCycler sealing foil, Roche), in jo prenesli v qPCR aparatu LC 480II (Roche). Na aparatu smo nastavili program naveden v preglednici X. Po končani reakciji smo izvedli kvantifikacijo z metodo maksimuma drugega odvoda (2nd derivative maximum, Roche) s pomočjo standardne krivulje.

Preglednica X: Program in pogoji reakcije qPCR na aparatu LC480II (Roche) za oligonukleotidne začetnike proizvajalca Sigma (pogoji so prilagojeni za $5 \times$ Hot FirePol EvaGreen qPCR Mix Plus (no Rox), Solis Biodyne, Estonija)

faza	temperatura	čas	št. ciklov
začetna denaturacija	95°C	15 min	1
denaturacija	95°C	30 s	50 × kvantifikacija
prileganje in podaljševanje	60°C 72°C	30 s 30 s	
analiza talilne krivulje (Tm)	65 °C - 97 °C		

Po končani qPCR reakciji smo izvedli še analizo talilne krivulje (določitev Tm). Pri tem smo preverili specifičnost nastalih produktov, nastanek morebitnih nespecifičnih produktov, dimerov in možne kontaminacije. Pri tem je bilo pomembno, da je nastal le en produkt in da ni bilo prisotnih nespecifičnih produktov, prisotnosti pomnožene gDNA ali dimerov.

Optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov je bila tista koncentracija, pri kateri smo dobili najnižje Cq vrednosti in specifičen produkt.

Material in reagenti:

- bele ploščice s 384 vdolbinicami in samolepilna folija (Roche Diagnostic Corporation, Mannheim, Nemčija)
- pipete in pipetni nastavki
- 5 mL in 1,5 µL epruvetke
- stojala za epruvetke
- univerzalna zmes reagentov za sonde (Solis Biodyne, Tartu, Estonija): $5 \times$ HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (no ROX) – zmes vsebuje:
 - ✓ HOT FIREPol® DNA polimerazo
 - ✓ $5 \times$ Probe qPCR pufer
 - ✓ 15 mM MgCl₂
 - ✓ dNTP-ji (vključno dTTP za povečanje občutljivosti in učinkovitosti v primerjavi z dUTP)
 - ✓ ne vsebuje barvila ROX

- zmes komercialno pripravljene sonde za tarčni gen RANKL (TNFSF11); Rn00589289_m1 (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA)
- zmes komercialno pripravljene sonde za tarčni gen OPG (TNFRSF11B); Rn00563499_m1 (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA)
- zmes komercialno pripravljene sonde za tarčni gen GAPDH; Rn01462662_g1 (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA)
- univerzalna zmes reagentov za oligonukleotidne začetnike (Solis Biodyne, Tartu, Estonija): 5 × HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) – zmes vsebuje:
 - ✓ HOT FIREPol®DNA polimerazo
 - ✓ 5 × EvaGreen qPCR pufer
 - ✓ 12,5 mM MgCl₂
 - ✓ dNTP-ji (vključno dTTP za povečanje občutljivosti in učinkovitosti v primerjavi z dUTP)
 - ✓ barvilo EvaGreen
- oligonukleotidni začetniki za Rn-RANK (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija); - F-začetnik: 5`TTCGGAGCTAACATCCCTGC3`
- R-začetnik: 5`ACATCTGAGAAGAAGCCCAGGAG3`
- oligonukleotidni začetniki za Rn-GAPDH (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija); - F-začetnik: 5`TGATTCTACCCACGGCAAGTT3`
- R-začetnik: 5`TGATGGTTTCCCATTGATGA3`
- voda brez RNaz in DNaz (HyClone Water, Molecular Biology Grade Water, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA)
- zaščitne rokavice lateks ali nitril brez pudra

Aparati:

- komora za čisto delo s kroženjem zraka preko UV luči - RNA UVC/T-M-AR (UV- cleaner DNA/RNA, BioSan, Riga, Latvija) – uporabljamo jo samo za pripravo PCR zmesi
- mini centrifuga z vibracijskim mešalom Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija)
- aparat za PCR v realnem času: LightCycler®480II (Roche Diagnostic Corporation, Mannheim, Germany)
- centrifuga Centric 322A (Tehnica, Slovenija)

3.7.4 STATISTIČNA ANALIZA

Statistično analizo dobljenih rezultatov izražanja genov za RANKL, RANK in OPG, smo izvedli z računalniškim programom SPSS/PASW v. 18.0.0 (IBM, Chicago, Illinois, ZDA). Za statistično analizo smo uporabili srednjo vrednost vseh meritev ($\bar{x} \pm SEM$) – za vsak parameter, za vse živali in vse skupine. Živali smo razdelili v 4. skupine, 3. in 4. skupino pa še v dve podskupini, glede na čas vstavljenega aparata (7. dan in 42. dan) - razdelitev živali v skupine je podrobnejše opisana v poglavju Materiali in metode.

Med preiskovanimi skupinami in znotraj skupin smo najprej preverili normalnost porazdelitve rezultatov s Shapiro-Wilkovim testom. Za normalno porazdeljene vrednosti vzorcev smo uporabili t-test in ANOVA pri primerjavi več skupin (parametrični testi). Za vzorce, katerih porazdelitev rezultatov se je izkazala za nenormalno, pa smo uporabili Mann-Whitneyev U test pri primerjavi dveh skupin oz. Kruskal-Wallis test, pri primerjavi več kot dveh skupin. Statistično značilne razlike so bile pri $p < 0,05$ (95 % intervala zaupanja), pri $p > 0,05$, pa ni bilo statistično značilne razlike.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. IZOLACIJA RNA IZ KOSTNIH VZORCEV IN NJENO VREDNOTENJE

Pri naši raziskavi smo merili izražanje genov, ki sestavljajo sistem RANKL/RANK/OPG. Merjenje genetskega izražanja v tkivih je možno z uporabo izolirane RNA iz ustreznih tkiv. V našem primeru so bili to vzorci čeljustnic, skupaj s tremi kočniki GK in Wi podgan. Celokupno RNA smo izolirali iz 120 ± 30 mg uprašenih vzorcev čeljustnic.

Z uporabo tekočega dušika pri trenju vzorcev kosti smo preprečili delovanje morebitno prisotnih RNaz in nadaljnjo razgradnjo RNA, ki se prične takoj po odvzemu vzorcev tkiv iz živali. Razgrajenost RNA smo pozneje ovrednotili na osnovi indeksa/vrednosti RIN (glej spodaj). Nato smo iz uprašenih vzorcev izolirali celokupno RNA po navodilih in priporočilih proizvajalca tovarniškega kompleta PureLinkTM RNA Mini Kit podjetja Ambion (postopek opisan v poglavju Materiali in metode).

Preden smo izolirano RNA lahko uporabili pri nadalnjem delu, smo jo predhodno še kvalitativno in kvantitativno ovrednotili. Izolirani celokupni RNA smo najprej izmerili koncentracijo in čistočo spektrofotometrično z UV-Vis spektrofotometrom NanoDrop ND-1000, nato pa smo ocenili še morebitno razgrajenost izolirane RNA, z metodo kapilarne elektroforeze na čipih, z aparatom Bioanalyzer 2100 (dobimo vrednost RIN).

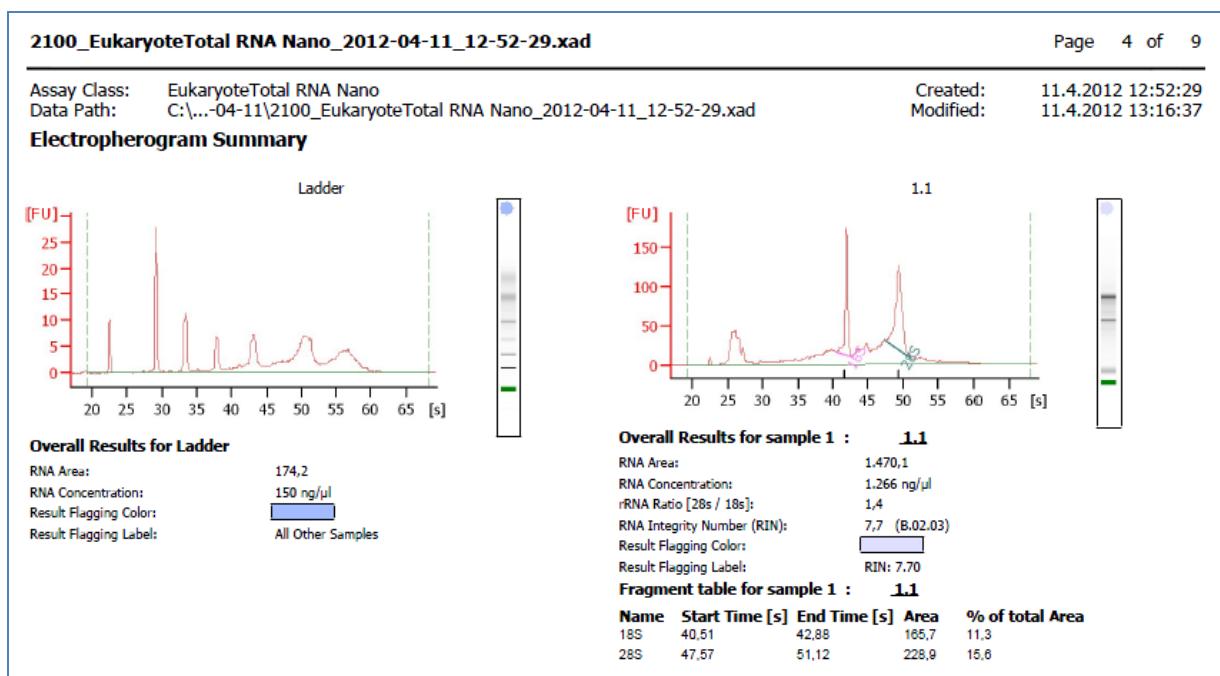
Pri valovni dolžini 260 nm smo določili koncentracijo izolirane celokupne RNA. Povprečno je bila v naših vzorcih celokupna koncentracija RNA $1105,8 \pm 487$ ng/ μ L. V preglednici XI so prikazane povprečne koncentracije izolirane RNA po skupinah živali.

Preglednica XI: Povprečne koncentracije izolirane celokupne RNA po skupinah živali

skupine vzorcev	koncentracija (ng/ μ L)
Wi brez ap (0D)	$621,4 \pm 140$
GK brez ap (0D)	$1074,62 \pm 262,17$
Wi z ap (7D)	$994,73 \pm 193,38$
GK z ap (7D)	$1809,4 \pm 414,98$
Wi z ap (42D)	$803,91 \pm 108,79$
GK z ap (42D)	$1617,37 \pm 385,83$

Z merjenjem absorbance pri dveh valovnih dolžinah 260 in 280 nm smo preverili čistost izolirane celokupne RNA. Ta podatek nam je podalo razmerje med obema valovnima dolžinama ($A_{260/280}$). Vrednost razmerja ~2,0 pomeni, da imamo izolirano čisto RNA, ob prisotnih nečistočah (npr. proteini, fenoli) pa dobimo nižje vrednosti tega razmerja. Povprečna vrednost razmerja pri naših vzorcih je bila 2,1, kar pomeni, da smo imeli izolirano čisto RNA brez prisotnih proteinov ali fenolov. Rezultati čistosti izolirane RNA so skupaj z vrednostmi RIN navedeni v preglednici XII.

Izolirano RNA smo glede razgrajenosti analizirali na aparatu Bioanalyzer 2100 in izmerili vrednost RIN (ang. RNA integrity number). Rezultati te analize so podani kot elektroferogrami, gelske slike, razmerja rRNA (razmerje med 18s in 28s rRNA vrhovoma) in vrednosti RIN. Iz elektroferograma lahko hitro ocenimo ali je naš vzorec razgrajen ali ne.

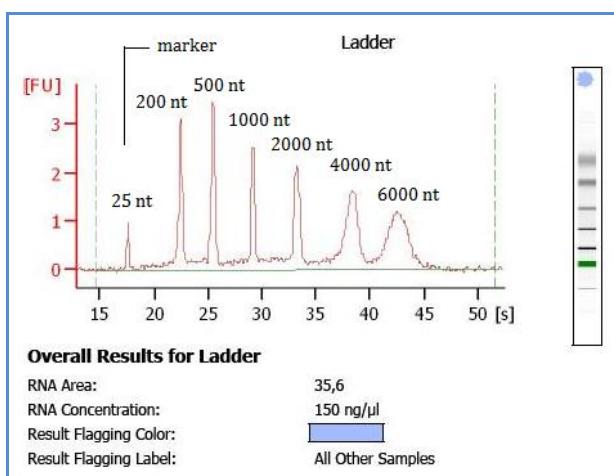


Slika 14: Primer izpisa naših rezultatov na aparatu Bioanalyzer 2100 (vidimo različne zapise rezultatov)

Molekule RNA se v gelu znotraj mikročipa ločijo po velikosti in naboju (velike molekule potujejo skozi gel počasneje od majhnih). Na elektroferogramu najprej vidimo male molekule RNA, nato pa od leve proti desni vedno večje. Prvi vrh, ki se pojavi po 41-42 sekundah je 18S rRNA, drugi vrh pa je med 45-50 sekundo in predstavlja 28S rRNA. Če je

vzorec izolirane RNA razgrajen, vidimo to v elektroferogramu kot majhne vrhove med 35-40 sekundo ali celo že prej. Večja kot je molekula RNA, kasneje jo vidimo na elektroferogramu. V primeru, da bi bila v vzorcu prisotna gDNA, bi to videli kot vrh na desni strani elektroferograma (73).

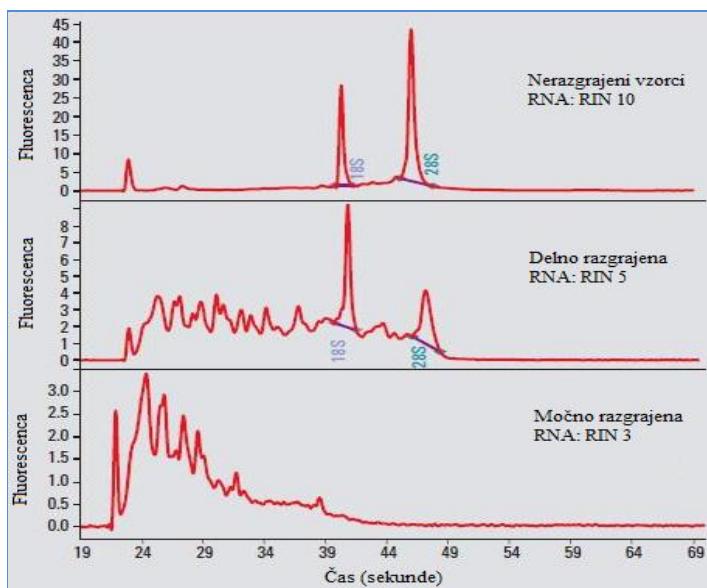
Za oceno uspešnosti pripravljenega čipa (izključitev morebitnih tovarniških napak čipa ali napak pri pripravi čipa), vedno najprej pogledamo elektroferogram zunanjega standarda - lestvice (ang. ladder), ki je mešanica RNA znanih dolžin. Prvi vrh na grafu (tako pri lestvici, kot tudi pri vzorcih) je vedno vrh markerja. Pri uspešni pripravi čipa mora krivulja lestvice imeti prisotnih vseh 6 vrhov, ki morajo biti lepo ločeni in pravilno razporejeni, kjer vsak vrh predstavlja točno določeno standardno RNA znanih dolžin. Če je tem zahtevam zadoščeno, lahko ocenimo, da je bil čip ustrezno pripravljen in lahko zaupamo tudi določitvi RIN-a naših vzorcev na tem čipu. Slika 15 prikazuje RNA lestvico in njenih šest pravilno ločenih vrhov.



Slika 15: RNA 6000 Nano lestvica (graf prikazuje vseh šest ločenih vrhov lestvice s koncentracijo 150 ng/μL; označene so tudi znane dolžine posameznih RNA molekul)

Pri analizi vzorcev RNA aparatom Bioanalyzer 2100 primerja površino pod lestvico s površino pod vrhovi vzorca in tako določi dolžino RNA. Glede na položaj vrhov aparatom tudi določi, kje sta oba ribosomalna vrhova rRNA (18S in 28S). Na elektroferogramu vzorca vidimo to kot dva izstopajoča vrhova ribosomskih RNA podenot 18S in 28S (predstavljata večinski delež celokupne RNA). Če sta ribosomalna vrhova na pravih mestih, lahko aparatom izračuna razmerje 18S/28S. Pri tem je pomembna količina fluorescence (FU) posameznega vrha - višji in ostrejši kot je posamezni vrh, večja količina

rRNA je v vzorcu izolata in bolj je RNA nerazgrajena. Taka ocena je zelo subjektivna in se danes skoraj ne upošteva več. Prav v izogib temu so znanstveniki razvili računalniški algoritmom, ki omogoča boljšo in objektivnejšo določitev razgrajenosti oz. integritete RNA kot vrednost RIN. Računalniški program oceni in primerja celotne elektroforezne poti vzorca celokupne RNA, vključno z ribosomalnimi vrhovi in prisotnostimi/odsotnimi razgrajenimi deli RNA. Za celokupno RNA analizo nam tako računalniški program aparata izračuna in poda vrednost RIN. S pomočjo RIN-a ocenimo, v kolikšni meri je naš vzorec celokupne RNA razgrajen. RIN je ovrednoten s številkami od 1 do 10, pri čemer je 10 popolnoma nerazgrajen vzorec celokupne RNA, 1 pa označuje popolnoma razgrajene vzorce celokupne RNA. Kako izgledajo elektroferogrami različno razgrajenih vzorcev, nam prikazuje slika 16.



Slika 16: Razgrajenost RNA in vrednosti RIN (74)

Najnižji še sprejemljiv RIN za vzorce tkiva je vrednost 5, kar smo ugotovili z večletnim delom na različnih vzorcih tkiva in določanju izražanja genov tudi pri vzorcih celokupne RNA z nižjim RIN-om od 5. Pri vzorcih z RIN-om nižjim od 5 se je izkazalo, da uporaba takih vzorcev za poznejšo qPCR metodo, daje zavajajoče rezultate. Pri razgrajenih vzorcih RNA je izražanje preučevanega gena znižano. To je dokazal tudi znanstvenik Fleige in sod. (61), ki je objavili članek z ugotovitvami, da RNA visoke kvalitete (visok RIN/nerazgrajena RNA) daje visoke vrednosti izražanja gena (nizki Cq), medtem ko bo RNA slabše kvalitete (nizek RIN/bolj razgrajena RNA) dala nižje vrednosti izražanja gena (višji Cq) (58, 61).

Naši vzorci izolirane RNA iz kosti podganjih čeljustnic so imeli vrednosti RIN med 7,1 in 9,1 (povprečno je bil RIN $8,1 \pm 0,6$), kar je za kostna tkiva relativno visoka vrednost RIN. RNA take kvalitete je bila primerna za uporabo v kvantitativnem qRT-PCR. Glede na izmerjene koncentracije RNA in glede na RIN smo nato lahko preračunali, kolikšen volumen izolirane RNA bomo uporabili v reakciji RT-PCR. Rezultati vrednosti RIN so zbrani v preglednici XII.

Preglednica XII: Rezultati čistote izolirane RNA (razmerje $A_{260/280}$) in vrednosti RIN po skupinah vzorcev

skupine vzorcev	$A_{260/280}$	RIN
Wi brez ap (0D)	$2,1 \pm 0,02$	$7,6 \pm 0,2$
GK brez ap (0D)	$2,09 \pm 0,01$	$8,6 \pm 0,3$
Wi z ap (7D)	$2,11 \pm 0,02$	$7,8 \pm 0,2$
GK z ap (7D)	$2,09 \pm 0,01$	$7,2 \pm 0,1$
Wi z ap (42D)	$2,08 \pm 0,03$	$8,5 \pm 0,2$
GK z ap (42D)	$2,09 \pm 0,01$	$8,6 \pm 0,3$

4.2. PREPISOVANJE IN PRIPRAVA VZORCEV ZA MERJENJE GENETSKEGA IZRAŽANJA

Pri postopku obratnega prepisovanja oz. polimerazne verižne reakcije z reverzno transkripcijo (RT-PCR), nam izolirana mRNA lahko služi kot matrica za encimsko pretvorbo te relativno nestabilne enovijačne molekule, v bolj stabilno dvovijačno, komplementarno DNA (cDNA) molekulo.

Pred prepisom smo vse vzorce celokupne RNA redčili na končno koncentracijo 50 ng/uL (v navodilih za uporabljen RT-PCR kit je ta koncentracija navedena kot maksimalna za prepis s tem kitom). Za izvedbo postopka smo uporabili tovarniško pripravljen komplet »Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit« podjetja Roche (Roche Applied Science). Po navodilih proizvajalca smo po postopku za kvantitativni RT-PCR (»Standard Procedure for Quantitative RT-PCR«) izvedli prepis (postopek je opisan v poglavju Materiali in metode). S tem postopkom smo sintetizirali cDNA, ki smo jo v nadaljevanju uporabili za merjenje izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in GAPDH v postopku qPCR.

Prisotnost genomske DNA (gDNA) v naših vzorcih cDNA nam pri študiju izražanja genov predstavlja neželeno kontaminacijo naših vzorcev, ker se med qPCR reakcijo poleg cDNA

pomnožuje tudi gDNA. Za nas to pomeni lažno spremenjene vrednosti izražanja genov, ker dobimo nižje (Cq) vrednosti, kot bi jih v resnici dobili, če gDNA ne bi bila prisotna (68). Zaradi tega pri prepisu vzorcev vedno naredimo še prepis za dva naključno izbrana vzorca celokupne RNA z najboljšo kvaliteto (vzorca z najvišjo vrednostjo RIN), imenovana »-RT« kontrolna vzorca, ki nam v naslednjem postopku qPCR služita kot kontrolna vzorca za detekcijo morebitno prisotne gDNA v naših vzorcih. Postopek priprave obeh »-RT« kontrolnih vzorcev je bil enak kot pri ostalih vzorcih, le da smo jima namesto encima reverzne transkriptaze dodali enak volumen vode brez RNaz.

4.3. MERJENJE IZRAŽANJA GENOV ZA RANKL, RANK IN OPG V KOSTNEM TKIVU

Z metodo qPCR smo po izolaciji celokupne RNA iz vzorcev čeljustnic ter prepisu cDNA, izmerili raven izražanja treh genov, ki veljajo za glavne regulatorje kostne resorpcije, gene, ki sestavlajo sistem RANKL/RANK/OPG. Kot referenčni gen smo uporabili GAPDH gen, ki je bil v predhodnih podobnih eksperimentih in na podobnih tkivih že uporabljen. S tem smo tudi omogočili primerljivost rezultatov prejšnjih in prihodnjih podobnih raziskav. V literaturi je referenčni gen za GAPDH naveden kot najmanj variabilen gen za več različnih tkiv (64, 70). To smo potrdili tudi mi z našimi predhodnimi eksperimenti, ki smo jih izvedli na podobnih tkivnih vzorcih (človeške kosti).

Izražanje vseh treh naštetih genov smo merili v kostnih vzorcih čeljustnic podgan na 7. dan (7D) in 42. dan (42D) od začetka delovanja sile na zob (namestitve superelastične vzmesti) ter na 42. dan pri skupini živali brez nameščene vzmesti oz. aparata (0. dan – 0D).

Za merjenje izražanja genov za RANKL, OPG in GAPDH smo pri qPCR uporabili hidrolizirajoče TaqMan® sonde. Ker za merjenje izražanja gena RANK ni bilo komercialno pripravljenih sond, smo sami oblikovati smerni (F) in protismerni (R) oligonukleotidni začetnik z znanim nukleotidnim zaporedjem gena in računalniškim programom QuantPrime qPCR Primer Design Tool (Universität Postdam, AG Bioinformatics, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Nemčija).

Pri optimizaciji qPCR izražanja gena za GAPDH smo ugotovili, da se je pri sondi za GAPDH poleg cDNA podvajala tudi gDNA prisotna v naših vzorcih. Zato smo to sondu zamenjali z oligonukleotidnima začetnikoma za GAPDH, katerih nukleotidno zaporedje

smo našli v članku (72) in njuno ustreznost preverili s pomočjo računalniškega programa Primer BLAST (NCBI, ZDA).

V literaturi je navedenih več možnih rešitev, kako postopamo v primeru, če pri qPCR ugotovimo prisotnost gDNA v svojih vzorcih, ki nam lažno zviša vrednosti izražanja preiskovanih genov. V primeru znanega nukleotidnega zaporedja gena, lahko sami načrtujemo oligonukleotidne začetnike tako, da se en del začetnika nalega na 3' konec enega eksona, drugi del pa na 5' konec sosednjega eksona – pri tem se bo oligonukleotidni začetnik nalegal le na cDNA (sintetizirana iz mRNA - brez prisotnih intronov), ne pa na gDNA (prisotni introni). Druga možnost pa je, da pred merjenjem izražanja genov, tretiramo vzorce cDNA z encimom DNazolI. Ta encim razgradi le gDNA, da le-ta kasneje ne moti qPCR reakcije (75). Kljub temu je možno, da so v DNaziI prisotne še nizke količine RNaz in nam lahko razgradijo našo mRNA ali celo cDNA. Zaradi te možnosti se veliko raziskovalcev uporabi DNaze raje izogiba. V zadnjem času se na tržišču že pojavljajo tudi kiti za izolacijo RNA, ki naj bi s posebnimi kolonicami med izolacijo RNA, iz vzorcev odstranile tudi prisotno gDNA.

Kljub temu, da smo pri svojem delu za izolacijo uporabili komercialno pripravljen kit in da pri analizi razgrajenosti RNA prisotnosti gDNA nismo zaznali (verjetno zaradi zelo nizkih količin), so se v kasnejših postopkih pomnoževanja (RT-PCR in qPCR) te male količine gDNA toliko pomnožile, da so prestavljala motnjo v naših vzorcih. To smo zaznali pri preverjanju sond, ko je bila Cq vrednost »-RT« kontrolnega vzorca nižja od Cq vrednosti najbolj redčenega cDNA vzorca – gDNA je prispevala k povisjanju merjenega signala in tako lažno zvišala izmerjene vrednosti izražanja preiskovanih genov.

Določili smo relativno izražanje posameznih genov za RANKL, RANK in OPG normalizirano na referenčni gen GAPDH. Rezultati so zbrani v preglednici XXII v poglavju Priloga.

4.3.1. Rezultati preverjanja sond za RANKL in OPG ter optimizacije oligonukleotidnih začetnikov za RANK in GAPDH

Sondi za RANKL in OPG, ki smo ju uporabili v naši nalogi, nista podvajali gDNA, temveč samo cDNA in sta bili primerni za merjenje izražanja teh dveh genov (to smo potrdili s preverjanjem sond pred začetkom merjeneja naših vzorcev, kjer smo dobili ostre

amplifikacijske krivulje, učinkovitost je bila od -2,89 do -3,38, vrednosti Cq »-RT« kontrolnega vzorca, pa so bile višje kot Cq najnižjega standarda s konc. 0,25 ng/µL.

Optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov je koncentracija, pri kateri dobimo najnižje Cq vrednosti in specifičen produkt. Zato moramo pred vsako novo raziskavo, izvesti preverjanje optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov, preden začnemo z merjenjem izražanja genov na naših vzorcih.

Pri optimizaciji oligonukleotidnih začetnikov, tako za RANK kot za GAPDH, smo pripravili reakcijsko zmes z naslednjimi koncentracijami oligonukleotidnih začetnikov: 600 nM, 300 nM, 200 nM in 100 nM (za vsak gen posebej). Najprej smo naredili optimizacijo oligonukleotidnih začetnikov za referenčni gen GAPDH. Kot najbolj optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov za GAPDH, se je izkazala koncentracija 100 nM (dobimo najnižji Cq). S tem smo potrdili primernost koncentracije obeh oligonukleotidnih začetnikov za GAPDH, katere smo uporabili že tudi v predhodnih raziskavah na naši katedri. V preglednici XIII je navedena sestava reakcijske zmesi za GAPDH.

Preglednica XIII: Priprava reakcijske zmesi za qPCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov za GAPDH (koncentracija: 100 nM, Sigma Aldrich)

sestava reakcijske zmesi	volumen (µL)
voda brez DNaz/Rnaz	6,85
Rn-GAPDH-F	0,075
Rn-GAPDH-R	0,075
5×HOT FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus	3,0
cDNA	5,0
Σ volumen zmesi	15,0

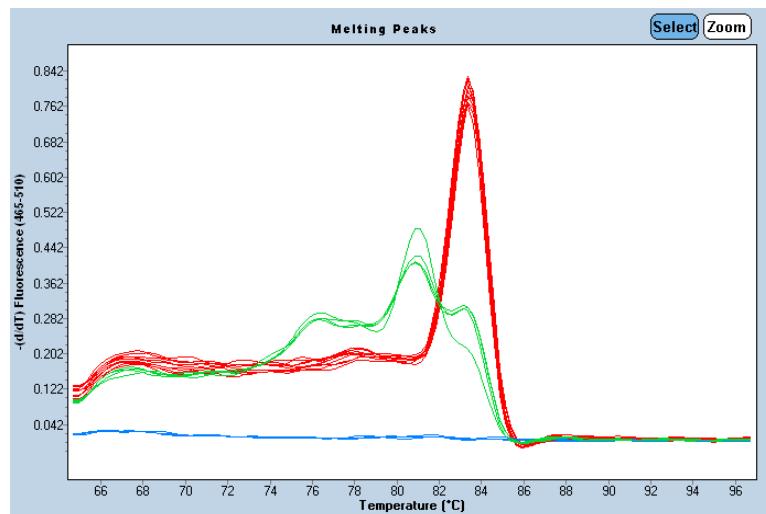
Pri optimizaciji koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za RANK, pa se je kot najbolj optimalna izkazala koncentracija 200 nM (tudi tu dobimo najnižji Cq). Sestava reakcijske zmesi za qPCR za RANK je navedena v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Priprava reakcijske zmesi za qPCR ob uporabi oligonukleotidnih začetnikov za RANK (koncentracija: 200 nM, Sigma Aldrich)

sestava reakcijske zmesi	volumen (μL)
voda brez DNaz/Rnaz	6,7
Rn-RANK-F	0,15
Rn-RANK-R	0,15
5 × HOT FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus	3,0
cDNA	5,0
Σ volumen zmesi	15,0

Najbolj optimalni koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov sta bili 200 nM (za RANK) in 100 nM (za GAPDH), katere smo nato uporabili pri merjenju izražanja obeh genov pri vseh vzorcih. Postopek dela je opisan v poglavju Materiali in metode.

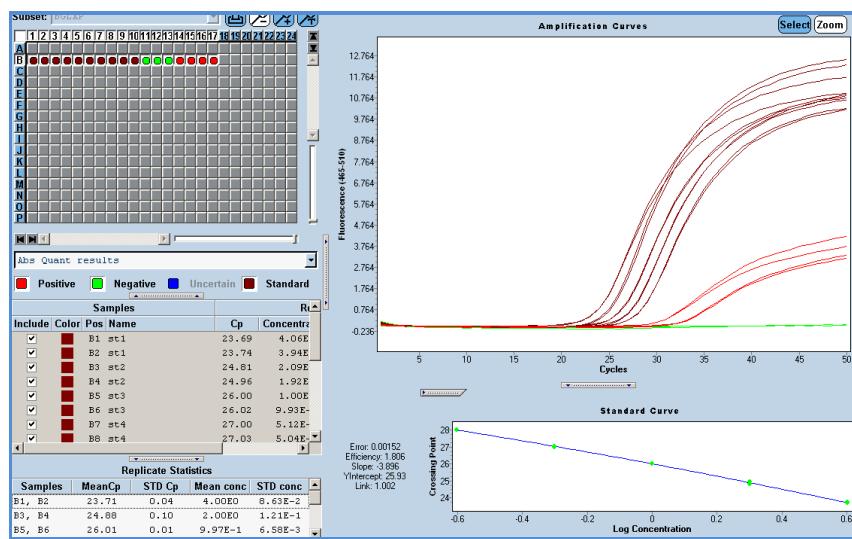
Po zaključeni qPCR reakciji, smo naredili še analizo talilne krivulje (določitev Tm). S tem smo preverili specifičnost produktov, ki so nastali, morebitni nastanek dimerov in prisotnost možnih kontaminacij. V primeru, da med qPCR reakcijo nastanejo dimeri oligonukleotidov, jih na talilni krivulji vidimo pomaknjeno v levo (zelena krivulja) od specifičnega produkta (rdeča krivulja), medtem ko bodo prisotni nespecifični produkti vidni na desni strani od specifičnega produkta.



Slika 17: Primer talilne krivulje - odvisnost negativne vrednosti prvega odvoda fluorescence po temperaturi (-dF/dT) od temperature (na sliki je viden nastanek dimerov oligonukleotidnih začetnikov - zelena krivulja in se nahaja na levi strani od specifičnega produkta - rdeča krivulja; modra krivulja je NTC vzorec; Tm = 83 °C za specifični produkt)

Za merjenje izražanja genov mora med qPCR reakcijo nastati le en specifičen produkt. Takrat lahko zaključimo, da so uporabljeni oligonukleotidni začetniki primerni za uporabo

v našem poskusu in določanju izražanja genov na vzorcih. Za nadaljnje delo so neuporabni oligonukleotidni začetniki, ki dajejo nespecifične produkte na mestu našega specifičnega produkta in nam lažno zvišujejo količino fluorescence. Prav tako so neprimerni oligonukleotidni začetniki, ki pomnožujejo gDNA ali omogočajo nastanek dimerov. Vsaka nastala nespecifičnost nam lažno spremeni rezultate.



Slika 18: Izpis na ekranu po zaključeni qPCR reakciji

Pri vseh vzorcih, ki smo jim merili izražanje genov za RANKL, RANK in OPG, smo dobili le en specifičen produkt. Rezultati izražanja genov za RANKL, RANK in OPG (podane so normalizirane vrednosti naštetih genov na hišni gen GAPDH) so podani v preglednici XXII v prilogi.

4.4. OCENA VPLIVA SB2 NA IZRAŽANJE GENOV SISTEMA RANKL/RANK/OPG

Podatki o spremembah kostne remodelacije ob prisotni sladkorni bolezni so si nasprotuječi, vendar kažejo na zmanjšano ali zapozneno tvorbo nove kosti (14, 76, 77). Ta naj bi bila posledica povečane apoptoze osteoblastnih celic zaradi prisotnih končnih produktov glikacije, ki se kopičijo pri sladkornih bolnikih (78). Poleg tega so dokazali, da visoke vrednosti glukoze »*in vitro*« lahko direktno aktivirajo osteoklaste (79). Razlike, ki so jih opazili na kosteh pri SB1 in SB2 pa pripisujejo razlikam v vrednostih inzulina pri SB1 in SB2, saj je bila potrjena povezava med vplivom inzulina, kostno remodelacijo in energetskim metabolizmom (80). Študije o OPZ pri živalskem modelu SB1, so pokazale,

da je zmanjšana tvorba alveolne kosti v primerjavi z zdravimi kontrolnimi živalmi (44). Številne raziskave so zaključile, da je kostna remodelacija med OPZ, še posebej kostna resorpcija regulirana s citokini, ki so jih kostne celice izločale kot odgovor na OPZ (45). Po nam dostopnih podatkih študij o vplivu SB2 na OPZ nismo zasledili.

V naši raziskavi smo žeeli s primerjavo rezultatov izražanja genov za RANKL, RANK in OPG v kostnem tkivu čeljustnic (znotraj podskupin in med skupinama Wi podgan ter GK podgan) preveriti, kako prisotnost SB2 vpliva na izražanje teh treh genov in preko tega vpliva na osteoklastogenezo ter kostno razgradnjo. Skupina podgan brez prisotne SB2 (skupina Wi podgan) je služila kot kontrolna skupina. Vse preiskovane skupine smo najprej testirali na normalnost porazdelitve rezultatov izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerja RANKL/OPG. Uporabili smo Shapiro-Wilkov test in testirali ničelno hipotezo (H_0), da se vzorci skupin normalno porazdeljujejo. Za vrednosti $p < 0,05$ smo zavnili H_0 - vzorci se niso normalno porazdeljevali. Vzorce skupin z normalno porazdelitvijo smo nato primerjali med seboj s t-testom, tiste z nenormalno porazdelitvijo pa z Mann-Whitney testom oz. pri primerjavi več kot dveh skupin, s Kruskal-Wallis testom za neparametirčne vzorce.

V preglednici XV so prikazani rezultati statističnega Shapiro-Wilkovega testa ($p, \alpha < 0,05$) porazdelitve normalnosti izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerja RANKL/OPG znotraj skupine Wi podgan. Enako so prikazani tudi rezultati za skupino GK podgan v preglednici XVI.

Preglednica XV: Testiranje normalnosti izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerje RANKL/OPG v kostnem tkivu čeljustnic v kontrolni skupini Wi podgan (glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), 7 dni (7D) ali 42 dni (42D) z aparatom)

izražanje gena	Wi podgane		
	0D (brez ap)	7D (z ap)	42D (z ap)
RANKL	$p = 0,754$	$p = 0,402$	$p = 0,542$
RANK	$p = 0,997$	$p = 0,044^{a*}$	$p = 0,221$
OPG	$p = 0,926$	$p = 0,024^{a*}$	$p = 0,844$
RANKL/OPG	$p = 0,003^a$	$p = 0,022^{a*}$	$p = 0,239$

a - Shapiro-Wilkov test

a* vzorce z vrednostjo $p < 0,05$ smo opredelili kot nenormalno porazdeljene (Shapiro-Wilkov test) in statistično značilne

Preglednica XVI: Testiranje normalnosti izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerje RANKL/OPG v kostnem tkivu čeljustnic v skupini GK podgan (glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), 7 dni (7D) ali 42 dni (42D) z aparatom)

izražanje gena	GK podgane		
	0D (brez ap)	7D (z ap)	42D (z ap)
RANKL	p < 0,001^{a*}	p = 0,031^{a*}	p = 0,271
RANK	p = 0,003^{a*}	p = 0,789	p = 0,475
OPG	p = 0,015^{a*}	p = 0,653	p = 0,094
RANKL/OPG	p < 0,001^{a*}	p = 0,093	p = 0,008

a - Shapiro-Wilkov test

a* vzorce z vrednostjo $p < 0,05$ smo opredelili kot nenormalno porazdeljene (Shapiro-Wilkov test) in statistično značilne

Pri testiranju skupine Wi podgan brez aparata (0D) smo za izražanje genov za RANKL, RANK in OPG ugotovili, da se vzorci porazdeljujejo normalno. Pri skupini Wi podgan z aparatom 42 dni (42D) pa smo poleg zgoraj naštetih genov, normalno porazdelitev ugotovili tudi za razmerje RANKL/OPG. Rezultate izvedenega statističnega t-testa primerjave izražanja genov za RANKL, RANK in OPG pri živalih brez aparata (0D) ter RANKL/OPG razmerje znotraj skupine Wi podgan z aparatom 42 dni (42D) prikazuje preglednica XVII. Zanimalo nas je kakšen vpliv ima prisotnost aparata na izražanje teh genov, nato pa še ali prisotnost SB2 to ugotovitev še kaj spremeni. Enako primerjavo smo naredili tudi med skupinama GK podgan brez (0D) in z vstavljenim aparatom 42 dni (42D), vendar zaradi nenormalnosti porazdelitve vrednosti vzorcev, z neparametričnim Mann-Whitney U testom (preglednica XVII).

Preglednica XVII: Primerjava izražanja genov za RANKL, RANK in OPG v kostnem tkivu čeljustnic v kontrolni skupini Wi podgan, glede na to ali so imele živali vstavljen aparat (42D) ali ne (0D); enako primerjavo smo naredili še za GK podgane (navedene so srednje normalizirane vrednosti izražanja genov skupaj s standardno deviacijo)

izražanje gena	Wi podgane			GK podgane		
	0D (brez ap)	42D (z ap)	p	0D (brez ap)	42D (z ap)	p
RANKL	3,577±1,730 (n = 9)	3,191±1,478 (n = 8)	p = 0,630 ^c	5,498±6,903 (n = 8)	3,123±1,338 (n = 7)	p = 0,536 ^b
RANK	2,613±0,789 (n = 9)	6,542±2,250 (n = 8)	p = 0,001^{c*}	2,681±1,005 (n = 8)	3,741±0,844 (n = 7)	p = 0,014^{b*}
OPG	3,323±1,105 (n = 9)	6,887±2,683 (n = 8)	p = 0,002^{c*}	3,559±1,077 (n = 8)	3,706±0,963 (n = 7)	p = 0,867 ^b

* razlike v izražanju s p vrednostjo $< 0,05$ smo opredelili kot statistično značilne

b – Mann-Whitney U test

c – t-test

Pri Wi podghanah smo primerjali podskupini brez aparata (0D) in z aparatom vstavljenim 42 dni (42D). Ugotovili smo, da je statistično značilno povečano izražanje gena za RANK in OPG pri podghanah, ki so nosile aparat cel čas poskusa (42D), v primerjavi s skupino podgan, brez aparata (0D). Pri izražanju gena za RANKL ni bilo statistično pomembnih razlik. Prisotnost aparata je povzročila povišanje RANK in OPG, kar nakazuje, da se v fazi enakomerne OPZ uravnovesi razmerje med tvorbo in razgradnjo kostnine. V fazi zastoja namreč poteka razgradnja nekrotičnega tkiva, v kateri sodelujejo tudi osteoklasti.

Ko smo enako statistično primerjavo naredili še pri skupini GK podgan, pa so bili rezultati malo drugačni. Pri primerjavi podskupine podgan brez vstavljenega aparata (0D) s podskupino, ki je imela ves čas poskusa aparat (42D), smo zasledili statistično značilno povišanje vrednosti le pri izražanju gena za RANK, medtem ko za OPG in RANKL ni bilo sprememb. Rezultati torej kažejo, da se je izražanje OPG, ki je bilo zvišano samo zaradi vzmeti oz. aparata, pravzaprav ob dodatno prisotni SB2, znižalo in postalo neznačilno. Zvišano izražanje RANK in znižano izražanje OPG pri podghanah s prisotno SB2 kaže vpliv SB2 na osteoklastogenezo – povišana je resorpcija kosti. Podobno kot mi, so povišanje izražanja gena za RANK pri živalskem modelu z vstavljenim aparatom ugotovili že tudi v raziskavi na živalskem modelu miši s SB1. V tej študiji so sicer dokazali tudi povišanje izražanja gena za RANKL po 72 urah od vstavitve aparata, v primerjavi s kontrolno skupino živali brez SB1 (84). Pri našem poskusu te razlike nismo zasledili, vendar je lahko razlika posledica tega, da je naš poskus trajal veliko dlje od prej omenjenega. Pri OPZ je zob po 72 urah še vedno v začetni fazi, medtem ko se zob po 42 dneh vstavljenega aparata, kontinuirano premika.

Ker smo ugotovili, da ima že sama prisotnost aparata vpliv na izražanje gena za RANK in OPG, smo nato med seboj primerjali še dve podskupini Wi podgan, ki so imele aparat vstavljen 7 dni (7D) in 42 dni (42D). Prav tako nas je zanimalo, kakšen bo odziv pri prisotni SB2, zato smo enako primerjavo naredili še za podskupini GK podgan. V preglednici XVIII so zbrani rezultati izražanja genov za RANKL (t-test), RANK in OPG ($p, \alpha < 0,05$) primerjave med podskupinama Wi podgan in rezultati primerjave med podskupinama GK podgan, glede na čas vstavljenega aparata (Mann-Whitney U test).

Preglednica XVIII: Primerjava izražanja genov za RANKL, RANK in OPG v kostnem tkivu čeljustnic med podskupinama Wi podgan, glede na čas vstavljenega aparata 7 dni (7D) ali 42 dni (42D); enako primerjavo smo naredili še za podskupini GK podgan (navedene so srednje normalizirane vrednosti izražanja genov skupaj s standardno deviacijo)

izražanje gena	Wi podgane			GK podgane		
	7D (z ap)	42D (z ap)	p	7D (z ap)	42D (z ap)	p
RANKL	1,840±1,105 (n = 7)	3,191±1,478 (n = 8)	p = 0,069 ^c	3,035±1,785 (n = 6)	3,123±1,338 (n = 7)	p = 0,836 ^b
RANK	2,964±0,713 (n = 7)	6,542±2,249 (n = 8)	p = 0,014^{b*}	2,660±0,313 (n = 6)	3,741±0,844 (n = 7)	p = 0,014^{b*}
OPG	2,777±1,267 (n = 7)	6,887±2,682 (n = 8)	p = 0,002^{b*}	1,723±0,394 (n = 6)	3,707±0,963 (n = 7)	p = 0,001^{c*}

* razlike v izražanju s p vrednostjo < 0,05 smo opredelili kot statistično značilne

b – Mann-Whitney U test

c – t- test

Rezultati primerjave znotraj podskupin Wi podgan z aparatom, živali z vstavljenim aparatom 7 dni (7D) in tistimi, ki so imele aparat vstavljen cel čas poskusa (42D), kažejo na statistično značilno povišanje izražanja genov za RANK in OPG pri živalih z daljšim časom vstavitve aparata (42D). Za RANKL lahko rečemo, da se le nakazuje trend povišanja izražanja gena zaradi prisotnosti aparata. To pomeni, da aparat vstavljen 42 dni (42D) povzroča stalno premikanje zob, ker je povečana kostna remodelacija.

Pri primerjavi podskupin GK podgan s 7 dnevno (7D) in 42 dnevno (42D) vstavitvijo aparata, smo prav tako ugotovili statistično značilno povišanje izražanje gena za RANK in OPG pri živalih 42 dnevno (42D) vstavitvijo aparata. Za RANKL ni bilo statistično pomembnih razlik. Razultati dokazujejo, da čas vstavljenega aparata povišuje izražanje OPG in RANK tudi v prisotnosti SB2. Povišano izražanje genov za OPG in RANK pri živalskem modelu z vstavljenim aparatom so v preteklosti dokazali tudi že nekateri znanstveniki Kobayashi in sod. (79) ter Xie in sod. (81).

Precej presenetljiva pa je »neodzivnost« izražanja RANKL na vzmet in/ali na prisotnost SB2. Druge študije sicer kažejo na povišanje RANKL, vendar pa naši rezultati tega ne morejo potrditi (73). Izmerjeno razmerje RANKL/OPG nekoliko zbistri to sliko, kar bomo razložili malo pozneje.

V nadaljevanju smo pogledali še neposredno razliko v izražanju genov s primerjavo skupin brez SB2 (Wi podgane) in s prisotno SB2 (GK podgane) ter skušali ugotoviti, ali ima prisotnost SB2 kakšen učinek na izražanje genov za RANKL, RANK in OPG. Primerjali

smo skupine glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), z aparatom 7 dni (7D) in z aparatom vseh 42 dni (42D), z uporabo neparametričnega testa Kruskal-Wallis (za nenormalno porazdeljene vrednosti) in t-testa (pri normalni porazdelitvi). V preglednico XIX je dodana tudi primerjava razmerja RANKL/OPG med temi skupinami, glede na čas vstavljenega aparata.

Preglednica XIX: Primerjava med skupinami Wi podgan (brez SB2) in GK podgan (s SB2) – podgane, ki niso imele vstavljenega aparata (0D), z vstavljenim aparatom 7. dni (7D) in 42. dni (42D); (navedene so srednje normalizirane vrednosti izražanja genov skupaj s standardno deviacijo)

izražanje gena	Primerjava med Wi podganami (brez SB2) in GK podganami (s SB2)		
	0D (brez ap) (n = 9)	7D (z ap) (n = 7)	42D (z ap) (n = 8)
RANKL	p = 0,888 ^b (3,58±1,73)	p = 0,138 ^b (1,84±1,10)	p = 0,927 ^c (3,19±1,48)
RANK	p = 0,743 ^b (2,61±0,79)	p = 0,534 ^b (2,96±0,71)	p = 0,009^{c*} (6,54±2,25)
OPG	p = 1,0 ^b (3,32±1,10)	p = 0,035^{b*} (2,78±1,27)	p = 0,011^{c*} (6,89±2,68)
RANKL/OPG	p = 0,963 ^b (1,07±0,46)	p = 0,035^{b*} (0,77±0,61)	p = 0,009^{b*} (0,48±0,17)

* razlike v izražanju s p vrednostjo < 0,05 smo opredelili kot statistično značilne

b – Mann-Whitney U test

c – t- test

Na začetku in pred vstavitevijo aparata (0D) ni značilnih razlik v izražanju nobenega gena. Prav tako ni značilnih sprememb v razmerju RANKL/OPG. Razlike se pojavijo po 7 dnevni (7D) vstavitevi aparata, ko smo zasledili značilno zvišanje izražanja gena za OPG ter razmerja RANKL/OPG pri GK podganah. Po 42. dneh, pa so razlike statistično značile tudi že za RANK. Domnevamo lahko, da zaradi zmanjšane tvorbe kostnine pri SB2 (14), med OPZ posledično pride tudi do sprememb v resorpciji kostnine preko sistema RANKL/RANK/OPG.

Ker smo z Mann-Whitneyjevim testom pri Wi podganah ugotovili statistično značilno povišanje za RANK in OPG, nas je zanimalo, kdaj oz. v kakšnem časovnem okviru se začne to statistično značilno povišanje merjenih izražanj genov za RANKL, RANK in OPG ter razmerja RANKL/OPG. Razlike smo testirali med podskupinami (glede na čas vstavljenega aparata) s Kruskal-Wallisovim testom za RANK, OPG in razmerje

RANKL/OPG, za izražanje gena za RANKL (normalna porazdelitev) pa smo izvedli ANOVA test. V preglednici XX so prikazani rezultati Kruskal-Wallis testa pri primerjavi podskupin Wi podgan glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), z aparatom 7 dni (7D) in z aparatom 42 dni (42D).

Preglednica XX: Rezultati izražanja genov za RANKL, RANK, OPG in razmerje RANKL/OPG med tremi podskupinami pri Wi podghanah (brez SB2), glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), aparat 7 dni (7D) in aparat 42 dni (42D) (Kruskal-Wallis test; podana je tudi mediana izražanja genov s 25. in 75. percentilom oz. srednja vrednost s standardno deviacijo)

Kruskal-Wallis test ($\alpha < 0,05$)	Primerjava med podskupinami Wi podgan (brez aparata ter z aparatom 7 in 42 dni)			
	p	mediana (25.; 75. percentil) ali srednja vrednost s standardno deviacijo		
		0D (brez ap) (n = 9)	7D (z ap) (n = 7)	42D (z ap) (n = 8)
RANKL	p = 0,081**	p = 0,092 (3,58 ± 1,73)	p = 0,283 (1,84 ± 1,10)	p = 0,1 (3,19 ± 1,48)
RANK	p = 0,005^f*	2,46 (2,09; 3,24)	2,67 (2,44; 3,33)	7,34 (4,52; 8,19)
OPG	p = 0,005^f*	3,22 (2,65; 4,24)	2,28 (2,05; 3,55)	7,25 (4,46; 8,97)
RANKL/OPG	p = 0,012^f*	0,97 (0,80; 1,11)	0,41 (0,37; 1,48)	0,42 (0,38; 0,65)

* razlike v izražanju s p vrednostjo $< 0,05$ smo opredelili kot statistično značilne

** – ANOVA (Bonferoni post test)

f – Kruskal-Wallis test

Ker se je le RANKL porazdeljeval normalno, smo z enosmernim ANOVA ($\alpha < 0,05$) testom med podskupinami pri Wi podghanah (glede na čas vstavljenega aparata), ugotovili le nakazane razlike za RANKL. Za RANK (p = 0,005), OPG (p = 0,005) in razmerje RANKL/OPG (p = 0,012) smo ugotovili statistično značilne razlike in sicer, po 42 dnevnu je bilo izražanje genov najvišja. Vrednosti pri vstavljenem aparatu 7 dni (7D) niso relevantne, ker je takrat zob v fazi zastoja in je znižanje vrednosti verjetno posledica nekrotiskih procesov v čeljustnici, zaradi OPZ.

Enako smo želeli ugotoviti tudi, pri kateri podskupini GK podgan (glede na čas vstavitve aparata) so statistično značilna povišanja izražanja genov za RANKL, RANK in OPG ter razmerje RANKL/OPG. V preglednici XXI so prikazani rezultati Kruskal-Wallisovega

testa pri primerjavi podskupin GK podgan, glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), z aparatom 7 dni (7D) in z aparatom 42 dni (42D).

Preglednica XXI: Rezultati izražanja genov za RANKL, RANK in OPG ter razmerje RANKL/OPG med tremi podskupinami GK podgan (s SB2), glede na čas vstavljenega aparata - brez aparata (0D), aparat 7 dni (7D) in aparat 42 dni (42D) (Kruskal-Wallis test; podana je tudi mediana izražanja genov s 25. in 75. percentilom)

Kruskal-Wallis test ($\alpha < 0,05$)	Primerjava med podskupinami GK podgan (brez aparata ter z aparatom 7 in 42 dni)			
	p	mediana (25. in 75. percentil)		
		0D (brez ap) (n = 9)	7D (z ap) (n = 7)	42D (z ap) (n = 8)
RANKL	p = 0,619 ^f	3,11 (2,28; 4,51)	2,36 (2,02; 4,07)	2,95 (2,01; 3,73)
RANK	p = 0,012^{f,*}	2,39 (2,18; 2,82)	2,70 (2,36; 2,92)	3,59 (3,04; 4,39)
OPG	p = 0,002^{f,*}	3,18 (3,09; 3,79)	1,71 (1,38; 2,09)	3,21 (3,11; 4,54)
RANKL/OPG	p = 0,085 ^f	0,98 (0,65; 1,21)	1,59 (1,03; 2,58)	0,77 (0,59; 0,92)

* razlike v izražanju s p vrednostjo $< 0,05$ smo opredelili kot statistično značilne
f – Kruskal-Wallis test

S Kruskal-Wallis testom ($\alpha < 0,05$) smo v skupini GK podgan s SB2, pri primerjavi podskupin z in brez aparata, ugotovili za RANK ($p = 0,012$) in OPG ($p = 0,002$) statistično značilne razlike in sicer, po 42 dnevnu so bila izražanja teh genov najvišja. Pri razmerju RANKL/OPG ($p = 0,085$) se je razlika že nakazovala. Za RANKL ni bilo značilnih razlik. Enako kot pri skupini Wi podgan lahko zaključimo, da so tudi pri GK skupini vrednosti za 7 dan (7D) nerelevantne, ker je takrat zob v fazi zastoja, znižanje vrednosti pa je verjetno posledica nekrotskih procesov v čeljustnici zaradi OPZ.

Sistem RANKL/RANK/OPG predstavlja glavni sistem za uravnavanje kostne razgradnje, saj je odgovoren za ustrezен razvoj in aktivnost osteoklastov, torej celic, ki kost razgrajujejo. V sistem uravnava sta vključena tako RANKL, ki po vezavi na RANK pospešuje osteoklastogenezo in kostno razgradnjo, kot tudi OPG, ki z direktno vezavo na RANKL prepreči interakcijo RANKL z RANK in tako prepreči stimulacijo osteoklastogeneze. Zato je razmerje RANKL/OPG pomembni pokazatelj, v katero smer se nagiba kostna remodelacija (v smer kostne resorpcije ali v smer tvorbe nove kosti). Pri tem

je manj pomembno, kakšne so posamezne in absolutne vrednosti RANKL oz. OPG. Z razmerjem pravzaprav dobimo podatek o funkcionalnosti celotnega regulatornega sistema RANKL/RANK/OPG. Naši rezultati kažejo na zvišano vrednosti razmerja RANKL/OPG in potrjujejo pospešeno kostno razgradnjo pri GK podganah ter našo hipotezo. Podobni rezultati so tako bili predstavljeni že v študiji znanstvenika de Amorim in sod. (82) o celjenju zloma kosti stegnenice pri diabetičnih podganah, kjer so vzrok komentirali kot povečano resorpcijsko aktivnosti osteoklastov.

V svoji raziskavi je znanstvenica Secchiero in sod. (83) dokazala, da je pri SB2 signifikantno povišana serumska koncentracija OPG in ne RANKL, v primerjavi s kontrolno skupino. Serumski OPG se je povišal zgodaj po nastopu SB2 pri miših in je pokazal pozitivno korelacijo z vrednostmi glukoze v krvi in obratno korelacijo z vrednostmi proste RANKL oblike. Povišano produkcijo OPG so pripisali zgodnjim dogodkom pri SB in neustreznemu delovanju endotelijskih celic (22).

V naši raziskavi smo dokazali, da lahko neurejen metabolizem glukoze, kot pri SB2, vpliva na kostno remodelacijo pri OPZ na živalskem modelu. V literaturi lahko zasledimo razlago, da je pri prisotni SB2 predvsem povečana kostna resorpcija in da organizem verjetno ni zmožen kompenzirati povečane razgradnje s tvorbo nove kosti. Tudi več znanstvenikov je dokazalo, da se pri ustrezni terapiji z antidiabetiki, ko se normalizira metabolni status, odziv kosti na OPZ normalizira (44, 84). Naši rezulati so pokazali tudi, da je bil fiziološki distalni premik zoba večji pri diabetični skupini podgan (GK), kar kaže na večjo kostno resorpcijo pri SB2. To pa razlagamo tako, da med OPZ tvorba nove kosti na mestu vleka, verjetno, ni uspela kompenzirati resorpcije kosti na mestu pritiska (34).

5. SKLEP

V naši nalogi smo ugotavljali ali je izražanje genov za RANKL, RANK in OPG pri SB2 spremenjeno, saj bi na ta način dokazali vpletjenost tega najpomembnejšega regulatornega sistema kostne razgradnje v kostne zaplete pri SB2. Uporabili smo živalski model podgane s SB2 (GK podgane) z vstavljenim zobnim aparatom oz. vzmetjo, ki je omogočal pospešeno kostno remodelacijo ter izmerili izražanja genov za RANKL, RANK in OPG v vzorcih čeljustnic. Glede na dobljene rezultate lahko podamo naslednje sklepe:

- 1). Z optimiziranim postopkom merjenja izražanja genov za RANKL, RANK in OPG smo uspeli zmeriti mRNA vseh treh genov brez interferenc genomske DNA (gDNA).
- 2.) Naše meritve kažejo na povečano razmerje izraženih genov RANKL/OPG pri prisotni SB2, s čimer smo uspeli potrditi našo hipotezo.
- 3.) Učinek SB2 na izražanje genov je časovno odvisen in je največji pri živalih z najdaljšo vstavitvijo aparata, 42 dni.
- 4.) Kljub odsotnemu absolutnemu povečanju izražanja RANKL zaključujemo, da je v pospešeno kostno razgradnjo pri SB2 vpletен regulatorni sistem RANKL/RANK/OPG.

Naša naloga na živalskem modelu kaže, da lahko neurejen metabolizem glukoze pri prisotni SB2 poveča kostno resorpcijo, kar je verjetno posledica povečane funkcionalne aktivnosti RANKL/RANK/OPG sistema. Nadaljne študije bodo pokazale, katere molekule, ki so prisotne pri SB2 bi lahko bile odgovorne za interakcije s sistemom RANKL/RANK/OPG in za kostne zaplete pri sladkornih bolnikih.

6. LITERATURA

1. Košnik M, Mrevlje F et al: Interna medicina, 4. izdaja, Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana 2011; poglavje 7, Sladkorna bolezen: 769-779;
2. <http://erc.endocrinology-journals.org/content/18/4/R125/F1.large.jpg> (dostopano: 19.5.2015)
3. McPherson R. A., Pincus M. R.: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd Edition, Elsevier Saunders 2011: 214-218
4. Blakytny R, Spraul M, Jude E B: The Diabetic Bone: A Cellular and Molecular Perspective, The International Journal of Lower Extremity Wounds 2011; 10(I): 16-32
5. Perše M: Poskusi na živalih v Sloveniji v številkah, Zdravstveni vestnik 2008; 77: 395-400
6. http://www.uradni-list.si/_pdf/2013/Ur/u2013038.pdf#/u2013038-pdf, Zakon o zaščiti živali (uradno prečiščeno besedilo) (ZZZiv-UPB3), 2013, *Uradni list Republike Slovenije*, XXIII, št. 38 (z dne 3. 5. 2013), str. 4455-4466 (dostopano: 25.7.2014)
7. http://www.uradni-list.si/_pdf/2013/Ur/u2013037.pdf#/u2013037-pdf, Pravilnik o pogojih za izvajanje poskusov na živalih, 2013, *Uradni list Republike Slovenije*, XXIII, št. 37 (z dne 29.4.2013), str. 4356-4416 (dostopano: 25.7.2014)
8. Perše M: Zakonodaja o uporabi živali v poskusih v Sloveniji, Zdravniški vestnik 2006; 75:719-725.
9. Fajardo R J et al: A Review of Rodent Models of Type 2 Diabetic Skeletal Fragility, JBMR 2014; 29(5): 1025-1040
10. Sprogar Š, Drevenšek G, Drevenšek M; Model ortodontskega premika zob pri podgani; Zobozdravstveni Vestnik 2007; 62: 21-26
11. Reitan K, Kvam E: Comparative Behavior of Human and Animal Tissue During Experimental Tooth Movement; Angle Orthodontist; 1971; 41: 1-14
12. Shanks N, Greek R, Greek J: Are animal models predictive for humans?; Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine 2009; 4(2): 1-20
13. Ren Y, Maltha J C, Kuijpers-Jagtman A M: The rat as a model for orthodontic tooth movement – a critical review and a proposed solution, European Journal of Orthodontics 2004, 26(5): 483-490
14. Zhang L, Liu Y et al: Bone biomechanical and histomorphometrical investment in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, Acta Diabetol 2009; 46: 11-126
15. Sajid Hamid Akash M, Rehman K, Chen S: Goto-kakizaki Rats: Its Suitability As Non-obese Diabetic Animal Model for Spontaneous Type 2 Diabetes Mellitus; Current Diabetes Reviews 2013; 9(5): 387-396
16. King A J F: The use of animal models in diabetes research; British Journal of Pharmacology 2012; 166: 877-894
17. http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/strainsx/Strains_d.aspx?StrainID=377
18. Mencej Bedrač S, Ostank B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze; Farmacevtski Vestnik 2012; 63: 269-278
19. Košnik M, Mrevlje F et al: Interna medicina, 4. izdaja, Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana 2011; Poglavlje 9, Motnje presnove kalcija in kostne bolezni: 973-1008
20. Sprogar Š, Cör A, Drevenšek G, Drevenšek M; Ortodontski premik zoba in pregrajevanje kosti; Zobozdrav Vestn 2007, 62: 129-136
21. Väänänen H K, Laitala-Leinonen: Osteoclast lineage and function; Archives of Biochemistry and Biophysics 2008; 473:132-138

22. Silva I, Branco J C: RANK/RANKL/OPG: Literature review; *Acta Reumatol Port.* 2011; 36:209-218
23. <https://www.doereport.com/imagescooked/24922w.jpg> (dostopano: 20.4.2015)
24. Sims N, Gooi J H: Bone Remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption; *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2008; 19: 444-451
25. Lee N K: Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation and Physiology; *Endocrinol Metab* 2010; 25(4): 264-269
26. Wah NG K, Romas E, Donnan L, Findlay D M: Bone biology, Baillière's Endocrinology and Metabolism; Baillière Tindall, vol 11, No. 1: 1-22
27. <http://ejo.oxfordjournals.org/content/28/3/221> (dostopano: 20.4.2015)
28. de Villiers T J: Bone health and osteoporosis in postmenopausal women; *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2009;23: 73-85
29. Boyce B F: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling, *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473(2): 139-146
30. Grimaud E, Soubigou L et al: Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) Ratio Is Increased in Severe Osteolysis; *American Journal of Pathology*, 2003; 163 (5): 2021-2031
31. Narducci P, Bareggi R, Nicolin V: Receptor Activator for Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) as an osteoimmune key regulator in bone physiology and pathology, *Acta Histochemia* 2011; (113): 73-81
32. Meh A, Sprogar Š, Drevenšek G, Drevenšek M; Presnova čeljustne kosti in modeli njenega preučevanja; *Zobozdrav Vestn* 2011; 66: 18-24
33. D'Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D et al: Biomarkers of Periodontal Tissue Remodeling during Orthodontic Thoot Movement in Mice and Men: Overview and Clinical Relevance. Hindawi Publishing Corporation vol. 2012 article ID 105873
34. Wise G E, King G J: Mechanisms of Tooth Eruption and Orthodontic Tooth Movement; *J Dent Res.* 2008; 87 (5): 414-434
35. <http://mejournals.com/kai/2015/02/07/braces-and-how-your-teeth-move/> (dostopano: 10.5.2015)
36. Räkel A, Sheehy O, Rahme E, LeLorier J; Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes; *Diabetes & Metabolism* 2008; 34: 193–205
37. Bensch L, Beaem M, Van Acker K, Willems G: Orthodontic treatment considerations in patients with diabetes mellitus; *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*; 123(1): 74-78
38. Sealand R et al: Diabetes Mellitus and Osteoporosis, *Curr Diab Rep* 2013; 13:411-418
39. Schernthaner G, Currie C J, Schernthaner G H: Do We Still Need Pioglitazone for the Treatment of Type 2 Diabetes; *Diabetes Care* 2013; 36 Supplement 2: S155-S161
40. Semple R K, Chatterjee K K, O'Rahilly S: PPAR γ and human metabolic disease; *Journal of Clinical Investigation* 2006; 116(3): 581-589
41. Gupta D, Kono T, Evans-Molina C: The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in pancreatic β cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus; *Diabetes Obes Metab* 2010; 12(12): 1036-1047
42. Larsen T M, Toubro S, Astrup A: PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy?; *International Journal of Obesity* 2003; 27: 147-161

43. de Paula F J A, et al: Novel Insights into the Relationship between Diabetes and Osteoporosis, *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26(8): 622-630
44. Villariano M E, Lewicki M, Ubios A M: Bone response to orthodontic forces in diabetic Wistar rats; *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2011; 139 (4), Supplement 1: S76-S81
45. Krishnan V, Davidovitch Z: Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force; *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2006; 126:469e.1-460e.32
46. Yamaguchi M: RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement; *Orthod Craniofac Res* 2009; 12: 113-119
47. <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/goto-kakizaki-%28gk%29-rat> (dostopano: 20.1.2015)
48. Sprogar S, Vaupotic T, Cör A, Drevenšek M, Drevenšek G: The endothelin system mediates bone modeling in the late stage of orthodontic tooth movement in rats.; *Bone* 2008; 43:740-747
49. Drevensek M, Volk J, Sprogar S, Drevensek G: Orthodontic force decreases the eruption rate of rat incisors, *Eur J Orthod* 2009; 31: 46-50
50. VanGuilder H D, Vrana K E, Freeman W M: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis; *BioTechniques* 2008; 44: 619-626
51. <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/105873/fig3/> (dostopano: 20.4.2015) in Drevensek M, Volk J, Sprogar Š, Drevenšek G: Orthodontic force decreases the eruption rate of rat incisors, 2008; <http://ejo.oxfordjournals.org/content/31/1/46.figures-only> (dostopano: 23.5.2015)
52. <https://www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en> (dostopano: 15.4.2013)
53. <http://digitalunion.osu.edu/r2/summer06/yuh/research/Ben/methods.html> (dostopano: marec 2014)
54. https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/Trizol_Plus_man.pdf (dostopano: april 2013)
55. <http://mrdnalab.com/sequencing/transcriptome-sequencing.html> (dostopano: april 2013)
56. https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf (dostopano: julij 2013)
57. http://memphys.dk/sites/default/files/files/basic_page/%3Cem%3EEedit%20Basic%20page%3Cem%3E%20UV-Vis%20spectroscopy/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf (dostopano: 21.6.2013)
58. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V et al: Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acid Res.* 2005; 33; 6:1-12
59. <http://gcf.pbrc.edu/docs/Agilent/Agilent%20Manual.pdf> (navodila za delo z bioanalizatorjem Agilent 2100 Bioanaylizer); 55-99; (dostopano: 21.6.2013)
60. http://www.cmmr.ubc.ca/sites/default/files/pdf_bioanalyzer_brochure.pdf: One platform endless possibilities for DNA, RNA, protein and cell analysis (dostopano: september 2014)
61. Fleige S, Walf V, Huch S at al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol. Lett.* 2006; 28:1601-1613
62. Černe D, Ostank B: Biomedicinska diagnostika I, Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Lj 2012: 128-135

63. www.roche-applied-science.com - navodila za »Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit« (RT-PCR), version: november 2008; (dostopano: 25.6.2013)
64. Vandesompele J et al: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes; *Genome Biology* 2002; 3(7): research0034.1-0034.11
65. <http://dare.uva.nl/document/197519>; Bakker O, Timmer D C: Housekeeping genes, a gold standard?; *Rapid Cycle Real-Time PCR methods and applications*, Springer Verlag (2004); (dostopano: 30.6.2013)
66. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska diagnostika I, Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Lj 2012: 136-147
67. Valasek M, Repa J J: The power of real-time PCR; *Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151-159
68. Wong M L, Medrano J F: Real-time PCR for mRNA quantitation; *BioTechniques* 2005; 39: 75-85
69. www.invitrogen.com; Real-time PCR: From theory to practice handbook: 1-72; (dostopano: 25.6.2013)
70. Suzuki T, Higgins P J, Crawford D R: Control Selection for RNA Quantitation; *BioTechniques* 2000; 29(2): 332-337
71. <http://www.hindawi.com/journals/mrt/2010/190434/fig1/> (dostopano: 27.10.2014)
72. Depreter M, Vandesompele J, Espeel M, Speleman F, Roels F: Modulation of the peroxisomal gene expression pattern by dehydroepiandrosterone and vitamin D: therapeutic implications; *Journal of Endocrinology* 2002; 175:779-792
73. <http://www.mobio.com/blog/2012/08/03/high-quality-rna-in-accurate-results-out-how-to-qc-your-rna/> (dostopano: 20.1.2015)
74. <http://www.chem-agilent.com/cimg/5989-1165EN.JPG> (dostopano: 13.2.2015)
75. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/18068015>; (dostopano 20.1.2015)
76. Colombo J S, Balani D, Sloan A J, Crean St J, Okazaki J, Waddington R J: Delayed osteoblast differentiation and altered inflammatory response around implants placed in incisor sockets of type 2 diabetic rats; *Clinical Oral Implants Research* 2011; 22: 578-586
77. Alikhani M, Alikhani Z et al: Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways; *Bone* 2007; 40: 345-353
78. Williams J P, Blair H C, McDonald J M, McKenna M A, Jordan S E, Williford J, Hardy R W: Regulation of Osteoclastic Bone Resorption by Glucose; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 235: 646-651
79. Kobayashi Y, Hasimoto F, Miyamoto H, Kanaoka K, Miyazaki-Kawashita Y, Nakashima T et al: Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression; *Journal of Bone and Mineral Research* 2000; 15 (10):1924-1934
80. Ferron M, Wei J et al: Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism; *Cell* 2010; 142(2): 296-308
81. Xie R, Kuijpers-Jagtman A M, Maltha J C: Inflammatory responses in two commonly used rat model for experimental tooth movement: comparison with ligature-induced periodontitis; *Archives of Oral Biology* 2011; 56 (issue 2): 159-167
82. de Amorim F P L G, Ornelas S S, Diniz S F, Batista A C, da Silva T A: Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats; *Journal of Molecular Histology* 2008; 39: 401-408

83. Secchiero P, Corallini F, Pandolfi A, Consoli A, Candido R, Fabris B, Celeghini C, Capitani S, Zauli G: An Increased Osteoprotegerin Serum Release Characterizes the Early Onset of Diabetes Mellitus and May Contribute to Endothelial Cell Dysfunction; *The American Journal of Pathology* 2006; 169(6): 2236-2244
84. Braga S M, Taddei S R, Andrade I Jr, Queiroz-Junior C M, Garlet G P, Repeke C E et al: Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model; *Eur Journal of Oral Science* 2011; 119: 7-14

7. PRILOGA

Seznam vzorcev čeljustnic poskusnih živali:

- 1) Wi podgane brez vstavljene vzmeti = Wi brez ap (0D) 1,2,3,4,5,6,7,8,9;
- 2) GK podgane brez vstavljene vzmeti = GK brez ap (0D) 1,2,3,4,5,6, 2/1,2/2;
- 3) Wi podgane z vstavljenou vzmetjo = Wi z ap
 - 3a) Wi z ap (7D) 1,2,3,4,5,6,8;
 - 3b) Wi z ap (42D) 1,2,3,4,5,7,8,9
- 4) GK podgane z vstavljenou vzmetjo = GK z ap
 - 4a) GK z ap (7D) 1,2,3,4,5,6;
 - 4b) GK z ap (42D) 3,4,5,6,7,8,9;

Preglednica XXII: Vrednosti koncentracije RNA, razmerje absorbanc ($A_{260/280}$) in RIN ter normalizirane vrednosti izražanja genov za RANKL, RANK in OPG:

vzorec	povprečna koncentracija (ng/ μ L)	$A_{260/280}$	RIN	RANKL/GAPDH	RANK/GAPDH	OPG/GAPDH
Wi brez ap (0D) 1	821,1	2,12	7,4	0,899559558	1,241700224	1,248728033
Wi brez ap (0D) 2	809,5	2,12	7,6	2,075946215	2,185360632	2,343257901
Wi brez ap (0D) 3	599,15	2,11	7,6	3,893812769	3,095908403	3,683308467
Wi brez ap (0D) 4	517,2	2,11	7,4	5,711479684	3,881513253	4,867441513
Wi brez ap (0D) 5	723,35	2,09	7,5	2,963717752	2,849061474	4,482330179
Wi brez ap (0D) 6	447,9	2,06	7,9	6,590374419	2,460673135	2,968429239
Wi brez ap (0D) 7	603,95	2,10	7,7	2,991065626	2,421402743	3,093843092
Wi brez ap (0D) 8	620,2	2,11	7,5	3,358847293	3,376742157	3,222677842
Wi brez ap (0D) 9	450	2,06	7,9	3,712353769	2,003152187	4,000776409
GK brez ap (0D) 1	771,45	2,10	9,1	2,706457633	1,82342728	2,409226833
GK brez ap (0D) 2	1278,55	2,10	8,6	1,898129685	2,370381976	3,145840925
GK brez ap (0D) 3	1175,45	2,09	8,7	2,968743037	2,16603553	3,142671027
GK brez ap (0D) 4	610,1	2,06	8,5	4,733979609	5,043863502	6,018545253
GK brez ap (0D) 5	1284,65	2,09	8,7	3,833090804	2,400661787	3,084788034
GK brez ap (0D) 6	1316,95	2,09	8,1	2,150301549	2,939519796	3,855626067
GK brez ap (0D) 2/1	1176,85	2,08	8,6	22,43520799	2,236187573	3,592681179
GK brez ap (0D) 2/2	982,95	2,10	8,8	3,260183809	2,467854681	3,219423814

vzorec	povprečna koncentracija (ng/µL)	A _{260/280}	RIN	RANKL/GAPDH	RANK/GAPDH	OPG/GAPDH
Wi z ap (7D) 1	1046,9	2,11	7,7	1,384468815	2,670983907	3,553547099
Wi z ap (7D) 2	1163,9	2,12	8	3,511427068	3,328122862	2,37125872
Wi z ap (7D) 3	1063,9	2,11	7,9	3,123055211	2,540664018	1,743099564
Wi z ap (7D) 4	701,3	2,13	8,1	1,986109458	4,407425472	5,338195478
Wi z ap (7D) 5	834,4	2,11	7,8	1,378672738	2,416153175	2,105657273
Wi z ap (7D) 6	1254	2,10	7,5	0,926899982	2,941993918	2,27915595
Wi z ap (7D) 8	898,7	2,08	7,8	0,57233038	2,444981078	2,045570554
GK z ap (7D) 1	1243,7	2,10	7,4	2,185673231	2,402489106	1,909354313
GK z ap (7D) 2	1627	2,10	7,1	2,299108453	2,565003628	1,435144541
GK z ap (7D) 3	1668,7	2,09	7,1	3,257031079	2,835525839	2,061088299
GK z ap (7D) 4	2000,8	2,10	7,1	6,50216089	3,053632391	1,515375788
GK z ap (7D) 5	2480,7	2,07	7,1	1,541066822	2,873751399	2,207301217
GK z ap (7D) 6	1835,5	2,10	7,2	2,427753434	2,232247005	1,207537388
Wi z ap (42D) 1	746,7	2,11	8,4	4,471160065	7,549385728	10,69816871
Wi z ap (42D) 2	692	2,09	8,7	5,89274723	8,320359785	7,856410335
Wi z ap (42D) 3	759,05	2,11	8,4	2,48091735	7,826852802	9,339969907
Wi z ap (42D) 4	678,5	2,11	8,5	3,767320915	8,916047493	7,428054945
Wi z ap (42D) 5	787,35	2,06	8,7	2,695743386	7,123169859	7,065453582
Wi z ap (42D) 7	873,9	2,02	8,4	1,070665113	2,437848367	2,533338153
Wi z ap (42D) 8	906,6	2,06	8,3	2,467522242	6,20826127	6,339885942
Wi z ap (42D) 9	987,2	2,06	8,3	2,68329926	3,958324191	3,834837234
GK z ap (42D) 3	1649,6	2,10	8,45	2,009161252	3,095381922	3,583658639
GK z ap (42D) 4	1747,6	2,09	8,55	2,953812194	3,591696937	3,207160851
GK z ap (42D) 5	1422,55	2,09	8,35	1,800433331	3,037672649	2,808807645
GK z ap (42D) 6	1858,1	2,09	8,1	3,731007079	5,176971771	4,538263269
GK z ap (42D) 7	2249,95	2,08	9	3,238973844	4,031708472	5,492913849
GK z ap (42D) 8	1309,85	2,08	8,8	5,733225909	4,392086484	3,201264657
GK z ap (42D) 9	1083,95	2,08	8,6	2,392099297	2,864829429	3,114296875