

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA PRIVILEGGIO

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA PRIVILEGGIO

**POVEZANOST POLIMORFIZMOV V GENU ZA *Wnt16* IN *LRP5* Z  
MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE  
PREMENE**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN *Wnt16* AND *LRP5* GENES WITH  
BONE MINERAL DENSITY AND BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE  
TURNOVER**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm.. Meritve mineralne kostne gostote in biokemičnih kazalcev kostne premene so opravili na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, Univerzitetnem kliničnem centru Maribor in v Splošni bolnišnici Celje.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. za mentorstvo in vso pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Posebna zahvala gre somentorici asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, mag. farm., ki mi je nesebično pomagala pri vseh nastalih težavah. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.

Velika hvala gre obema staršema in bratu, ki so me med študijem vzpodbujali in vame verjeli tudi v najtežjih trenutkih.

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm..

Ljubljana, marec 2015

Martina Privileggio

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

# VSEBINA

<b>VSEBINA</b> .....	<b>I</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>III</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VII</b>
<b>SEZNAM SLIK, HISTOGRAMOV IN PREGLEDNIC</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. OSTEOPOROZA</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze .....	1
1.1.2. Genetska nagnjenost k osteoporozi .....	2
1.1.3. Metode iskanja kandidatnih genov za osteoporozo .....	4
<b>1.2. SIGNALNA POT Wnt</b> .....	<b>7</b>
1.2.1. Od $\beta$ -katenina odvisna signalna pot Wnt (angl. <i>canonical pathway</i> ) .....	8
1.2.2. Od $\beta$ -katenina neodvisna signalna pot Wnt (angl. <i>non-canonical pathway</i> ) .....	9
<b>1.3. WNT16</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Polimorfizmi v genu za Wnt16 in njihov klinični pomen .....	11
<b>1.4. LRP5</b> .....	<b>11</b>
1.4.1. Polimorfizmi v genu za LRP5 in njihov klinični pomen .....	12
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. SPLOŠNA OPOZORILA ZA DELO</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2. OPIS PREISKOVANCEV</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3. PCR V REALNEM ČASU</b> .....	<b>17</b>
3.3.1. Načini detekcije produktov PCR v realnem času .....	18
3.3.2. Mehanizem detekcije PCR produktov s sondami TaqMan <sup>®</sup> .....	18
3.3.3. Uporaba sond TaqMan <sup>®</sup> za alelno diskriminacijo .....	19
<b>3.4. POMNOŽEVANJE ODSEKA EKSONA <i>Wnt16</i></b> .....	<b>20</b>
3.4.1. Priprava reakcijske zmesi .....	20

3.4.2. Reakcijski pogoji in potek PCR reakcije.....	20
3.4.3. Materiali in oprema .....	21
<b>3.5. POMNOŽEVANJE ODSEKA EKSONA LRP5.....</b>	<b>21</b>
3.5.1. Priprava reakcijske zmesi.....	21
3.5.2. Reakcijski pogoji in potek PCR reakcije.....	22
3.5.3. Materiali in oprema .....	22
<b>3.6. STATISTIČNE METODE .....</b>	<b>23</b>
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. OPTIMIZACIJA POSTOPKA GENOTIPIZACIJE.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMA rs2707466 V GENU ZA Wnt16 .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3. UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMA rs3736228 V GENU ZA LRP5.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4. OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA rs2707466 V GENU ZA Wnt16 Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PRENOVE .....</b>	<b>29</b>
4.4.1. SKUPINA MOŠKIH.....	29
4.4.2. SKUPINA PREMENOPAVZNIH ŽENSK .....	31
4.4.3. SKUPINA POMENOPAVZNIH ŽENSK .....	34
4.4.4. FARMAKOGENETSKA ANALIZA .....	36
4.4.5. POGOSTOST POLIMORFIZMA rs2707466 V GENU ZA Wnt16 MED OSTEOPOROZNIMI, OSTEOARTROZNIMI IN ZDRAVIMI PREISKOVANCI.....	39
4.4.6. PRIMERJAVA PREISKOVANCEV BREZ ZLOMA S PREISKOVANCI Z ZLOMOM.....	40
4.4.7. PRIMERJAVA REZULTATOV NAŠE RAZISKAVE Z REZULTATI DRUGIH RAZISKAV ZA POLIMORFIZEM rs2707466 V GENU ZA Wnt16.....	41
<b>4.5. OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA rs3736228 V GENU ZA LRP5 Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PRENOVE .....</b>	<b>42</b>
4.5.1. SKUPINA MOŠKIH.....	42
4.5.2. SKUPINA PREMENOPAVZNIH ŽENSK .....	45
4.5.3. SKUPINA POMENOPAVZNIH ŽENSK .....	47
4.5.4. FARMAKOGENETSKA ANALIZA .....	48
4.5.5. POGOSTOST POLIMORFIZMA rs3736228 V GENU ZA LRP5 MED OSTEOPOROZNIMI, OSTEOARTROZNIMI IN ZDRAVIMI PREISKOVANCI.....	50
4.5.6. PRIMERJAVA PREISKOVANCEV BREZ ZLOMA Z PREISKOVANCI Z ZLOMOM.....	51
4.5.7. PRIMERJAVA REZULTATOV NAŠE RAZISKAVE Z REZULTATI DRUGIH RAZISKAV ZA POLIMORFIZEM rs3736228 V GENU ZA LRP5 .....	52
<b>5. SKLEP .....</b>	<b>54</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>56</b>
<b>PRILOGE.....</b>	<b>59</b>

## POVZETEK

Osteoporozna je sistemska skeletna bolezen, ki je razširjena predvsem pri ženskah po menopavzi. Zaradi podaljševanja življenjske dobe število obolelih hitro narašča in bolezen predstavlja enega večjih zdravstvenih problemov. Za osteoporozo sta značilni nizka kostna masa in mikroarhitekturne spremembe kostnega tkiva ter posledično večje tveganje za zlom.

Na razvoj osteoporoze vplivajo številni okoljski in genetski dejavniki. Vsegenomske študije so pokazale, da so v razvoj osteoporoze vpleteni geni signalne poti Wnt, med katerimi sta se kot najpomembnejša izkazala gena *Wnt16* in *LRP5*. Signalna pot Wnt ima osrednjo vlogo v osteoblastogenezi. Preko od  $\beta$ -katenina odvisne signalne poti Wnt poteka diferenciacija prekursorjev osteoblastov v zrele osteoblaste ter zaviranje razgradnje kosti.

Namen naše raziskave je bil ugotavljanje povezanosti polimorfizmov *rs2707466* v genu za *Wnt16* in *rs3736228* v genu za *LRP5* z mineralno kostno gostoto in biokemičnimi kazalci kostne premene. Z reakcijo PCR v realnem času smo pomnožili odsek eksona *Wnt16* in *LRP5* ter z alelno diskriminacijo določili genotipe 973 preiskovancev. Primerjali smo tudi pogostost obeh polimorfizmov med osteoporoznimi, osteoartrozni in zdravimi preiskovanci. Poleg tega smo preverili, ali sta preiskovana polimorfizma povezana z odzivnostjo na zdravljenje osteoporoze z raloksifenom in alendronatom.

Relativne frekvence genotipov v celotni skupini preiskovancev pri polimorfizmu v genu za *Wnt16* so 23,6% : 42,7% : 26,1% za genotipe CC : CT : TT. Polimorfizem v genu za *Wnt16* je bil pri premenopavznih ženskah povezan z koncentracijo BALP ( $p=0,031$ ). Ugotovili smo tudi, da je polimorfizem v genu za *Wnt16* statistično značilno povezan z odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom.

Relativne frekvence genotipov v celotni skupini preiskovancev pri polimorfizmu v genu za *LRP5* so 65,0% : 20,2% : 1,6% za genotipe CC : CT : TT. Polimorfizem v genu za *LRP5* je bil pri moških povezan z mineralno kostno gostoto (MKG) ledvenega predela hrbtenice

( $p=0,016$ ), v skupini premenopavznih žensk s koncentracijo parathormona ( $p=0,007$ ) in v skupini pomenopavznih žensk z MKG kolka ( $p=0,032$ ).

V primerjavi pogostosti polimorfizma v genu za LRP5 med zdravimi, osteoporoznimi in osteoartrozni preiskovanci smo pri moških z osteoporozo ugotovili, da genotipa CT in TT predstavljata tveganje za osteoporozo. V raziskavi nismo ugotovili razlik v frekvenci obeh polimorfizmov med preiskovanci brez zloma in preiskovanci z zlomom kolka.

Rezultati naše raziskave nakazujejo, da je polimorfizem v genu za LRP5 potencialni diagnostični kazalec za identifikacijo preiskovancev z večjim tveganjem za razvoj bolezni pri moških in ženskah. *LRP5* in *Wnt16* sta gena, ki zahtevata nadaljnje raziskave za oceno funkcije in posameznega vpliva v patogenezi osteoporoze.

## ABSTRACT

Osteoporosis is a systemic skeletal disease, which is widely spread in postmenopausal women. The number of affected individuals is growing rapidly due to longer life expectancy and the disease represents one of the major public health problems. Osteoporosis is characterized by reduced bone mineral density and defects in bone microarchitecture, resulting in increased risk of fragility fractures.

The development of osteoporosis is influenced by several environmental and genetic factors. Genome-wide association studies have shown that Wnt signalling pathway genes, such as *Wnt16* and *LRP5* gene as the most promising ones, are involved in the development of osteoporosis. Wnt signalling pathway plays a central role in osteoblastogenesis. Wnts act on osteoblast precursor cells and promote their differentiation into mature osteoblasts through the  $\beta$ -catenin-dependent canonical pathway. In addition, Wnts suppress bone resorption through the same pathway.

We aimed to identify the association between the *rs2707466* polymorphism of the *Wnt16* gene and the *rs3736228* polymorphism of the *LRP5* gene with bone mineral density and biochemical markers of bone turnover. We studied 973 individuals. We also compared the frequencies of both polymorphisms between the individuals with osteoporosis, individuals with osteoarthritis and healthy individuals. We also assessed the influence of the polymorphisms on the efficacy of alendronate and raloxifene treatment.

The relative frequencies of *rs2707466* polymorphism of the *Wnt16* gene genotypes are 23,6% : 42,7% : 26,1% for genotypes CC : CT : TT. We identified an association between polymorphism of the *Wnt16* gene and serum BALP concentration ( $p=0,031$ ) in postmenopausal women. Additionally, the response to alendronate and raloxifene treatment is significantly associated with polymorphism of the *Wnt16* gene.

The relative frequencies of *rs3736228* polymorphism of the *LRP5* gene genotypes are 65,0% : 20,2% : 1,6% for genotypes CC : CT : TT. Polymorphism of the *LRP5* gene was associated with lumbar spine BMD ( $p=0,016$ ) in men, with serum parathormone



concentration ( $p=0,007$ ) in premenopausal women and with total hip BMD ( $p=0,032$ ) in postmenopausal women.

Comparing individuals with osteoporosis, individuals with osteoarthritis and healthy individuals, CT or TT genotypes in polymorphism of the *LRP5* gene were associated with an increased risk of osteoporosis. By comparing healthy individuals and individuals with osteoporotic fracture, no association was shown in any of the studied polymorphisms.

The results of our study suggest the polymorphism of the *LRP5* gene as a potential diagnostic indicator for identifying subjects with an increased risk of developing the disease in men and women. *LRP5* in *Wnt16* genes require further research to assess their functional role and the influence in the pathogenesis of osteoporosis.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>BALP</b>	kostna alkalna fosfataza (angl. bone alkaline phosphate)
<b>C</b>	citozin
<b>CTX</b>	C-terminalni telopeptid kolagena I
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>DPYR</b>	deoksipiridinolin
<b>DXA</b>	dvoenergijska rentgenska absorpciometrija (angl. dual-energy x ray absorptiometry)
<b>fn</b>	vrat stegenice (angl. femoral neck)
<b>GWAS</b>	vsegenomske študije povezanosti (angl. Genome-wide association studies)
<b>ls</b>	predel ledvene hrbtenice (angl. lumbar spine)
<b>MKG</b>	mineralna kostna gostota
<b>OPG</b>	osteoprotegerin
<b>OC</b>	osteokalcin
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>PTH</b>	parathormon
<b>RANK</b>	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B
<b>RANKL</b>	ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika $\kappa$ B
<b>SD</b>	standardna deviacija
<b>SNP</b>	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. Single nucleotide polymorphism)
<b>T</b>	timin

**tot** celoten kolk (angl. total hip)

## SEZNAM SLIK, HISTOGRAMOV IN PREGLEDNIC

<b>Slika 1</b>	Primerjava med normalno in osteoporozno kostjo
<b>Slika 2</b>	Regulacija osteoblastogeneze preko od $\beta$ -katenina odvisne signalne poti Wnt
<b>Slika 3</b>	Wnt signalna pot: brez ligandov, od $\beta$ -katenina odvisna signalna pot Wnt (A) in od $\beta$ -katenina neodvisna signalna pot Wnt (B)
<b>Slika 4</b>	Potek PCR reakcije v realnem času in detekcija PCR produktov s sondami TaqMan <sup>®</sup>
<b>Slika 5</b>	Prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan <sup>®</sup> na aparatu LightCycler <sup>®</sup>
<b>Slika 6</b>	Prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan <sup>®</sup> na aparatu ABI 7000
<b>Histogram I</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) MKG glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za Wnt16 v skupini moških preiskovancev
<b>Histogram II</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) PTH glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za Wnt16 v skupini moških preiskovancev
<b>Histogram III</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) MKG glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za Wnt16 v skupini premenopavznih žensk
<b>Histogram IV</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) BALP glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za Wnt16 v skupini premenopavznih žensk

<b>Histogram V</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) MKG glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za <i>Wnt16</i> v skupini pomenopavznih žensk
<b>Histogram VI</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) CTX glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za <i>Wnt16</i> v skupini pomenopavznih žensk
<b>Histogram VII</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) MKG glede na genotip polimorfizma <i>rs3736228</i> v genu za <i>LRP5</i> v skupini moških preiskovancev
<b>Histogram VIII</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) CTX glede na genotip polimorfizma <i>rs3736228</i> v genu za <i>LRP5</i> v skupini moških preiskovancev
<b>Histogram IX</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) MKG glede na genotip polimorfizma <i>rs3736228</i> v genu za <i>LRP5</i> v skupini premenopavznih žensk
<b>Histogram X</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) PTH glede na genotip polimorfizma <i>rs3736228</i> v genu za <i>LRP5</i> v skupini premenopavznih žensk
<b>Histogram XI</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) MKG glede na genotip polimorfizma <i>rs3736228</i> v genu za <i>LRP5</i> v skupini pomenopavznih žensk
<b>Preglednica I</b>	Seznam novih genov in lokusov, povezanih z MKG vratu stegenice ali ledvenih vretenc, ki so bili odkriti v največji študiji GWA
<b>Preglednica II</b>	Seznam genov in lokusov, ki so povezani z tveganjem za zlom
<b>Preglednica III</b>	Klinične značilnosti preiskovancev posamezne skupine

<b>Preglednica IV</b>	Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje enega odseka eksona <i>Wnt16</i>
<b>Preglednica V</b>	Reakcijski pogoji za pomnoževanje odseka eksona <i>Wnt16</i>
<b>Preglednica VI</b>	Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje enega odseka <i>LRP5</i>
<b>Preglednica VII</b>	Reakcijski pogoji za pomnoževanje odseka eksona <i>LRP5</i>
<b>Preglednica VIII</b>	Relativne frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem <i>rs2707466</i> v genu za <i>Wnt16</i> v posamezni skupini preiskovancev
<b>Preglednica IX</b>	Relativne frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem <i>rs3736228</i> v genu za <i>LRP5</i> v posamezni skupini preiskovancev
<b>Preglednica X</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) biokemičnih kazalcev kostne preнове glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za <i>Wnt16</i> v skupini moških preiskovancev
<b>Preglednica XI</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) biokemičnih kazalcev kostne preнове glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za <i>Wnt16</i> v skupini premenopavznih žensk
<b>Preglednica XII</b>	Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) biokemičnih kazalcev kostne preнове glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za <i>Wnt16</i> v skupini pomenopavznih žensk
<b>Preglednica XIII</b>	Spremembe srednjih vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne preнове po enoletnem zdravljenju z raloksifenom v skupini pomenopavznih žensk glede na genotip polimorfizma <i>rs2707466</i> v genu za <i>Wnt16</i>

- Preglednica XIV** Spremembe srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne prenove po enoletnem zdravljenju z alendronatom v skupini pomenopavznih žensk glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16*
- Preglednica XV** Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini moških preiskovancev
- Preglednica XVI** Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini ženskih preiskovank
- Preglednica XVII** Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini moških preiskovancev brez zloma in z zlomom
- Preglednica XVIII** Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini ženskih preiskovank brez zloma in z zlomom
- Preglednica XIX** Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemičnih kazalcev kostne prenove glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za *LRP5* v skupini moških preiskovancev
- Preglednica XX** Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemičnih kazalcev kostne prenove glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za *LRP5* v skupini premenopavznih žensk
- Preglednica XXI** Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemičnih kazalcev kostne prenove glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za *LRP5* v skupini pomenopavznih žensk

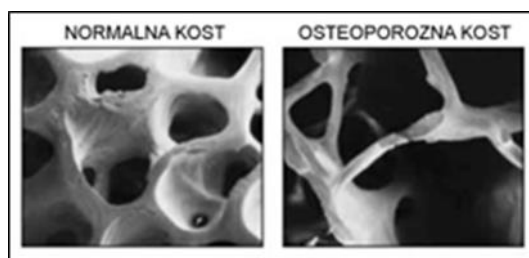
- Preglednica XXII** Spremembe srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne preнове po enoletnem zdravljenju z raloksifenom v skupini pomenopavznih žensk glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5
- Preglednica XXIII** Spremembe srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne preнове po enoletnem zdravljenju z alendronatom v skupini pomenopavznih žensk glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5
- Preglednica XXIV** Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini moških preiskovancev
- Preglednica XXV** Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini ženskih preiskovank
- Preglednica XXVI** Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini moških preiskovancev brez zloma in z zlomom
- Preglednica XXVII** Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini ženskih preiskovank brez zloma in z zlomom



# 1. UVOD

## 1.1. OSTEOPOROZA

Osteoporozoza je sistemska skeletna bolezen, za katero sta značilni nizka kostna masa in mikroarhitekturne spremembe kostnega tkiva (Slika 1). Posledično kosti postanejo bolj krhke, kar vodi v povečano tveganje za osteoporozne zlome (1). Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je definirala osteoporozo na podlagi merjenja mineralne kostne gostote (MKG) in jo opredelila kot zmanjšanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje MKG v zgodnji odrasli dobi, z upoštevanjem spola in rase. O hudi osteoporozni govorimo, kadar so pri preiskovancu prisotni osteoporozni zlomi. O osteopeniji govorimo, če je MKG zmanjšana manj od 2,5 SD do več kot 1 SD (2).



Slika 1: Primerjava med normalno in osteoporozno kostjo (2)

### 1.1.1. Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze

Osteoporozoza je večfaktorska bolezen odvisna od dejavnikov okolja in genetskih dejavnikov.

Tveganje za nastanek osteoporoze je v veliki meri odvisno od največje kostne mase (dosežene v mladosti) in od hitrosti izgube kostne mase med staranjem. Osteoporozni so predvsem izpostavljeni ženske bele in azijske rase, z zgodnjo menopavzo pred 45. letom starosti (naravna ali zaradi odstranitve jajčnikov) in majhno telesno maso (< 59 kg). Dodatni dejavniki tveganja za osteoporozo so kronične bolezni jeter, ledvic, žlez z notranjim izločanjem ter bolezni prebavil (2).

Dejavniki tveganja, na katere lahko vplivamo in s tem sami zmanjšamo tveganje za nastanek osteoporoze, so kajenje, čezmerno pitje alkohola, prehrana, ki ne vsebuje dovolj kalcija, jemanje nekaterih zdravil, predvsem glukokortikoidov, telesna neaktivnost ter pomanjkanje vitamina D (2).

Glavni dejavniki tveganja za zlom so starost, majhna MKG, majhna telesna masa, predhodni osteoporozni zlomi in pospešena razgradnja kosti. V splošnem velja, da ni zloma brez padca (izjema je delovanje gravitacije pri posedanju vretenc) in zato so zmanjšana koordinacija gibov, nestabilnost zaradi bolezni ali zdravil ter nagnjenost k padcem pomembni dejavniki tveganja za zlom. Zmanjšanje MKG za samo eno standardno deviacijo pomeni 2- do 3-krat večje tveganje za zlom. Osteoporozni bolniki, ki so že utrpeli zlom, imajo 10-krat večje tveganje za dodatne zlome. Zlomi kosti ob manjših obremenitvah pri ožjih sorodnikih prav tako povečajo tveganje za razvoj osteoporoze (2).

### **1.1.2. Genetska nagnjenost k osteoporozi**

Študije na dvojčkih (enojajčnih in dvojajčnih) ter družinah z osteoporozo so pokazale močan genetski vpliv na razvoj osteoporoze. Genetsko nagnjenost k osteoporozi oblikuje večje število genov s posamično majhnim učinkom, ki pa interagirajo med seboj in z dejavniki okolja (3). Ker je osteoporoza poligenska bolezen, so do danes proučevali številne polimorfizme v genih, ki sodelujejo pri kostni prenovi, odkrili pa so tudi mnoge z osteoporozo povezane gene, za katere pa njihova vloga v kostni biologiji še ni znana (4).

Do danes je bilo objavljenih 19 vsegenomskih študij povezanosti (GWAS – angl. *Genome-Wide-Association Studies*), od katerih je 14 samostojnih študij in 5 meta analiz. Priloga I prikazuje gene, ki so bili odkriti v posameznih študijah, statistično povezanost (P – vrednost), vrsto študije in populacijo, v kateri je bil gen odkrit (5).

Skupina raziskovalcev iz celega sveta je v okviru konzorcija GEFOS/GENOMOS izvedla do sedaj najobsežnejšo raziskavo na področju iskanja genetskih dejavnikov tveganja za osteoporozo. Raziskava je v prvi fazi vključevala 17 vsegenomskih asociacijskih študij in 32.961 Evropejcev in vzhodnih Azijcev. V drugi fazi raziskave so izvedli *de novo* genotipizacijo 96 polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP, angl. *Single nucleotide polymorphism*) in jih testirali v povezavi z MKG pri 50.933 dodatnih udeležencih iz 34

študij. Rezultati meta analize 96 SNP so pokazali povezanost 56 lokusov (32 novih) z MKG ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ). V preglednici I so prikazani novi geni in lokusi, ki so povezani z MKG vratu stegenice ali ledvenih vretenc (6).

Preglednica I: Seznam novih genov in lokusov, povezanih z MKG vratu stegenice ali ledvenih vretenc, ki so bili odkriti v največji študiji GWA (SNP angl. *Single nucleotide polymorphism* –polimorfizem posameznega nukleotida) (6)

Gen	Lokus	SNP	Gen	Lokus	SNP
<i>DNM3</i>	1q24.3	rs479336	<i>CPN1</i>	10q24.2	rs7084921
<i>PKDCC</i>	2p21	rs7584262	<i>LIN7C</i>	11p14.1	rs10835187
<i>ANAPC1</i>	2q13	rs17040773	<i>KLHDC5/PTHLH</i>	12p11.22	rs7953528
<i>INSIG2</i>	2q14.2	rs1878526	<i>ERC1/WNT5B</i>	12p13.33	rs2887571
<i>KIAA2018</i>	3q13.2	rs1026364	<i>DHH</i>	12q13.12	rs12821008
<i>LEKR1</i>	3q25.31	rs344081	<i>C12orf23</i>	12q23.3	rs1053051
<i>IDUA</i>	4p16.3	rs3755955	<i>RPS6KA5</i>	14q32.12	rs1286083
<i>SUPT3H/RUNX2</i>	6p21.1	rs11755164	<i>NTANI</i>	16p13.11	rs4985155
<i>CDKALI/SOX4</i>	6p22.3	rs9466056	<i>AXINI</i>	16p13.3	rs9921222
<b><i>WNT16</i></b>	<b>7q31.31</b>	<b>rs3801387</b>	<i>C1orf38/CLCN7</i>	16p13.3	rs13336428
<i>ABCF2</i>	7q36.1	rs7812088	<i>SALL1/CYLD</i>	16q12.1	rs1566045
<i>FUBP3</i>	9q34.11	rs7851693	<i>SMG6</i>	17p13.3	rs4790881
<i>MPP7</i>	10p11.23	rs3905706	<i>SOX9</i>	17q24.3	rs7217932
<i>MBL2/DKK1</i>	10q21.1	rs1373004	<i>FAM210A</i>	18p11.21	rs4796995
<i>KCNMA1</i>	10q22.3	rs7071206	<i>GPATCH1</i>	19q13.11	rs10416218
<i>*XKR9/LACTB2</i>	8q13.3	rs7017914	<b>**<i>FAM9B/KALI</i></b>	Xp22.31	rs5934507

\**XKR9/LACTB2* je bil odkrit v meta analizi samo pri ženskah

\*\**FAM9B/KALI* je bil odkrit v meta analizi samo pri moških

Večina odkritih genov kodira proteine iz signalne poti RANK/RANKL/OPG in Wnt ter proteine, ki sodelujejo pri diferenciaciji mezenhimskih matičnih celic in endohondralni osifikaciji. Vendar pa so odkrili tudi gene, za katere ni bilo znano, da imajo vlogo v kostni biologiji. Poleg znanih proteinov iz signalne poti Wnt, ki so povezani z MKG (*CTNNB1*, *SOST*, *LRP4*, *LRP5*, *WLS*, *WNT4* in *MEF2C*), so odkrili še *WNT5B*, *WNT16*, *DKK1*, *PTHLH*, *SERP4* in *AXINI*. Pri signalni poti diferenciacije mezenhimskih matičnih celic so odkrili povezavo *RUNX2*, *SOX4* in *SOX9* z MKG. Tudi pri endohondralni osifikaciji, ki zajema bistvene procese pri razvoju okostja pri plodu sesalcev, je vpletenih več genov, povezanih z MKG, vključno *SPPI*, *MEF2C*, *RUNX2*, *SOX6*, *PTHLH*, *SP7* in *SOX9*.

V tretji fazi raziskave so testirali 96 SNP v povezavi z zlomom pri 31.016 posameznikih z zlomom in 102.444 kontrolah (6). Fenotip je bil precej heterogen in je vseboval zlome kolka, hrbtenice, zapestja kakor tudi nizko-energijske zlome kjerkoli v skeletu razen prstov na roki in nogi ter zlomov lobanje (5). Rezultati so pokazali povezanost 14 lokusov s tveganjem za zlom ( $P < 5 \times 10^{-4}$ , pri 6 lokusov je bila dosežena  $P < 5 \times 10^{-8}$ ). V preglednici II so prikazani geni in lokusi, povezani s tveganjem za zlom (6).

Preglednica II: Seznam genov in lokusov, ki so povezani s tveganjem za zlom (SNP angl. *Single nucleotide polymorphism* – polimorfizem posameznega nukleotida) (6)

Gen	Lokus	SNP	Gen	Lokus	SNP
* <i>SPTBN1</i>	2p16.2	rs4233949	<i>CTNNA1</i>	3p22.1	rs430727
* <i>MEPE/SPP1</i>	4q22.1	rs6532023	<i>STARD3NL</i>	7p14.1	rs6959212
* <i>SLC25A13</i>	7q21.3	rs4727338	<i>WNT16</i>	<b>7q31.31</b>	<b>rs3801387</b>
* <i>MBL2/DKK1</i>	10q21.1	rs1373004	<i>FUBP3</i>	9q34.11	rs7851693
* <i>LRP5</i>	<b>11q13.2</b>	<b>rs3736228</b>	<i>DCDC5</i>	11p14.1	rs163879
* <i>FAM10A</i>	18p11.21	rs4796995	<i>RPS64A5</i>	14q32.12	rs1286083
<i>ZBTB40</i>	1p36.12	rs6426749	<i>C17orf53</i>	17q21.31	rs227584

\* $P < 5 \times 10^{-8}$

Ugotovitve obsežne raziskave osvetljujejo poligeno ozadje in zapleteno naravo osteoporoze in MKG, nakazujejo nove patofiziološke mehanizme v kostni biologiji ter lahko prispevajo k zdravljenju osteoporoze v prihodnosti (6).

### 1.1.3. Metode iskanja kandidatnih genov za osteoporozo

Pristopi za odkrivanje kandidatnih genov za razvoj osteoporoze obsegajo analize povezanosti, študije na živalih, študije povezanosti kandidatnega gena, vsegenomske študije povezanosti, funkcijske študije, meta analize in vsegenomsko sekveniranje (7).

#### Analiza povezanosti

Analiza povezanosti predstavlja klasičen pristop odkrivanja genov pri dednih monogenih boleznih pri ljudeh. Obstajata dva podtipa analiz povezanosti: parametrska in neparametrska analiza povezanosti. Parametrska analiza povezanosti vključuje določanje modela dednosti za boleznj znotraj družine (dominantne ali recesivne) ter iskanje dokazov segregacije boleznj znotraj družine po tem modelu. Neparametrska analiza povezanosti se uporablja bolj za analizo zapletenih lastnosti.

Rezultati analize povezanosti so izraženi kot lod rezultati, ki pa so definirani kot logaritem verjetnosti, da sta lokus bolezni in lokus markerja povezani. Pri parametriških analizah povezanosti se povezanost šteje za pomembno, ko je lod rezultat nad +3,3. Nasprotno pa je povezanost mogoče izključiti, ko je lod rezultat pod -2,0. Pri neparametriških analizah povezanosti se povezanost definira z lod rezultatom nad +3,6, povezanosti pa ni mogoče izključiti. Slabost analiz povezanosti je, da se pristopi zanašajo na prisotnost posamezne mutacije z zelo močnim učinkom, ki povzroča bolezen. Analiza povezanosti je bila zelo uspešna pri iskanju genskih mutacij, ki so osnova monogenih kostnih boleznih, vendar pa v veliki meri ni uspela identificirati polimorfizmov pri pogosti obliki osteoporoze (7).

### Študije na živalih

Študije na živalskih modelih pri osteoporozi predstavljajo še eden pristop pri odkrivanju genov, ki regulirajo MKG in ostale fenotipe, ki so pomembni za patogenezo osteoporoze. Pri raziskavi na živalih predvidevajo, da bo gen, ki regulira MKG pri živalih enak kot pri ljudeh. Raziskave vključujejo načrtno križanje mišk nizke in visoke MKG. Genom se pregleduje pri drugi generaciji mišk z različno MKG. Prednosti študije na živalskih modelih sta kontrolirano okolje in možnost velikega števila mišk, kar prispeva k statistično točnim rezultatom. Vendar pa gre lahko za dolgotrajen proces in je potrebnih veliko generacij mišk (7).

### Študije povezanosti kandidatnega gena

Študije povezanosti kandidatnega gena se veliko uporabljajo na področju osteoporoze in genetike ostalih kompleksnih boleznih. Pri raziskavi izberemo kandidatni gen in ugotovljamo povezanost genotipa z fenotipom, ki je največkrat MKG. Poleg MKG lahko kot fenotip uporabimo geometrijo skeleta, prisotnost zloma kosti ali spremenjeno vrednost biokemijskih kazalcev kostne premene (8). Študije povezanosti so enostavne za izvedbo in lahko odkrijejo majhne učinke alelov. Zaradi majhne velikosti vzorca in pomanjkanja standardiziranega fenotipiziranja so lahko rezultati raziskave lažno pozitivni. Zato je pomembno, da se raziskava izvaja na čim večjem številu preiskovancev, da tako dosežemo ustrezno moč raziskave in večjo relevantnost rezultatov. Slabost raziskave je sama izbira kandidatnega gena oziroma izbira polimorfizmov pozameznih kandidatnih genih. Ker  $a$

*priori* ni znano, kateri polimorfizem vpliva na razvoj osteoporoze, je pomembno, da je analiza kandidatnih genov čim bolj celovita. Študije povezanosti vključujejo tako analiziranje polimorfizmov posameznih genov z vlogo v kostni biologiji in njihovo povezavo s kvantitativno lastnostjo ter analizo več kandidatnih genov v signalni poti istočasno (7).

#### Vsegenomske študije povezanosti (GWAS – angl. *Genome-Wide-Association Studies*)

Napredek v tehnologiji genotipiziranja nam omogoča vsegenomske študije povezanosti, pri katerih lahko genotipiziramo veliko število polimorfizmov v človeškem genomu (100.000 do 1.000.000). GWAS se uporablja pri raziskavah mnogih kompleksnih bolezni. V treh letih so odkrili več kot 500 lokusov, ki predstavljajo nagnjenost za nekatere bolezni, med njimi tudi za osteoporozo. Glavna prednost GWAS je možnost odkrivanja novih poti, za katere do sedaj ni bilo znano, da so vpletene v razvoj bolezni (7). Slabost GWAS je dejstvo, da so trenutno na voljo GWAS označevalni kompleti namenjeni za prepoznavanje pogostih alelov in da ne moremo izključiti možnosti, da bi redki polimorfizmi v kandidatnem genu prispevali k preučevani lastnosti v okviru študije. Prag za statistično značilnost v GWAS so zelo visoki ( $\sim 10^{-7}$  ali  $5 \times 10^{-8}$ ) zaradi velikega števila opravljenih preskusov. Glede na to obstaja verjetnost, da številnih polimorfizmov, ki prispevajo k preučevani lastnosti, ne bodo identificirali v študiji GWA (8). Temu se raziskovalci skušajo izogniti s kombiniranjem rezultatov različnih študij GWA ter tako zvišati prag statistične značilnosti (7).

#### Funkcijske študije

Funkcijske študije so za monogenske bolezni enostavne, ker se vzročne mutacije enostavno identificirajo v družinah in imajo običajno velik vpliv na protein, ki ga kodira gen. Učinki mutacij na tarčni protein se lahko definirajo z *in vitro* študijami nenormalnih proteinov ali študijami na živalih. Mnogo težje je definirati funkcionalne mehanizme za alele z majhnim učinkom, saj je težko identificirati vzročno mutacijo.

## Meta-analize

Meta-analize se vse bolj uporabljajo na področju genetike osteoporoze. Meta-analiza se lahko izvaja retrospektivno ali prospektivno. Retrospektivna meta-analiza vključuje podatke od več različnih objavljenih študij, s čimer se poveča velikost vzorca in se pridobi natančnejša ocena velikosti učinka. Prospektiva meta-analiza vključuje nove in neobjavljene podatke. Ta pristop je bolj robusten od retrospektivne meta-analize, ker se izogne problemu pristranskosti objavljenih podatkov. Omejitev meta-analiz je predpostavka, da sta učinek in smer učinkovanja za dano genetsko variacijo enaki v vseh skupinah, vključenih v meta-analizo (7).

## Vsegenomsko sekveniranje

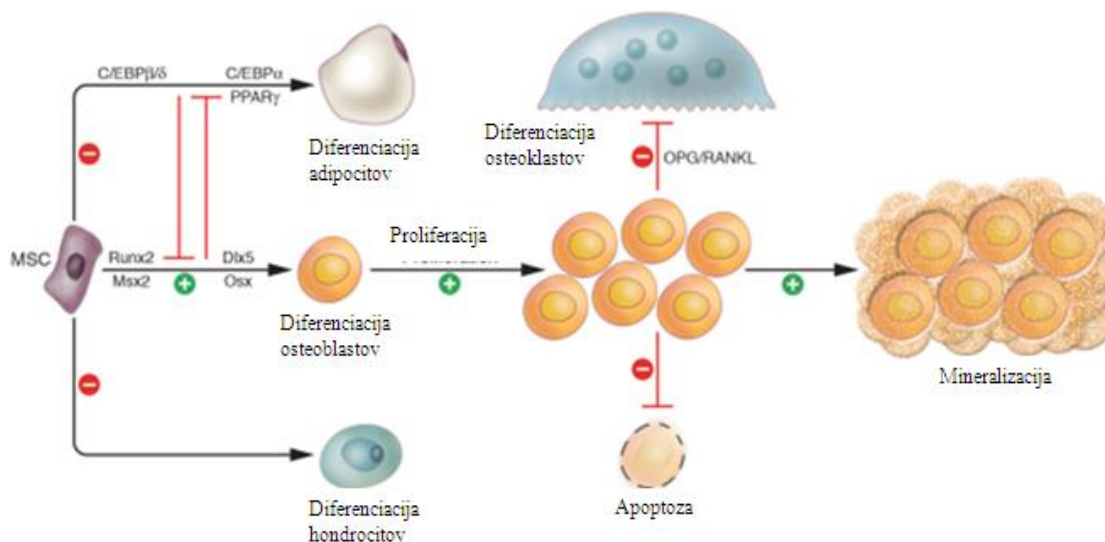
Pristop prihodnosti pri odkrivanju kandidatnih genov predstavlja vsegenomsko sekveniranje (angl. *Whole-genome sequencing*). Tehnologija sekveniranja je napredovala do te mere, da je možno ustvariti komplet katalog vseh genetskih variant, prisotnih znotraj določenega DNA zaporedja. Do sedaj so se tehnike sekveniranja uporabljale predvsem za analizo lokusov kandidata, ki so se pojavili v GWA študijah (7).

## **1.2. SIGNALNA POT Wnt**

Raziskave na področju patofizioloških mehanizmov razvoja osteoporoze so pokazale povezanost MKG z geni, ki kodirajo molekule iz signalne poti Wnt (3). *Wnt* je družina 19 sekretornih proteinov, ki delujejo kot mediatorji v pomembnih bioloških procesih (9). Signalna pot Wnt je glavni regulator nastajanja in delovanja osteoblastov, to je celic, ki gradijo kostnino (3).

Obstajata dve signalni poti Wnt, od  $\beta$ -katenina odvisna in od  $\beta$ -katenina neodvisna signalna pot. Rezultati kažejo, da so preko Wnt posredovani signali vključeni v procese nastajanja kosti, kot tudi v procese razgradnje kosti. Preko od  $\beta$ -katenina odvisne signalne poti poteka diferenciacija prekurzorjev osteoblastov v zrele osteoblaste (Slika 2). Poleg tega Wnt zavirajo razgradnjo kosti preko iste signalne poti v zrelih osteoblastih, tako da povečajo izražanje osteoprotegerina in zmanjšajo izražanje RANKL. Nasprotno pa so

raziskave pokazale, da aktivacija od  $\beta$ -katenina neodvisne signalne poti poveča z RANKL inducirano tvorbo osteoklastov. Preko od  $\beta$ -katenina neodvisne signalne poti nastajajo vnetni citokini v sinovijskih celicah pri pacientih z revmatoidnim artritisom, torej je preko od  $\beta$ -katenina neodvisne signalne poti inducirana razgradnja kosti pri vnetnih boleznih (10).



Slika 2: Regulacija osteoblastogeneze preko od  $\beta$ -katenina odvisne signalne poti Wnt (11)

### 1.2.1. Od $\beta$ -katenina odvisna signalna pot Wnt (angl. *canonical pathway*)

$\beta$ -katenin je znotrajcelična molekula, ki je vključena v celično adhezijo preko svoje interakcije z E-kaderinom in  $\alpha$ -kateninom. To je tudi molekularno vozlišče od  $\beta$ -katenina odvisne signalne poti Wnt (9). Signalna pot Wnt se aktivira z vezavo proteina Wnt na receptorski kompleks proteina Fz (angl. Frizzled) in LRP 5/6 (angl. low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6), kar v celici vodi do fosforilacije citoplazemskega dela LRP 5/6 in nastanka vezavnega mesta za aksin. Na aksin se vežeta še APC (angl. adenomatous polyposis coli) in Dsh (angl. Dishevelled), kar onemogoči nastanek kompleksa APC/aksin/GSK3 $\beta$  (angl. glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ). Na ta način je zavirana aktivnost GSK3 $\beta$  ter njena sposobnost fosforilacije  $\beta$ -katenina, kar vodi do njegovega kopičenja v citoplazmi.  $\beta$ -katenin zato prehaja v jedro, kjer preko vezave na transkripcijske dejavnike TCF/LEF1 (angl. T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor 1), sproži izražanje tarčnih genov, večjo proliferacijo osteoblastov in tvorbo kostnine (3,12).

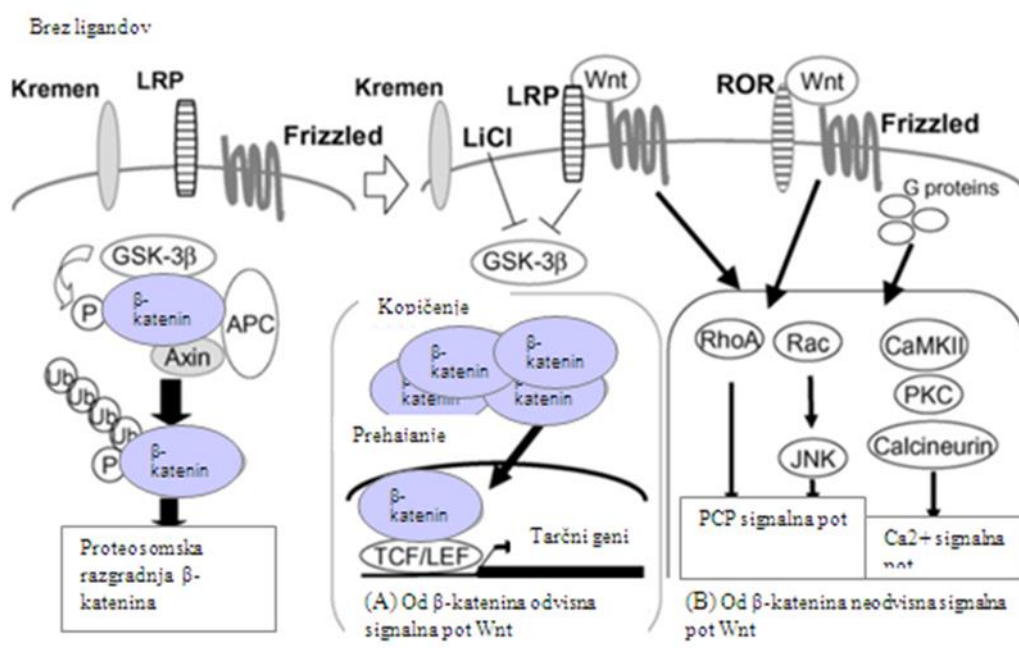


Dkks (angl. Dickkopfs) in Sfrps (angl. secreted frizzled related proteins) sta dve družini izvenceličnih proteinov, ki delujejo kot antagonisti Wnt. Dkks omejujejo razpoložljivost LRP5/6 receptorja za proteine Wnt, tako da povežejo LRP5/6 in receptor Krm (angl. Kremens) v kompleks in spodbudijo endocitozo novonastalih kompleksov v lizosome. V nasprotju se Sfrps neposredno vežejo na proteine Wnt in preprečijo vezavo proteinov Wnt z Fz in LRP5/6. V celici kompleks APC/aksin/GSK3 $\beta$  onemogoči kopičenje  $\beta$ -katenina v citoplazmi. Posledično  $\beta$ -katenin ne prehaja v jedro in ne sproži izražanja tarčnih genov (12). Signalno pot Wnt lahko zaviramo tudi preko sklerostina (SOST), ki se veže na LRP5/6 in prepreči aktivacijo Wnt (3).

### **1.2.2. Od $\beta$ -katenina neodvisna signalna pot Wnt (angl. *non-canonical pathway*)**

Mehanizem od  $\beta$ -katenina neodvisne signalne poti Wnt še ni popolnoma jasen, saj se mnenja raziskovalcev med seboj razlikujejo. V začetku so mislili, da določeni proteini Wnt signalizirajo od  $\beta$ -katenina odvisno signalno pot ter določeni proteini Wnt od  $\beta$ -katenina neodvisno signalno pot. Raziskave so pokazale, da isti protein Wnt lahko aktivira obe signalni poti Wnt (9).

Wnt5a je eden od glavnih ligandov v od  $\beta$ -katenina neodvisni signalni poti Wnt. Signalna pot Wnt se aktivira z vezavo proteina Wnt5a na receptorski kompleks proteina Fz in ROR (angl. receptor-tyrosine-kinase-like orphan receptor), pri čemer poraste znotrajcelična koncentracija kalcija. Porast znotrajcelične koncentracije kalcija aktivira fosfatazo kalcineurin, ki aktivira transkripcijski faktor NFAT (angl. nuclear factor of activated T cells). NFAT sodeluje v regulaciji osteoblastov in je potreben pri tvorbi kosti (13,14).



Slika 3: Wnt signalna pot: brez ligandov, od  $\beta$ -katenina odvisna signalna pot Wnt (A) in od  $\beta$ -katenina neodvisna signalna pot Wnt (B)

### 1.3. WNT16

*Wnt16* spada v družino genov *Wnt*, ki jo sestavljajo strukturno sorodni geni, ki kodirajo sekretorne signalizacijske proteine. Ti proteini so vpleteni v onkogenezo in v več razvojnih procesov ter delujejo kot mediatorji v signalni poti Wnt. Vloga gena *Wnt16* v razvoju okostja še ni znana. Gen *Wnt16* se nahaja na kromosomu 7 (7q31) in je sestavljen iz petih eksonov. Iz gena nastaneta dva transkripta (15,16).

Protein *Wnt16* je sekretorni protein, sestavljen iz 365 aminokislin. Nahaja se v citoplazmi in v izvenceličnem prostoru. Izoformna oblika *Wnt-16b* se izraža v perifernih limfnih organih, kot so vranica, slepič, bezgavke in ledvica, vendar ne v kostnem mozgu. Izoformna oblika *Wnt-16a* se izraža v trebušni slinavki (17).

### 1.3.1. Polimorfizmi v genu za *Wnt16* in njihov klinični pomen

Skupina raziskovalcev je testirala štiri polimorfizme lokusa 7q31 pri 2.023 bolnikih z osteoporoznimi zlomi in 3.740 kontrolnih preiskovancih. Polimorfizem *rs2707466* pri katerem pride do zamenjave aminokislinske treonin z aminokislino izolevcin v 4. eksonu *Wnt16*, je bil v raziskavi povezan z zlomi podlahti in debelino korteksa (15).

Raziskava Garcie-Ibarbie s sodelavci je pokazala povezavo dveh polimorfizmov *rs2908004* in *rs2707466* v genu *Wnt16* z MKG vratu stegenice pri 1.083 preiskovancih bele rase. V isti raziskavi so iskali povezavo omenjenih polimorfizmov z zlomom kolka. V skupini 294 pacientov in 670 kontrol ni bilo signifikantne povezave med *Wnt16* genotipi in zlomom kolka. Vendar pa je post-hoc analiza podskupine, ki je vključevala 191 pacientov in 552 kontrolnih preiskovancev, starejših od 80 let, pokazala povezavo polimorfizma *rs2908004* z zlomom (18).

Najobsežnejša raziskava na področju iskanja genetskih dejavnikov tveganja za osteoporozo je pokazala povezanost polimorfizma *rs3801387*, ki se nahaja v petem eksonu gena *Wnt16*, z MKG vratu stegenice in MKG ledvenih vretenc ter povezavo z zlomi kjerkoli v skeletu (razen prstov na roki in nogi ter zlomi lobanje) (5,6,19). Povezava polimorfizma *rs3801387* z MKG ledvenih vretenc je bila potrjena tudi v meta analizi, ki je bila omejena na premenopavzno ženske bele rase (4.061 žensk med 20 in 45 let) (19).

## 1.4. LRP5

Gen *LRP5* (angl. *low-density lipoprotein-receptor-related protein 5*) se je izkazal kot ključni regulator za morfološki razvoj in vzdrževanje fiziološke homeostaze (20). Poleg vloge koreceptorja v signalni poti Wnt in posledično vloge pri kostni prenovi ima *LRP5* vlogo pri razvoju maščobnega tkiva, homeostazi holesterola, endocitozi, regulaciji mitoze, proliferaciji mezenhimskih celic, apoptozi celic, odzivu peptidnega hormona ter v mnogih drugih procesih (21).

Vlogo LRP5 v kostni biologiji so odkrili s preučevanjem genetskega ozadja bolnikov z redkimi in skrajnimi kostnimi fenotipi, kot je osteoporozni psevdogliomni sindrom (angl. OPPG – *Osteoporosis pseudoglioma syndrome*), za katerega je značilno pomanjkanje trabekularne kostnine ob normalnem številu osteoblastov in osteoklastov ter visoka kostna masa. Pri posameznikih s fenotipom visoke kostne mase serumski markerji kažejo na povečano sintezo kosti ob normalni kostni razgradnji in arhitekturi ter normalnimi serumskimi vrednostmi kalcija, fosfatov, PTH in vitamina D (20).

Gen *LRP5* se nahaja na 11. kromosomu (11q13) in je sestavljen iz 24 eksonov (22). Protein LRP5 je sestavljen iz 1615 aminokislin (21). Protein LRP5 je zelo ohranjen med vrstami, saj je podobnost med človeškimi in mišjimi proteini 95%. LRP5 je močno izražen pri odraslih in v embrionalnih tkivih, predvsem v kosteh, makrofagih in maščobnem tkivu (v manjšem obsegu v možganih, srcu, jetri, koži in trebušni slinavki) (20).

#### 1.4.1. Polimorfizmi v genu za LRP5 in njihov klinični pomen

V raziskavah kandidatnih genov in študijah GWA je več polimorfizmov v genu za *LRP5* pokazalo povezanost s kostno maso in z zlomi. Polimorfizem *rs3736288* je najpogosteje proučevani polimorfizem posameznega nukleotida (23). Pri polimorfizmu *rs3736288* prihaja do zamenjave aminokislina alanin z aminokislino valin na osemnajstem eksonu *LRP5* (24).

Skupina raziskovalcev je v študiji GWA z 8.557 preiskovanci bele rase, starejših od 18 let, pokazala povezavo polimorfizma *rs3736288* z MKG ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ). Polimorfizem *rs3736288* v genu *LRP5* je bil povezan z zmanjšano MKG ledvenih vretenc ( $p = 6,3 \times 10^{-12}$ ) in MKG vratu stegenice ( $p = 1,9 \times 10^{-14}$ ) ter z zvečanim tveganjem za osteoporozne zlome (25).

V meta analizi, v katero je bilo vključenih pet študij GWA pri 19.195 Evropejcih, so identificirali 20 novih lokusov, povezanih z MKG vratu stegenice ter ledvenih vretenc, poleg že znanega gena LRP5, kjer je bil polimorfizem *rs599083* povezan z MKG ledvenih vretenc ( $P < 4,7 \times 10^{-8}$ ) (26).

Rezultati do sedaj najobsežnejše raziskave na področju iskanja genetskih dejavnikov tveganja za osteoporozo so pokazali povezanost 14 lokusov s tveganjem za zlom, med njimi je bil tudi lokus 11q13.2. Polimorfizem *rs3736228* je bil povezan z zvečanim tveganjem za osteoporozne zlome kjerkoli v skeletu razen prstov na roki in nogi ter zlomi lobanje ( $p = 1,4 \times 10^{-8}$ ) (6).

## 2. NAMEN DELA

V razvitem svetu se pojavnost osteoporoze zaradi staranja prebivalstva povečuje in tako postaja eden glavnih zdravstvenih problemov. Poleg dejavnikov okolja na osteoporozo vplivajo številni geni, saj je osteoporozo poligenska bolezen. V vsegenomskih študijah so pokazali, da imata pri njenem razvoju verjetno pomembno vlogo gena *Wnt16* in *LRP5*. Oba gena kodirata za proteina, ki sta del signalne poti Wnt, ki ima osrednjo vlogo v osteoblastogenezi.

Namen magistrske naloge je ugotoviti povezanost polimorfizmov *rs2707466* v genu za *Wnt16* in *rs3736228* v genu za *LRP5* z razvojem osteoporoze ter odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom. Oba preučevana polimorfizma bi lahko uporabili kot diagnostična in prognostična kazalca za identifikacijo preiskovancev z večjim tveganjem za razvoj bolezni in napovedovanje odziva na zdravljenje, proteina pa bi lahko služila kot potencialni terapevtski tarči za razvoj novih zdravil.

V ta namen bomo:

- V raziskavo vključili 973 preiskovancev, ki smo jim odvzeli polno kri, izmerili MKG in biokemične kazalce kostne preнове ter opredelili prisotnost zlomov in osteoartroze
- Z reakcijo PCR v realnem času pomnožili odsek eksona *Wnt16* in *LRP5* ter z alelno diskriminacijo določili genotipe preiskovancev
- S statistično analizo ugotovili povezanost polimorfizmov v genih za *Wnt16* in *LRP5* z MKG in biokemičnimi kazalci kostne preнове pri starejših moških ter pri premenopavznih in pomenopavznih ženskah
- S statistično analizo ugotovili vpliv polimorfizmov v genih za *Wnt16* in *LRP5* na uspešnost zdravljenja pomenopavznih žensk z osteoporozo z raloksifenom ali alendronatom
- S statistično analizo primerjali pogostost obeh polimorfizmov med zdravimi, osteoporoznimi in osteoartroznimi preiskovanci ter med zdravimi preiskovanci in preiskovanci z zlomom

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. SPLOŠNA OPOZORILA ZA DELO

Pri praktičnem delu smo uporabljali sterilen pribor za enkratno uporabo. Pred samim delom smo potrebne epice in nastavke za pipete avtoklavirali 15 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaču 1 bar.

Da bi se izognili morebitni kontaminaciji vzorcev in reagentov, smo med delom smo pazili na čistočo. Pri delu smo uporabljali rokavice iz lateksa za enkratno uporabo.

Pred začetkom dela smo delovno površino v komori ter ves pribor razkužili z 3 % natrijevim hipokloritom in osvetlili z UV svetlobo za 30 min.

#### 3.2. OPIS PREISKOVANCEV

V raziskavo smo vključili 973 preiskovancev, analizirali pa smo 889 vzorcev. Števili se razlikujeta, ker pri nekaterih preiskovancih manjkajo fenotipski podatki ali je bila količina vzorca premajhna. Preiskovance smo razdelili v naslednje podskupine:

##### Skupina moških (n=184)

- Zdravi moški, n=80
- Moški z osteoporozo, n=46
- Moški z osteoartrozo, n=36

Moške z osteoporozo smo razdelili tudi glede na prisotnost zloma kolka:

- Osteoporozni moški brez zloma kolka, n=14
- Osteoporozni moški z zlomom kolka, n=33

##### Skupina žensk (n=705)

- Zdrave ženske, n=292 (59 premenopavznih in 233 pomenopavznih žensk)
- Ženske z osteoporozo, n=362 (vse pomenopavzne)

- Ženske z osteoartrozo, n=51

Ženske z osteoporozo smo razdelili glede na prisotnost zloma kolka:

- Osteoporozne ženske brez zloma kolka, n=234
- Osteoporozne ženske z zlomom kolka, n=128

Skupino žensk smo glede na menopavzo razdelili v dve podskupini in sicer v podskupino premenopavznih žensk (n=59) in podskupino pomenopavznih žensk (n=629).

Po začetnem merjenju MKG so nekatere pomenopavzne ženske z osteoporozo začele z zdravljenjem bodisi z raloksifenom bodisi z alendronatom. 56 žensk se je 1 leto zdravilo z raloksifenom v odmerku 60 mg na dan, poleg tega so jemale še holekalciferol (400 IU na dan) in kalcijev karbonat (1000 mg na dan). 53 žensk se je 1 leto zdravilo z alendronatom v odmerku 10 mg na dan. Dodatno so jemale še kalcij (500 mg na dan) in vitamin D<sub>3</sub> (500 IU na dan). Po enem letu smo vsem ženskam ne glede na terapijo ponovno izmerili MKG (27,28).

Vsem preiskovancem so odvzeli polno kri z antikoagulantom EDTA, izmerili višino, telesno maso ter izračunali ITM (indeks telesne mase). Z metodo DXA (dvoenergijska rentgenska absorpciometrija, angl. dual-energy x-ray absorptiometry) so preiskovancem izmerili MKG na področju vratu stegenice (MKG<sub>fn</sub>), kolka (MKG<sub>tot</sub>) in ledvenih vretenc (MKG<sub>ls</sub>). Za postavitev diagnoze osteoporoze je merjenje MKG kosti obvezno, diagnoza pa je bila postavljena na osnovi kriterijev Svetovne zdravstvene organizacije.

Prav tako so preiskovancem izmerili biokemične kazalce kostne preнове, in sicer RANKL (ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B), OPG (osteoprotegerin), OC (osteokalcin), CTX (C-terminalni telopeptid kolagena I), DPYR (deoksipiridinolin), BALP (kostna alkalna fosfataza), katepsin K in vitamin D. Serumske vrednosti RANKL, OPG, CTX in katepsina K so določili z encimsko imunološko metodo. OC so izmerili v heparinizirani plazmi z uporabo kemiluminiscenčne imunokemične metode. BALP so določili z radioimunokemično metodo. Edini biokemični kazalec, ki so ga določili v urinu,



je DPYR in sicer z encimsko imunološko metodo. V preglednici III so podane srednje vrednosti izmerjenih parametrov za posamezne skupine.

Preglednica III: Klinične značilnosti preiskovancev posamezne skupine (povprečna vrednost  $\pm$  SD; ITM – indeks telesne mase, MKG<sub>fn</sub> - MKG vratu stegenice, MKG<sub>tot</sub> - MKG kolka, MKG<sub>ls</sub> - MKG ledvenih vretenc)

	Moški	Premenopavzne ženske	Pomenopavzne ženske	Pomenopavzne ženske, zdravljene z raloksifenom	Pomenopavzne ženske, zdravljenje z alendronatom
Število preiskovancev	184	59	629	56	53
Starost (leta)	67,88 $\pm$ 8,356	45,59 $\pm$ 4,757	66,29 $\pm$ 10,008	60,63 $\pm$ 5,628	65,08 $\pm$ 6,624
Mena (leta)	/	/	49,46 $\pm$ 4,167	/	/
Leta od mene	/	/	12,21 $\pm$ 9,215	/	/
Višina (cm)	171,39 $\pm$ 6,833	163,92 $\pm$ 6,112	160,09 $\pm$ 6,224	159,86 $\pm$ 5,502	157,40 $\pm$ 4,947
Masa (kg)	80,88 $\pm$ 14,479	65,36 $\pm$ 11,610	68,39 $\pm$ 15,965	65,54 $\pm$ 8,066	65,91 $\pm$ 9,692
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	27,5 $\pm$ 4,557	24,303 $\pm$ 4,035	26,682 $\pm$ 6,038	25,696 $\pm$ 3,301	25,592 $\pm$ 3,625
MKG <sub>fn</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	0,799 $\pm$ 0,163	0,781 $\pm$ 0,076	0,680 $\pm$ 0,127	0,629 $\pm$ 0,077	0,621 $\pm$ 0,095
MKG <sub>tot</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	0,941 $\pm$ 0,275	0,920 $\pm$ 0,090	0,784 $\pm$ 0,202	0,729 $\pm$ 0,095	0,743 $\pm$ 0,114
MKG <sub>ls</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	1,023 $\pm$ 0,230	1,002 $\pm$ 0,115	0,845 $\pm$ 0,213	0,759 $\pm$ 0,069	0,704 $\pm$ 0,074

### 3.3. PCR V REALNEM ČASU

PCR v realnem času je bolj občutljiva in natančna metoda kot klasični PCR, saj omogoča merjenje količine produkta PCR reakcije v vsakem ciklu med samo reakcijo. Torej pomnoževanje in detekcija produktov PCR potekata sočasno (29).

### 3.3.1. Načini detekcije produktov PCR v realnem času

Obstaja več načinov za detekcijo produktov PCR v realnem času, ki jih lahko razdelimo v dve skupini glede na to, ali z njimi detektiramo samo specifični produkt ali pa zaznamo tudi morebitno prisotne nespecifične produkte.

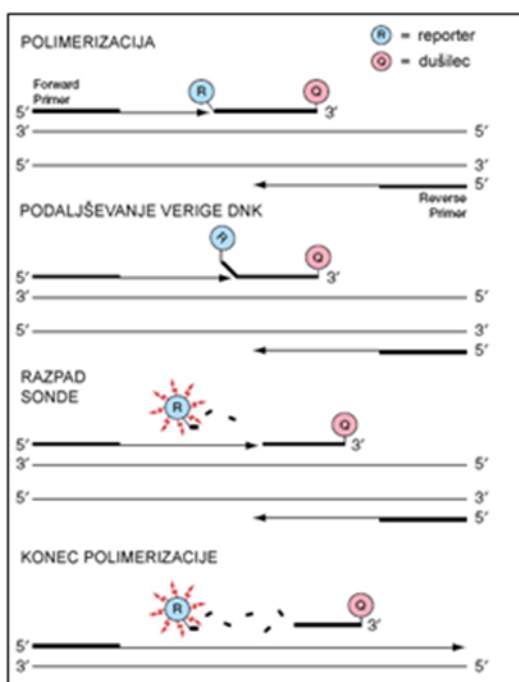
Med nespecifične načine detekcije spadajo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvovertično DNA. Primera sta etidijev bromid, ki se danes skoraj ne uporablja več, in SYBR Green I.

Pri specifičnih načinih detekcije uporabljamo s fluorofori označene oligonukleotide oziroma sonde, ki se specifično vežejo na odsek DNA, ki ga pomnožujemo. Najpogostejše se uporabljajo hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila (29).

### 3.3.2. Mehanizem detekcije PCR produktov s sondami TaqMan<sup>®</sup>

Pri hidrolizirajočih sondah, med katere spadajo tudi sonde TaqMan<sup>®</sup> izkoriščamo 5' – eksonukleazno aktivnost DNA – polimeraz. Najpogosteje se uporablja Taq DNA polimeraza.

Slika 4: Potek PCR reakcije v realnem času in detekcija PCR produktov s sondami TaqMan<sup>®</sup>



V reakcijsko zmes dodamo dvojno označeno sondo, ki specifično prepozna in se v stopnji prileganja veže na tarčno zaporedje na DNA. Sonda ima na obeh koncih vezana različna fluorofora, in sicer na 5' koncu je vezano reportersko barvilo, ki seva fluorescenco, na 3' koncu je vezan dušilec, ki to fluorescenco prestreže. Tekom PCR reakcije 5' – eksonukleazna aktivnost Taq DNA polimeraze povzroči hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde v stopnji podaljševanja. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilec se poveča.

Posledično je prestrezanje fluorescence onemogočeno, zato pa poraste fluorescenca reporterskega barvila, ki pa je sorazmerna količini PCR produkta (Slika 4). Mehanizem, s katerim dušilec prestreže fluorescenco reporterja, se imenuje FRET (angl. *Fluorescence resonance energy transfer*) in temelji na prenosu energije med donorskim in akceptorskim kromoforom.

Reagenti za PCR reakcijo v realnem času lahko vsebujejo tudi pasivno fluorescenčno barvilo 6-karboksi-X-rodamin (ROX), ki služi kot notranja referenca za normalizacijo fluorescenčnega signala pri analizi podatkov (29,30).

### 3.3.3. Uporaba sond TaqMan<sup>®</sup> za alelno diskriminacijo

Instrumenti za PCR v realnem času nam omogočijo tudi enostavno detekcijo znanih mutacij ali polimorfizmov z alelno diskriminacijo. Detekcija poteka šele po končanem pomnoževanju, torej v končni točki. Za učinkovito alelno diskriminacijo enega polimorfizma je potreben par oligonukleotidnih začetnikov ter dve sondi TaqMan<sup>®</sup>. Prva sonda ima na 5' koncu vezano reportersko barvilo, ki se razlikuje od reporterskega barvila druge sonde. Na 3' koncu imata obe vezano enako barvilo – dušilec. Specifične sonde prepoznajo in se vežejo bodisi na normalno, bodisi na spremenjeno zaporedje. Na osnovi jakosti signalov sond za normalni oziroma spremenjeni alel določimo posameznikov genotip in lahko ugotovimo, ali je polimorfizem prisoten ali ne.

Alelna diskriminacija omogoča dokazovanje mutacij, ki so vzrok določenih bolezni in prirojelih presnovnih motenj ter je pomembna pri odkrivanju prenašalcev bolezni in v prenatalni diagnostiki. Pri večgenskih ali večfaktorskih boleznih, kot je osteoporoza, lahko na osnovi prisotnosti sprememb nukleotidnega zaporedja določamo nagnjenost za bolezen. Pomembno področje uporabe predstavlja tudi farmakogenomika, saj spremembe v genih vplivajo tudi na farmakokinetiko in farmakodinamiko zdravil (29,31).

### 3.4. POMNOŽEVANJE ODSEKA EKSONA *Wnt16*

#### 3.4.1. Priprava reakcijske zmesi

Za izvedbo reakcije PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je prikazana v preglednici IV. Za vsako serijo posebej smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala vse sestavine razen vzorčne DNA. Pred pipetiranjem smo zmes reagentov za pomnoževanje premešali na vortexu, sondo smo pa premešali z pipeto in jo direktno odpipetirali v zmes. Reakcijsko zmes smo odpipetirali v ploščico s 384 vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo dodali še vzorčno DNA in ploščico previdno pokrili s samolepilno folijo. Za vsako serijo smo pripravili še slepi vzorec brez DNA, ki kaže, ali je med delom prišlo do kontaminacije reagentov z DNA (negativna kontrola).

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje enega odseka eksona *Wnt16*

<b>komponenta</b>	<b>volumen (µL) za en vzorec</b>
5 x HOT FIREPol <sup>®</sup> Probe qPCR Mix Plus (ROX)	1,2
TaqMan <sup>®</sup> C_2665840_20	0,15
ultra čista H <sub>2</sub> O	1,65
skupni volumen	3,0
vzorčna DNA	3,0
končni volumen	6,0

#### 3.4.2. Reakcijski pogoji in potek PCR reakcije

Pripravljene vzorce smo 3-5 minut centrifugirali pri 1900 obratih in jih vstavili v ciklični pomnoževalnik. Reakcijo smo izvedli po vnaprej nastavljenih reakcijskih pogojih (Preglednica V).

Preglednica V: Reakcijski pogoji za pomnoževanje odseka eksona *Wnt16*

stopnja PCR	T (°C)	čas	število ciklov
denaturacija	95	15 min	45
podaljševanje	95	20 s	
končno podaljševanje	60	1 min	

### 3.4.3. Materiali in oprema

#### Reagenti

- Delovne raztopine DNA različnih koncentracij in redčitev
- Ultra čista voda
- 5 x HOT FIREPol<sup>®</sup> Probe qPCR Mix Plus (ROX)
- sonda TaqMan<sup>®</sup> C\_2665840\_20

#### Pribor in aparature

- Delovna komora z UV lučko (DNA/RNA UV-Cleaner, Biosan)
- 1,5 mL avtoklavirane plastične centrifugirke s pokrovčkom (Sarsted)
- Pipetni nastavki, avtoklavirani (Sarsted)
- Polavtomatske pipete (Eppendorf)
- Vortex (FVL-2400N, Combi-Spin, Biosan)
- LightCycler<sup>®</sup> Multiwell Plate 384, white (Applied Biosystems)
- Mikrocentrifuga Mikro-242 (Tehtnica Železniki)
- LightCycler<sup>®</sup> 480 II (Roche)

## 3.5. POMNOŽEVANJE ODSEKA EKSONA *LRP5*

### 3.5.1. Priprava reakcijske zmesi

Za izvedbo reakcije PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je prikazana v preglednici VI. Skupno reakcijsko zmes brez vzorčne DNA smo pripravili v 1,5 mL epruveti. Pripravljeno reakcijsko zmes smo dobro premešali in jo razdelili v epruvete. V vsako epruveto smo nato dodali še vzorčno DNA. Za vsako serijo smo pripravili še slepi vzorec.

Preglednica VI: Sestava reakcijske zmesi za pomnoževanje enega odseka *LRP5*

komponenta	volumen ( $\mu\text{L}$ ) za en vzorec
5 x HOT FIREPol <sup>®</sup> Probe qPCR Mix Plus (ROX)	2,0
TaqMan <sup>®</sup> C_25752205_10	0,25
ultra čista H <sub>2</sub> O	2,75
skupni volumen	5,0
vzorčna DNA	5,0
končni volumen	10,0

### 3.5.2. Reakcijski pogoji in potek PCR reakcije

Pogoje za pomnoževanje odseka *LRP5* prikazuje preglednica VII. Preden smo vzorce vstavili v ciklični pomnoževalnik smo jih centrifugirali 3-5 minut pri 1900 obratih. Nato smo vzorce zložili v ciklični pomnoževalnik, ki je po predhodno vnesenem programu v določenih časovnih intervalih spreminjal temperaturo.

Preglednica VII: Reakcijski pogoji za pomnoževanje odseka eksona *LRP5*

stopnja PCR	T (°C)	čas	število ciklov
denaturacija	95	15 min	45
podaljševanje	95	20 s	
končno podaljševanje	60	1 min	

### 3.5.3. Materiali in oprema

#### Reagenti

- Delovne raztopine DNA različnih koncentracij in redčitev
- Ultra čista voda
- 5 x HOT FIREPol<sup>®</sup> Probe qPCR Mix Plus (ROX)
- sonda TaqMan<sup>®</sup> C\_25752205\_10

Pribor in aparature

- Delovna komora z UV lučko (DNA/RNA UV-Cleaner, Biosan)
- 1,5 mL avtoklavirane plastične centrifugirke s pokrovčkom (Sarsted)
- Pipetni nastavki, avtoklavirani (Sarsted)
- Polavtomatske pipete (Eppendorf)
- Vortex (FVL-2400N,Combi-Spin, Biosan)
- MicroAmp<sup>®</sup> Optical 8 Tube Strip 0,2 ml (Applied Biosystems)
- MicroAmp<sup>®</sup> Optical 8-Cap Strip (Applied Biosystems)
- Mikrocentrifuga Mikro-242 (Tehtnica Železniki)
- ABI PRISM RT-PCR ABI 7000 (Applied Biosystems)

**3.6. STATISTIČNE METODE**

Posamezne skupine preiskovancev smo razdelili v tri genotipske podskupine (genotip CC – podskupina 1, genotip CT – podskupina 2, genotip TT – podskupina 3) in za vsako od podskupin izračunali relativne frekvence genotipov. Za primerjavo relativnih frekvenc genotipov smo uporabili  $\chi^2$  test, s katerim smo izračunali statistično značilnost razlike med opazovano frekvenco genotipov, ki smo jo dobili pri eksperimentalnem delu, in pričakovano frekvenco genotipov. Zaradi majhnega števila preiskovancev z genotipom TT smo pri ugotavljanju pogostosti polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 združili genotipe CT in TT. Potem smo za vsako od podskupin izračunali srednje vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne preнове. Za statistično obdelavo smo uporabili program SPSS for Windows 16.1.

Normalnost porazdelitve vseh izmerjenih parametrov v posamezni genotipski skupini smo preverili z Kolmogorov-Smirnov testom. Postavili smo ničelno hipotezo, da je porazdelitev normalna. Če je bila vrednost  $p \geq 0,05$  smo ničelno hipotezo sprejeli in smo v nadaljni statistični obdelavi uporabili parametrične teste (ANOVA za več skupin in t-test za 2 skupini). Če je bila vrednost  $p \leq 0,05$ , smo ničeno hipotezo zavrnil in v nadaljni statistični obdelavi uporabili neparametrične teste (Kruskal-Wallisov in Mann-Whitneyev test).

Če je bila  $p \geq 0,05$ , je bila razlika pri analizirani spremenljivki med genotipskimi skupinami statistično nesigifikantna in smo sprejeli ničelno hipotezo. Če je bila  $p \leq 0,05$ , je bila razlika statistično sigifikantna. Statistično sigifikantne razlike smo dodatno analizirali še s Scheffejevim oz. Games-Howellovim testom post-hoc testom, ki nam omogoča prepoznavanje tistih genotipskih skupin, ki se med seboj statistično sigifikantno razlikujejo.

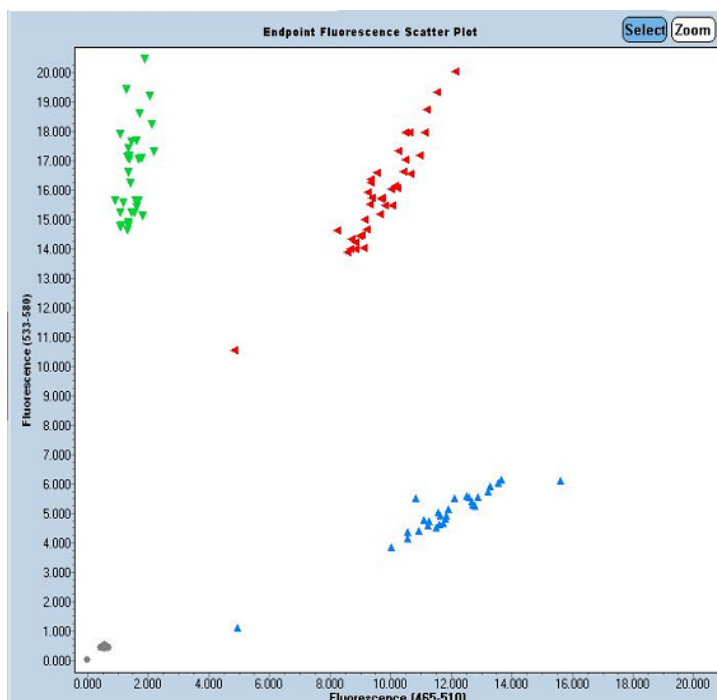


## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. OPTIMIZACIJA POSTOPKA GENOTIPIZACIJE

Prva naloga pri pomnoževanju odseka v genih za Wnt16 in LRP5 je optimizacija pogojev reakcije PCR. Najbolj kritični dejavniki, ki vplivajo na potek reakcije, so sestava reakcijske zmesi, število ciklov ter temperatura in čas posameznih stopenj v fazi cikličnega pomnoževanja. Količino reagentov in število ciklov smo določili na osnovi priporočil proizvajalcev reagentov.

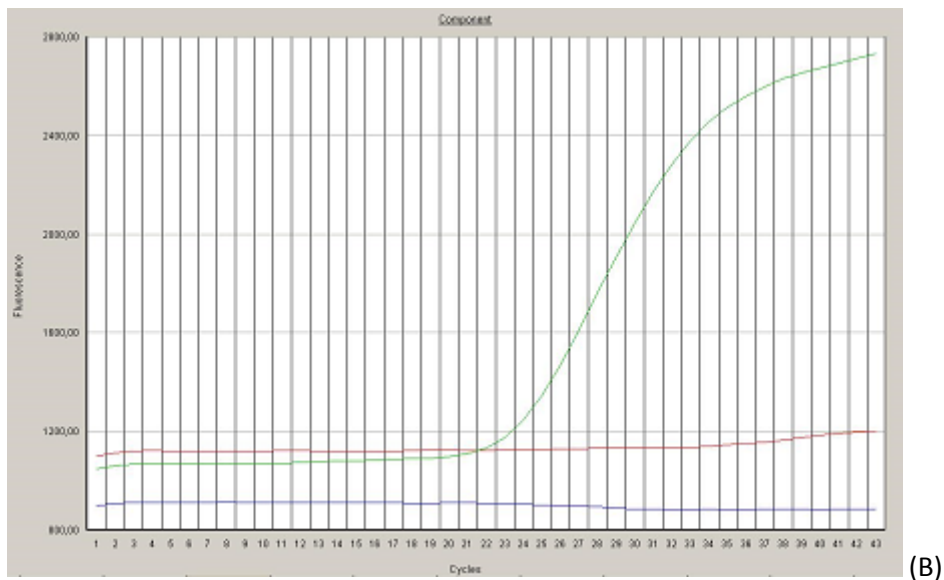
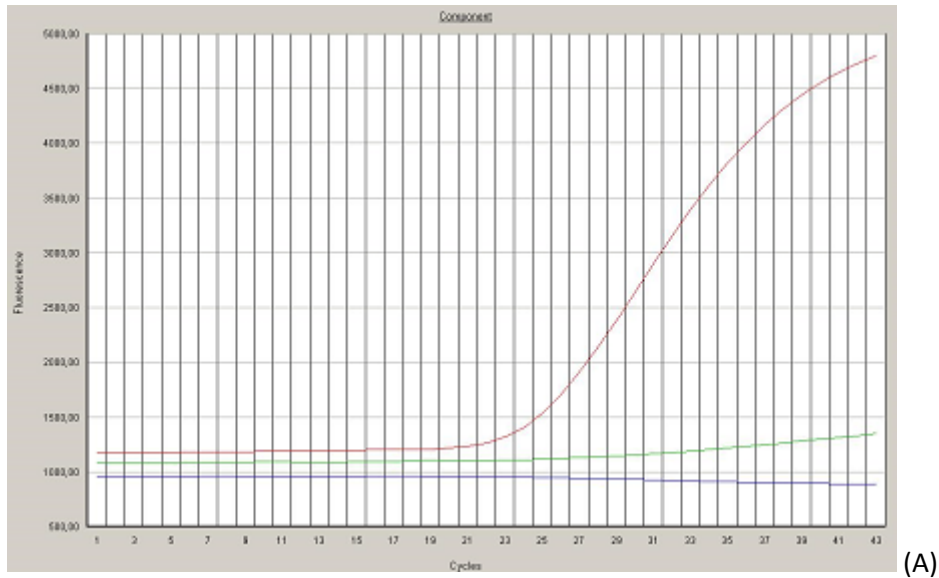
Reakcijo PCR smo izvedli za vseh 973 vzorcev. PCR reakcija za pomnoževanje odseka v genu za Wnt16 ni bila uspešna pri 188 vzorcih zaradi fragmentacije ali premajhne koncentracije vzorčne DNA. Pri takšnih vzorcih smo spremenili količino qPCR reakcijske mešanice in TaqMan sonde ter povečali število ciklov reakcije PCR. Povišali smo količino vzorčne DNA (+1,0  $\mu$ L) ter ustrezno prilagodili količino vode, tako da je bil končni volumen nespremenjen. Kljub spremembi sestave reakcijske zmesi je bilo 57 vzorcev neuspešnih. Pri takšnih vzorcih smo redčeno raztopino vzorčne DNA zamenjali z originalnim vzorcem DNA (2,0  $\mu$ L) ter ustrezno prilagodili količino vode. Število ciklov smo povešali do 55. Končno je bilo neuspešno genotipiziranih 30 vzorcev.

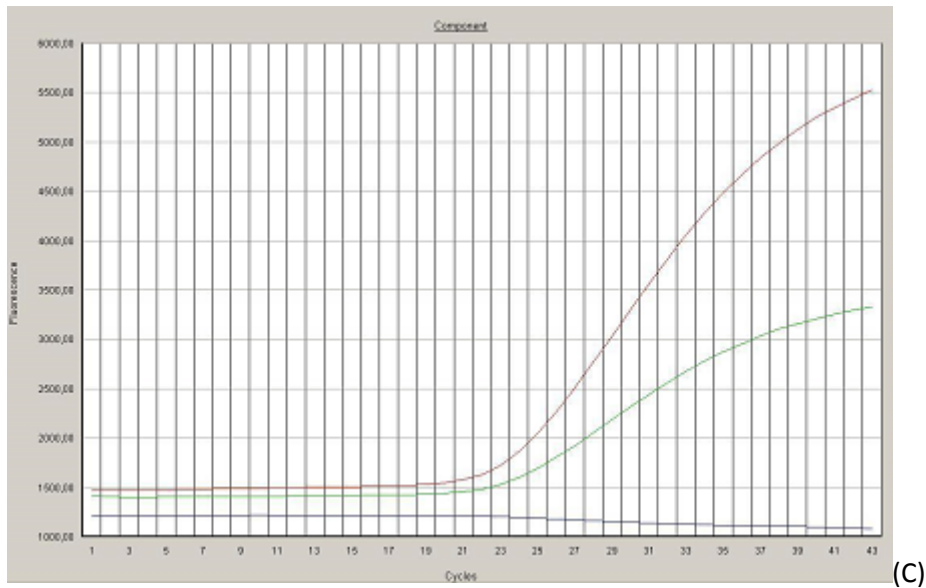


Slika 5: Prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan<sup>®</sup> na aparatu LightCycler<sup>®</sup> (zelena barva: genotip TT, rdeča barva: genotipi CT, modra barva: genotip CC, siva barva: neuspešni vzorci)

PCR reakcija za pomnoževanje odseka gena *LRP5* ni bila uspešna pri 18 vzorcih. Pri takšnih vzorcih smo povišali količino vzorčne DNA (+2,65  $\mu$ L) ter ustrezno zvišali količino TaqMan<sup>®</sup> sonde (+0,10  $\mu$ L). Število ciklov smo povišali do 50. Končno so bili vsi vzorci uspešno genotipizirani.

Slika 6: Prikaz rezultatov genotipizacije s sondami TaqMan<sup>®</sup> na aparatu ABI 7000 (slika A: genotip TT, slika B: genotip CC, slika C: genotip CT)





## 4.2. UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMA *rs2707466* V GENU ZA *Wnt16*

Pogostost polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* smo izračunali na osnovi dobljenih rezultatov genotipizacije vzorcev. Relativne frekvence genotipov v celotni skupini preiskovancev so 23,6% : 42,7% : 26,1% za genotipe CC : CT: TT. Relativne frekvence genotipov v posamezni skupini preiskovancev prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VIII: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem *rs2707466* v genu za *Wnt16* v posamezni skupini preiskovancev

Skupina	CC	CT	TT
moški (n=184)	25,8	42,5	25,8
premenopavzne ženske (n=59)	18,6	50,8	23,7
pomenopavzne ženske (n=629)	22,9	42,6	26,3
pomenopavzne ženske, zdravljene z raloksifenom (n=56)	26,8	39,2	23,2
pomenopavzne ženske, zdravljene z alendronatom (n=53)	24,5	41,5	30,2
vsi zdravi preiskovanci (n=372)	23,1	41,7	25,8
vsi preiskovanci z osteoporozo (n=408)	23,9	42,8	26,6
vsi preiskovanci z osteoartrozo (n=87)	26,7	41,4	27,6
osteoporozni preiskovanci brez zloma (n=248)	23,1	41,0	26,1
osteoporozni preiskovanci z zlomom (n=161)	26,3	45,6	25,1

Ugotovili smo, da so v slovenski populaciji frekvence genotipov za polimorfizem *rs2707466* v genu za *Wnt16* v vseh podskupinah v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem.

### 4.3. UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMA *rs3736228* V GENU ZA LRP5

Relativne frekvence genotipov v celotni skupini preiskovancev so 65,0% : 20,2% : 1,6% za genotipe CC : CT : TT. V skupinah pomenopavznih žensk, zdravljenih z raloksifenom in alendronatom ter v skupini preiskovancev z osteoartrozo smo zaradi majhnega števila preiskovancev z genotipom TT združili genotipa CT in TT. Relativne frekvence genotipov v posamezni skupini preiskovancev prikazuje preglednica IX.

Preglednica IX: Relativne frekvence (%) posameznih genotipov za polimorfizem *rs3736228* v genu za *LRP5* v posamezni skupini preiskovancev

Skupina	CC	CT	TT
moški (n=184)	61,8	19,9	1,1
premenopavzne ženske (n=59)	71,2	22,0	3,4
pomenopavzne ženske (n=629)	67,5	20,8	1,6
pomenopavzne ženske, zdravljene z raloksifenom (n=56)	73,2	17,9 (CT+TT)	
pomenopavzne ženske, zdravljene z alendronatom (n=53)	64,2	32,1 (CT+TT)	
vsi zdravi preiskovanci (n=372)	75,3	18,5	1,9
vsi preiskovanci z osteoporozo (n=408)	63,4	23,2	1,7
vsi preiskovanci z osteoartrozo (n=87)	26,4	11,5 (CT+TT)	
osteoporozni preiskovanci brez zloma (n=248)	68,8	23,5	0,9
osteoporozni preiskovanci z zlomom (n=161)	59,1	19,3	2,3

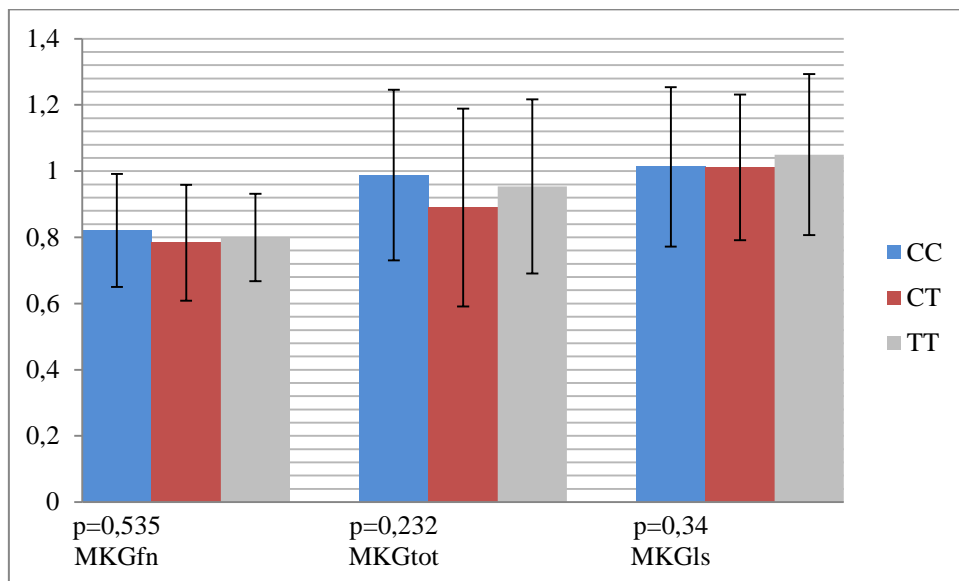
Ugotovili smo, da so v slovenski populaciji frekvence genotipov za polimorfizem *rs3736228* v genu za *LRP5* v vseh podskupinah v skladu s Hardy-Weinberg-ovim ravnotežjem.

#### 4.4. OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA *rs2707466* V GENU ZA *Wnt16* Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PRENOVE

##### 4.4.1. SKUPINA MOŠKIH

V skupino moških smo vključili 184 preiskovancev, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc ter serumske koncentracije RANKL, OC, PTH, CTX, OPG in vitamina D. Srednje vrednosti izmerjenih MKG in rezultate statistične analize prikazuje histogram I.

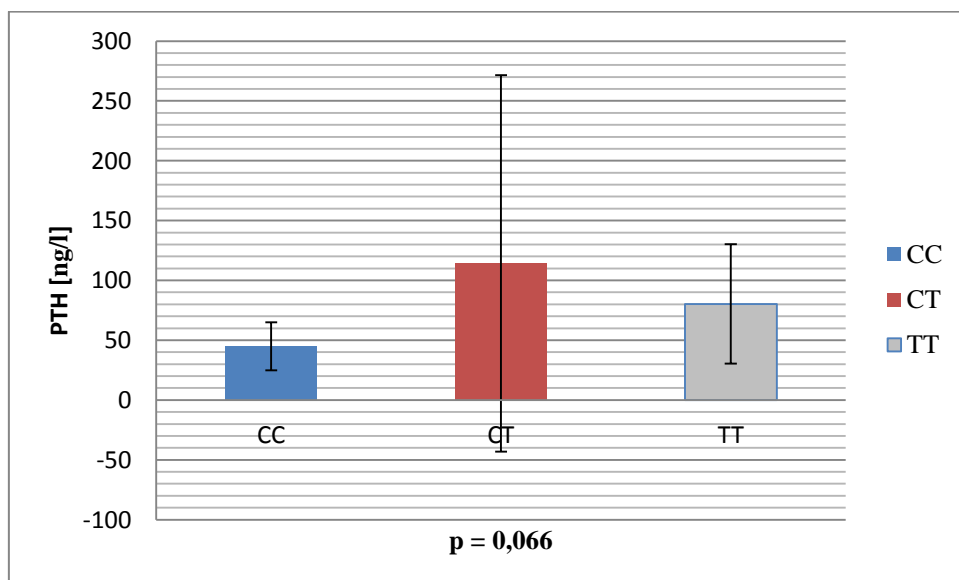
Histogram I: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini moških preiskovancev (MKG fn - MKG vratu stegenice, MKG tot - MKG kolka, MKG ls - MKG ledvenih vretenc)



V skupini moških nismo dokazali statistično značilne razlike v MKG med posameznimi genotipi.

Srednje vrednosti izmerjenih parametrov kostne prenove in rezultate statistične obdelave prikazujeta histogram II in preglednica X.

Histogram II: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) PTH [ $\text{ng}/\text{l}$ ] glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini moških preiskovancev (PTH – parathormon)



V primeru PTH lahko govorimo o mejni statistično značilni razliki med povprečnimi vrednostmi v posameznih genotipskih podskupinah ( $p=0,066$ ). Preiskovanci z genotipom

CC imajo nižjo koncentracijo PTH kot preiskovanci z genotipoma CT in TT. Parathormon v kosteh pospeši demineralizacijo osteoklastov ter razgradnjo kostnega matriksa, kar je značilno za osteoporozo (32). V naši preiskovani skupini moških se zvišana vrednost parathormona v serumu ne odraža s pričakovano nižjimi vrednostmi MKG. Takšen rezultat je najverjetneje posledica majhnega števila preiskovancev (N=27), še posebej v podskupini, ki smo ji izmerili koncentracijo PTH, zato bi bilo smiselno raziskavo ponoviti na večji skupini preiskovancev.

Preglednica X: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemičnih kazalcev kostne prenove glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini moških preiskovancev (RANKL – ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OC – osteokalcin, CTX – C-terminalni telopeptid, OPG – osteoprotegerin, N – število preiskovancev)

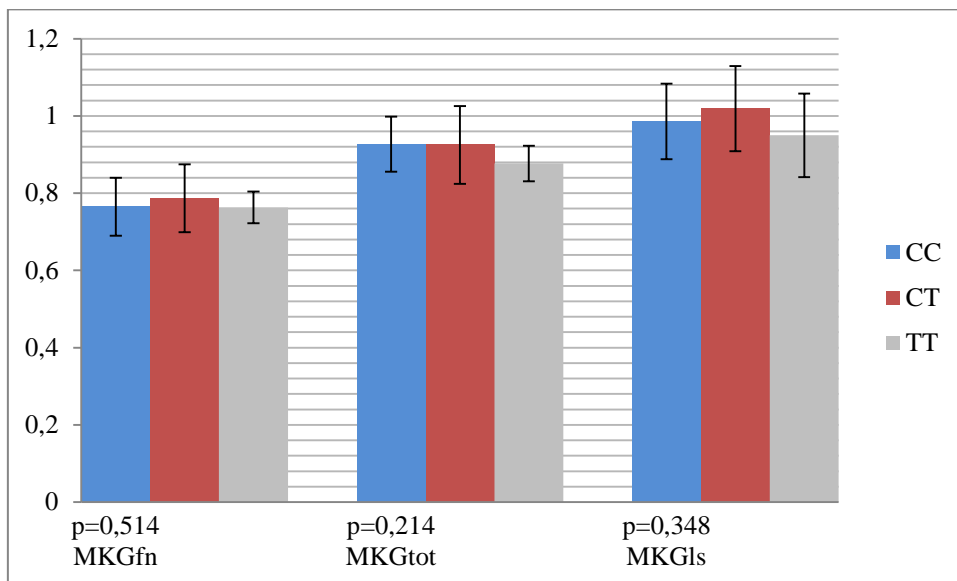
<b>Genotip</b>	<b>RANKL</b> [pmol/L]	<b>OC</b> [ $\mu$ g/L]	<b>CTX</b> [pmol/L]	<b>OPG</b> [pmol/L]	<b>vitamin D</b> [nmol/L]
CC	0,117 $\pm$ 0,126 (N=13)	11,118 $\pm$ 5,261 (N=16)	3852,07 $\pm$ 2408,624 (N=15)	4,895 $\pm$ 1,628 (N=13)	41,00 $\pm$ 12,375 (N=8)
CT	0,114 $\pm$ 0,105 (N=13)	7,583 $\pm$ 4,682 (N=18)	3652,93 $\pm$ 2566,343 (N=18)	5,523 $\pm$ 1,964 (N=13)	33,33 $\pm$ 14,687 (N=12)
TT	0,165 $\pm$ 0,156 (N=8)	9,611 $\pm$ 6,813 (N=9)	3889,66 $\pm$ 4401,131 (N=7)	5,417 $\pm$ 1,664 (N=8)	29,00 $\pm$ 13,622 (N=7)
p	0,753	0,172	0,845	0,645	0,224

Pri ostalih vrednostih za biokemične kazalce kostne prenove nismo dokazali statistično značilne razlike med posameznimi genotipi.

#### 4.4.2. SKUPINA PREMENOPAVZNIH ŽENSK

Skupino premenopavznih žensk predstavlja 59 žensk, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc ter serumske koncentracije RANKL, OC, PTH, CTX, BALP, OPG in katepsina K. Srednje vrednosti izmerjenih MKG in rezultate statistične obdelave prikazuje histogram III.

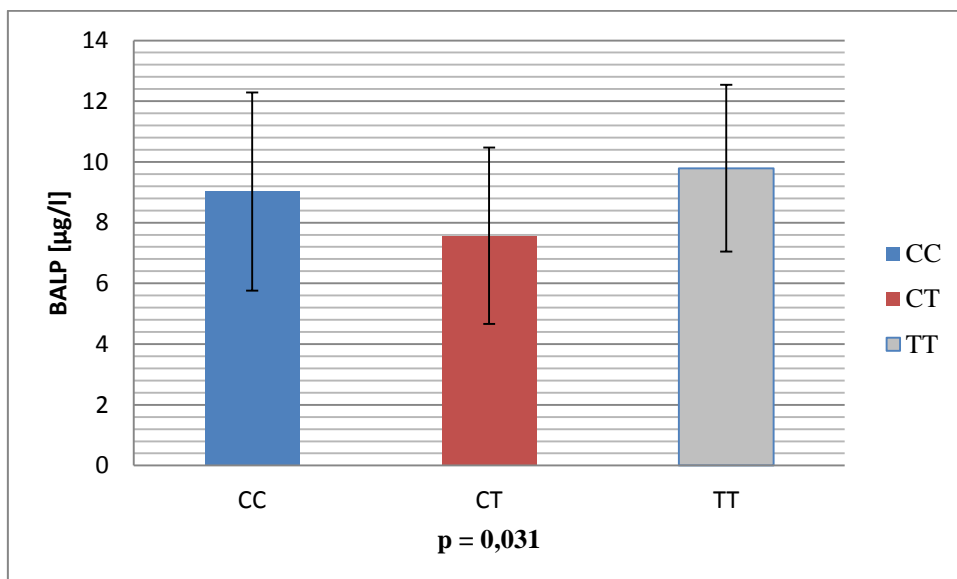
Histogram III: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini premenopavznih žensk (MKG fn - MKG vratu stegenice, MKG tot - MKG kolka, MKG ls - MKG ledvenih vretenc)



V skupini premenopavznih žensk nismo dokazali statistično značilne razlike v MKG med posameznimi genotipi.

Srednje vrednosti izmerjenih parametrov kostne preнове in rezultate statistične analize prikazujeta histogram IV in preglednica XI.

Histogram IV: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) BALP [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ] glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini premenopavznih žensk (BALP – kostna alkalna fosfataza)





V skupini premenopavznih žensk smo dokazali statistično značilno razliko pri koncentracijah BALP ( $p=0,031$ ). S Scheffejevim post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko, in sicer med povprečnimi vrednostmi BALP v genotipskih podskupinah CT in TT ( $p=0,024$ ). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma v genu za Wnt16 statistično značilno vpliva na serumsko koncentracijo BALP, ki je kazalec tvorbe kosti. Pri preiskovankah z genotipom TT ( $9,793 \pm 2,743$ ) in najvišjo koncentracijo BALP je trenutno povečana tvorba kosti, ki se očitno v vrednostih MKG še ne odraža, saj se MKG v tej genotipski podskupini ne razlikuje značilno od vrednosti v drugih dveh genotipskih podskupinah. Spremembe v tvorbi kosti prej zaznamo z biokemičnimi kazalci kot z MKG, saj se spremembe odražajo na MKG šele po enem letu.

Preglednica XI: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemičnih kazalcev kostne preнове glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za Wnt16 v skupini premenopavznih žensk (RANKL – ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OC – osteokalcin, PTH – parathormon, CTX – C-terminalni telopeptid, OPG – osteoprotegerin, N – število preiskovancev)

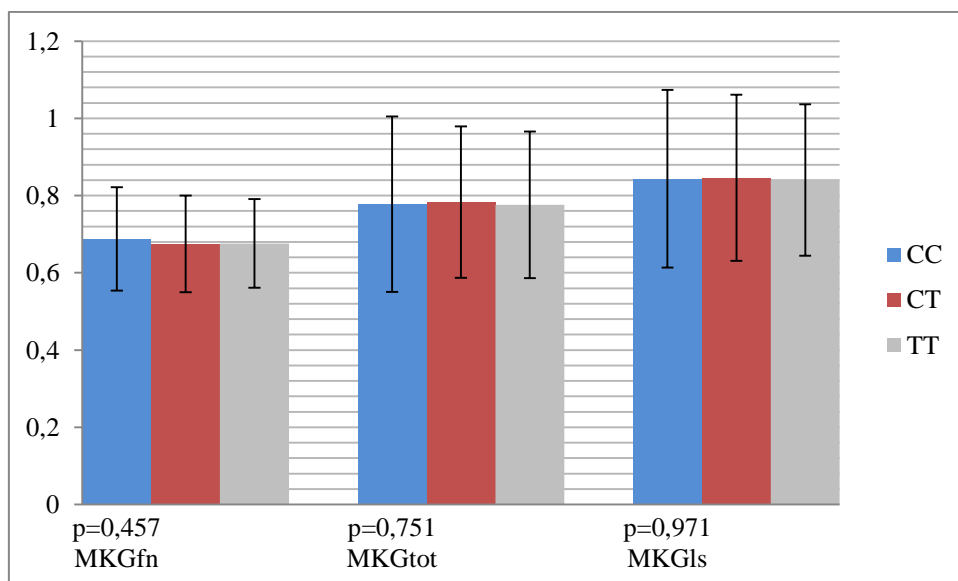
Genotip	RANKL [pmol/L]	OC [ $\mu$ g/L]	PTH [ng/L]	CTX [pmol/L]	OPG [pmol/L]	katapsin K [pmol/L]
CC	0,572 $\pm$ 0,440 (N=11)	12,427 $\pm$ 5,796 (N=11)	32,42 $\pm$ 11,339 (N=10)	3292,6 $\pm$ 1277,7 (N=11)	282,39 $\pm$ 103,55 (N=11)	10,730 $\pm$ 15,675 (N=10)
CT	0,490 $\pm$ 0,522 (N=30)	10,263 $\pm$ 3,614 (N=30)	34,84 $\pm$ 15,493 (N=30)	2359,9 $\pm$ 1082,6 (N=30)	327,20 $\pm$ 61,086 (N=30)	10,793 $\pm$ 26,068 (N=30)
TT	0,435 $\pm$ 0,259 (N=14)	12,300 $\pm$ 6,911 (N=14)	29,95 $\pm$ 12,137 (N=12)	3229,77 $\pm$ 1933 (N=13)	283,685 $\pm$ 94,430 (N=14)	4,600 $\pm$ 5,236 (N=13)
p	0,555	0,350	0,736	0,117	0,416	0,488

Pri ostalih vrednostih za biokemične kazalce kostne preнове nismo dokazali statistično značilne razlike med posameznimi genotipi.

#### 4.4.3. SKUPINA POMENOPAVZNIH ŽENSK

V statistično analizo smo vključili 629 pomenopavznih žensk, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc ter serumske vrednosti RANKL, OC, PTH, CTX, BALP, OPG in katepsina K. Srednje vrednosti izmerjenih MKG in rezultate statistične obdelave prikazuje histogram V.

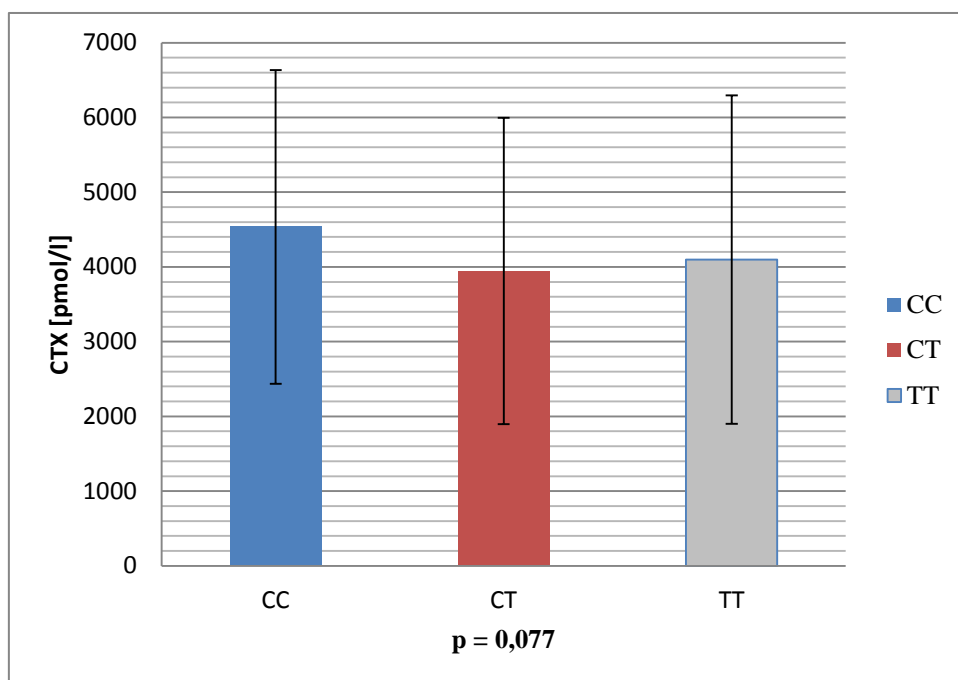
Histogram V: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini pomenopavznih žensk (MKG fn - MKG vratu stegenice, MKG tot - MKG kolka, MKG ls - MKG ledvenih vretenc)



Polimorfizem v genu za *Wnt16* ni povezan z MKG.

Srednje vrednosti izmerjenih parametrov kostne preнове in rezultate statistične analize prikazujeta histogram VI in preglednica XII.

Histogram VI: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) CTX [pmol/l] glede na genotip polimorfizma rs2707466 v genu za Wnt16 v skupini pomenopavznih žensk (CTX – C-terminalni telopeptid)



V primeru CTX lahko govorimo o mejni statistično značilni razliki med povprečnimi vrednostmi v posameznih genotipskih podskupinah ( $p=0,077$ ). CTX je razgradni produkt kolagena tipa 1 in je trenutno najboljši kazalec kostne razgradnje. Preiskovanke z genotipom CC imajo najvišjo koncentracijo CTX, kar kaže na to, da je pri teh preiskovankah kostna razgradnja intenzivnejša. V isti skupini preiskovank se zvišana vrednost CTX ne odraža s pričakovano nižjimi vrednostmi MKG, saj se spremembe v tvorbi kosti prej zaznajo z biokemičnimi kazalci kot z MKG. Takšen rezultat je lahko posledica majhnega števila preiskovank ( $N=193$ ), še posebej v podskupini, ki smo ji izmerili koncentracijo CTX. Smiselno bi bilo raziskavo ponoviti na večji skupini preiskovank.

Preglednica XII: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemičnih kazalcev kostne preнове glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini pomenopavznih žensk (RANKL – ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OC – osteokalcin, PTH – parathormon, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N – število preiskovancev)

Genotip	RANKL [pmol/L]	OC [ $\mu$ g/L]	PTH [ng/L]	BALP [ $\mu$ g/L]	OPG [pmol/L]	katapsin K [pmol/L]
CC	0,210 $\pm$ 0,190 (N=40)	19,57 $\pm$ 10,494 (N=58)	47,654 $\pm$ 29,725 (N=44)	11,657 $\pm$ 4,927 (N=37)	5,764 $\pm$ 1,835 (N=48)	5,412 $\pm$ 4,119 (N=16)
CT	0,326 $\pm$ 0,375 (N=82)	20,38 $\pm$ 14,358 (N=104)	63,483 $\pm$ 145,184 (N=89)	12,200 $\pm$ 4,674 (N=71)	5,696 $\pm$ 1,755 (N=101)	10,974 $\pm$ 32,728 (N=35)
TT	0,367 $\pm$ 0,624 (N=46)	17,222 $\pm$ 11,286 (N=64)	51,188 $\pm$ 32,089 (N=53)	13,602 $\pm$ 6,317 (N=40)	5,256 $\pm$ 1,780 (N=57)	20,810 $\pm$ 72,637 (N=19)
p	0,593	0,318	0,880	0,308	0,477	0,355

Pri ostalih vrednostih za biokemične kazalce kostne preнове nismo dokazali statistično značilne razlike med posameznimi genotipi.

#### 4.4.4. FARMAKOGENETSKA ANALIZA

Farmakogenetika je področje, ki preučuje razlike v genskem zapisu posameznika, ki vplivajo na njegov odziv na določeno zdravilo ter na pojav neželenih učinkov. Glavni namen farmakogenetike je pomoč zdravniku pri predpisovanju zdravil posamezniku, da na podlagi genetskega zapisa posameznika predpiše najbolj ustrezno zdravilo ter odmere.

V naši raziskavi smo pokušali ugotoviti povezanost polimorfizmov v genu za *Wnt16* in *LRP5* z odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom.

##### 4.4.4.1. ZDRAVLJENJE Z RALOKSIFENOM

V raziskavo je bilo vključenih 56 osteoporoznih pomenopavznih žensk, ki so se zdravile z raloksifenom v obdobju enega leta. MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc ter serumske vrednosti kostne alkalne fosfataze, osteokalcina in  $\beta$ -CTX smo jim izmerili pred

pričetkom in ob koncu zdravljenja. Preglednica XIII prikazuje srednje vrednosti sprememb parametrov in rezultate statistične obdelave.

Preglednica XIII: Spremembe srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne preнове po enoletnem zdravljenju z raloksifenom v skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za Wnt16 (MKG *fn* - MKG vratu stegenice, MKG *tot* - MKG kolka, MKG *ls* - MKG ledvenih vretenc, BALP – kostna alkalna fosfataza, OC – osteokalcin, N – število preiskovancev)

Genotip	dMKG <sub>fn</sub> [%]	dMKG <sub>tot</sub> [%]	dMKG <sub>ls</sub> [%]	dBALP [%]	dOC [%]	$\beta$ -CTX [%]
CC	-0,489 $\pm$ 5,259 (N=15)	-1,562 $\pm$ 12,159 (N=15)	2,487 $\pm$ 2,938 (N=15)	-23,405 $\pm$ 21,844 (N=13)	-24,532 $\pm$ 14,810 (N=15)	-27,830 $\pm$ 21,018 (N=15)
CT	1,885 $\pm$ 4,328 (N=22)	-0,678 $\pm$ 22,008 (N=22)	2,935 $\pm$ 5,639 (N=22)	-28,353 $\pm$ 16,441 (N=18)	-32,303 $\pm$ 15,939 (N=21)	-31,144 $\pm$ 29,037 (N=21)
TT	2,584 $\pm$ 6,883 (N=13)	-0,458 $\pm$ 2,869 (N=13)	0,087 $\pm$ 3,880 (N=13)	-20,188 $\pm$ 25,161 (N=12)	-12,321 $\pm$ 18,167 (N=13)	-18,644 $\pm$ 31,749 (N=13)
p	0,521	0,562	0,480	0,562	<b>0,010</b>	0,652

V skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk, zdravljenih z raloksifenom, smo dokazali statistično značilno razliko med povprečnimi zmanjšanimi koncentracijami osteokalcina v posameznih genotipskih podskupinah ( $p=0,010$ ). S Scheffejevim post-hoc testom smo potrdili statistično značilno razliko med genotipskima podskupinama CT in TT ( $p=0,011$ ). Osteokalcin tvorijo osteoblasti in visoke vrednosti kažejo na večjo tvorbo kosti. Tvorba kosti se je najmanj zmanjšala pri genotipu TT (-12,321  $\pm$  18,167), torej imajo preiskovanke z genotipom TT največjo tvorbo kosti. Posledično bi pri genotipu TT pričakovali največjo MKG, ki se v našem primeru ne razlikuje statistično značilno. Opazili smo pa, da ima genotip TT največje povečanje oz. najmanjše zmanjšanje MKG na področju kolka, medtem ko se je MKG v ledvenem predelu hrbtenice najmanj povečala.

#### 4.4.4.2. ZDRAVLJENJE Z ALENDRONATOM

V raziskavo je bilo vključenih 53 osteoporoznih pomenopavznih žensk, ki so se eno leto zdravile z alendronatom. MKG kolka in ledvenih vretenc ter serumske vrednosti kostne alkalne fosfataze, osteokalcina in deoksipiridinolina smo jim izmerili pred pričetkom in ob koncu zdravljenja. V preglednici XIV so prikazane srednje vrednosti sprememb parametrov in rezultati statistične obdelave.

Preglednica XIV: Spremembe srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne prenove po enoletnem zdravljenju z alendronatom v skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za Wnt16 (MKG tot - MKG kolka, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, BALP – kostna alkalna fosfataza, OC – osteokalcin, DPYR – deoksipiridinolin, N – število preiskovancev)

Genotip	dMKG <sub>tot</sub> [%]	dMKG <sub>ls</sub> [%]	dBALP [%]	dOC [%]	DPYR [%]
CC	3,875 $\pm$ 4,212 (N=11)	6,270 $\pm$ 4,351 (N=11)	39,921 $\pm$ 13,644 (N=7)	59,769 $\pm$ 23,198 (N=11)	57,647 $\pm$ 31,325 (N=12)
CT	4,414 $\pm$ 2,891 (N=20)	6,243 $\pm$ 5,062 (N=20)	42,341 $\pm$ 16,699 (N=15)	55,361 $\pm$ 21,278 (N=20)	68,196 $\pm$ 29,789 (N=20)
TT	3,855 $\pm$ 2,574 (N=14)	7,432 $\pm$ 3,970 (N=14)	48,356 $\pm$ 43,413 (N=12)	54,14 $\pm$ 23,828 (N=14)	84,344 $\pm$ 28,162 (N=15)
p	0,326	0,677	0,854	0,829	<b>0,037</b>

V primeru deoksipiridinolina smo dokazali statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi zmanjšanja koncentracij v posameznih genotipskih podskupinah ( $p=0,037$ ). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma v genu za Wnt16 statistično značilno vpliva na odzivnost na zdravljenje z alendronatom. Po enoletnem zdravljenju z alendronatom se statistično značilno povečala vrednost deoksipiridinolina v serumu pri preiskovancih z genotipom TT (83,344  $\pm$  28,162) v primerjavi s preiskovanci z genotipom CC (57,647  $\pm$  31,325) in genotipom CT (68,196  $\pm$  29,789). Deoksipiridinolin je biokemični kazalec kostne razgradnje in kaže, da je zdravlilo najmanj učinkovito pri preiskovancih s TT genotipom, saj je pri njih vrednost DPYR največja, kar kaže na največjo razgradnjo oz. na najmanjše zaviranje razgradnje. Zaradi tega pri preiskovancih s TT genotipom pričakujemo največje zmanjšanje MKG v enem letu, vendar naši podatki o MKG tega ne potrjujejo.

#### 4.4.5. POGOSTOST POLIMORFIZMA *rs2707466* V GENU ZA *Wnt16* MED OSTEOPOROZNIMI, OSTEOARTROZNIMI IN ZDRAVIMI PREISKOVANCI

Skupino preiskovancev smo razdelili v tri podskupine in sicer zdravi preiskovanci, preiskovanci z osteoporozo in preiskovanci z osteoartrozo. Kriterij za razdelitev preiskovancev je bila postavljena diagnoza osteoporoze na osnovi merjenja MKG. Zmanjšanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije od največje MKG v zgodnji odrasli dobi pomeni diagnozo osteoporoze, če pa je bilo zmanjšanje manjše od 1 SD so bili preiskovanci opredeljeni kot zdravi. Med osteoartrorne preiskovance so spadali preiskovanci po artroplastiki kolka zaradi osteoartroze. V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti, ali kateri od treh genotipov polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* predstavlja tveganje za pojav osteoporoze in/ali osteoartroze v posamezni podskupini.

##### 4.4.5.1. SKUPINA MOŠKIH

Na podlagi kriterija smo skupino moških razdelili v podskupino zdravih moških, moških z osteoporozo in moških z osteoartrozo. Posamezne podskupine smo primerjali med seboj z relativnimi frekvencami genotipov. Uporabili smo  $\chi^2$  test. Preglednica XV prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.

Preglednica XV: Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini moških preiskovancev (N – število preiskovancev)

Genotip	zdravi moški	moški z osteoporozo	moški z osteoartrozo
CC	29,2 (N=21)	30,4 (N=14)	28,6 (N=10)
CT	36,1 (N=26)	43,5 (N=20)	51,4 (N=18)
TT	34,7 (N=25)	26,1 (N=12)	20,0 (N=7)

S  $\chi^2$  smo potrdili, da ni statistično značilnih razlik v frekvencah genotipov med zdravimi preiskovanci, preiskovanci z osteoporozo in preiskovanci z osteoartrozo (P=0,504).

#### 4.4.5.2. SKUPINA ŽENSK

Na podlagi kriterija smo skupino žensk razdelili v podskupino zdravih žensk, žensk z osteoporozo in žensk z osteoartrozo. Za primerjavo genotipskih frekvenc med podskupinami smo uporabili  $\chi^2$  test. Preglednica XVI prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.

Preglednica XVI: Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma rs2707466 v genu za Wnt16 v skupini ženskih preiskovank (N – število preiskovancev).

Genotip	zdrave ženske	ženske z osteoporozo	ženske z osteoartrozo
CC	24,5 (N=65)	25,1 (N=85)	28,6 (N=14)
CT	48,7 (N=129)	46,0 (N=156)	36,7 (N=18)
TT	26,8 (N=71)	28,9 (N=98)	34,7 (N=17)

S  $\chi^2$  smo potrdili, da ni statistično značilnih razlik v frekvencah genotipov med zdravimi preiskovankami, preiskovankami z osteoporozo in preiskovankami z osteoartrozo (P=0,642).

#### 4.4.6. PRIMERJAVA PRESKOVANCEV BREZ ZLOMA S PRESKOVANCI Z ZLOMOM

Skupino preiskovancev smo razdelili v dve podskupini glede na prisotnost zloma in sicer preiskovanci brez zloma in preiskovanci z zlomom. V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti povezanost polimorfizma rs2707466 v genu za Wnt16 s tveganjem za zlom.

##### 4.4.6.1. SKUPINA MOŠKIH

Preglednica XVII prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.



Preglednica XVII: Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini moških preiskovancev brez zloma in z zlomom (N – število preiskovancev)

Genotip	moški brez zloma	moški z zlomom
CC	28,6 (N=8)	39,4 (N=13)
CT	50,0 (N=14)	45,5 (N=15)
TT	21,4 (N=6)	15,2 (N=5)

S  $\chi^2$  smo potrdili, da ni statistično značilnih razlik med frekvencami genotipov med preiskovanci z zlomom in brez njega (P=0,634).

#### 4.4.6.2. SKUPINA ŽENSK

Preglednica XVIII prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.

Preglednica XVIII: Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v skupini ženskih preiskovank brez zloma in z zlomom (N – število preiskovancev)

Genotip	ženske brez zloma	ženske z zlomom
CC	22,6 (N=54)	26,5 (N=35)
CT	44,4 (N=106)	45,5 (N=60)
TT	33,1 (N=79)	28,0 (N=37)

S  $\chi^2$  smo potrdili, da ni statistično značilnih razlik med frekvencami genotipov med preiskovankami z zlomom in brez njega (P=0,534).

#### 4.4.7. PRIMERJAVA REZULTATOV NAŠE RAZISKAVE Z REZULTATI DRUGIH RAZISKAV ZA POLIMORFIZEM *rs2707466* V GENU ZA *Wnt16*

Skupina raziskovalcev je izvedla meta-analizo več študij GWA za  $MKG_{fn}$  in  $MKG_{ls}$  in je odkrila povezanost gena *Wnt16* z  $MKG_{ls}$  in  $MKG_{fn}$ . Raziskava je vključevala 32.961 Evropejcev in vzhodnih Azijcev v začetni raziskovalni fazi in 50.933 dodatnih udeležencev v drugi fazi (6). V raziskavi Garcie-Ibarbie s sodelavci so ugotavljali povezanost polimorfizmov *Wnt16* z  $MKG_{fn}$ ,  $MKG_{ls}$ ,  $MKG_{tot}$  in biokemičnimi kazalci kostne premene. Raziskava je pokazala povezanost polimorfizma *rs2707466* z  $MKG_{fn}$  pri 1.083 preiskovancih bele rase (860 žensk, leta  $67 \pm 9$ ; 223 moških, leta  $72 \pm 8$ ) (18). V naši

raziskavi pri 973 preiskovancih nismo ugotovili pomembnih povezav z osteoporoznim fenotipom.

Povezanost gena *Wnt16* s tveganjem za zlom je bila odkrita tudi v največji študiji GWA pri 31.016 posameznikih. Fenotip je vseboval zlome kolka, hrbtenice, zapestja kakor tudi nizko-energijske zlome kjerkoli v skeletu razen prstov na roki in nogi ter zlomov lobanje (6). V naši raziskavi smo primerjali pogostost polimorfizma med zdravimi preiskovanci in preiskovanci z zlomom kolka ter nismo ugotovili povezanosti.

Rezultati naše raziskave odstopajo od rezultatov raziskave v okviru konzorcija GEFOS in od rezultatov drugih raziskav, vendar je *Wnt16* protein, ki zahteva nadaljne raziskave. V primeru gena *Wnt16* bi bilo, glede na rezultate objavljenih študij, smiselno iskanje povezanosti polimorfizma *rs3801387* z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno tudi proučevanje kombinacij različnih genov in polimorfizmov, ker je vpliv posameznega gena na določeno lastnost pri poligenških boleznih relativno majhen.

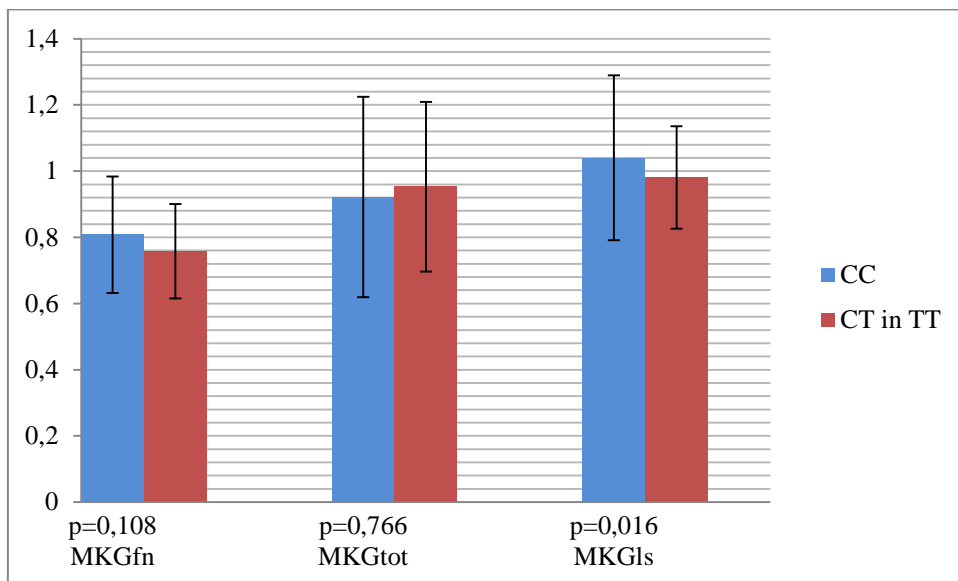
#### **4.5. OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA *rs3736228* V GENU ZA LRP5 Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PRENOVE**

Posamezne skupine bolnikov smo razdelili v dve genotipski podskupini. Zaradi majhnega števila preiskovancev z genotipom TT smo genotipa CT in TT združili skupaj.

##### **4.5.1. SKUPINA MOŠKIH**

V skupino moških smo vključili 184 preiskovancev, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc ter serumske vrednosti RANKL, OC, PTH, CTX, OPG in vitamina D. Srednje vrednosti izmerjenih MKG in rezultate statistične obdelave prikazuje histogram VII.

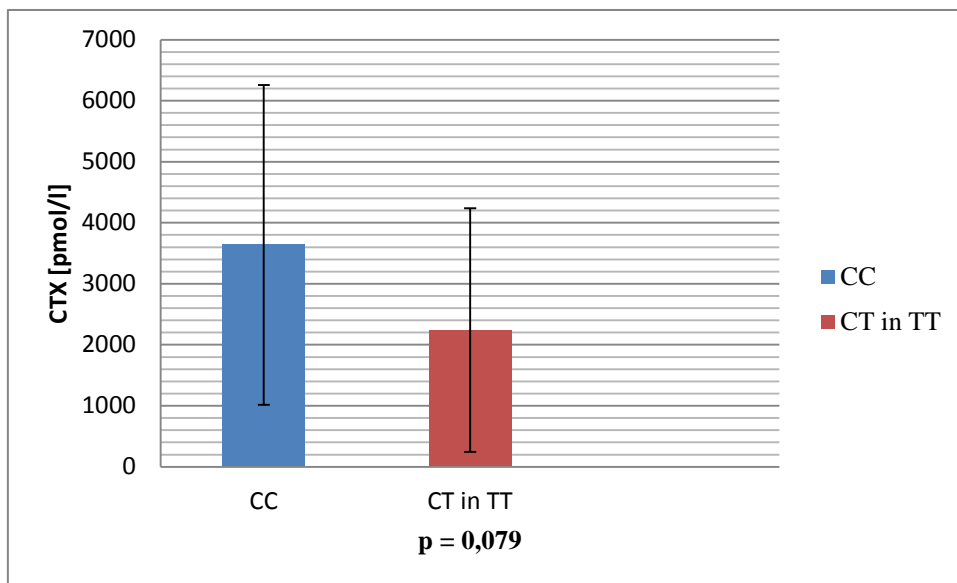
Histogram VII: : Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] glede na genotip polimorfizma rs3736228 v genu za LRP5 v skupini moških preiskovancev (MKG fn - MKG vratu stegenice, MKG tot - MKG kolka, MKG ls - MKG ledvenih vretenc)



V primeru MKG ledvenih vretenc smo ugotovili statistično značilno razliko med povprečnimi vrednostmi v posameznih genotipskih podskupinah ( $p=0,016$ ). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma v genu za LRP5 statistično značilno vpliva na vrednost MKG ledvenih vretenc pri moških, saj imajo moški z genotipom CT in TT nižjo  $\text{MKG}_{\text{ls}}$  kot moški z genotipom CC.

Srednje vrednosti izmerjenih parametrov kostne prenove in rezultate statistične obdelave prikazujeta histogram VIII in preglednica XIX.

Histogram VIII: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) CTX [pmol/l] glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini moških preiskovancev (CTX – C-terminalni telopeptid)



V primeru CTX lahko govorimo o mejni statistično značilni razliki med povprečnimi vrednostmi v posameznih genotipskih podskupinah ( $p=0,079$ ). Skupina z genotipi CT in TT ima nižjo MKGIs in bi morala imeti višjo koncentracijo CTX, ampak temu ni tako, ker je koncentracija CTX nižja. Takšen rezultat je najverjetneje posledica majhnega števila preiskovancev ( $N=28$ ), ki smo jim izmerili koncentracijo CTX, zato bi bilo smiselno raziskavo ponoviti na večji skupini preiskovancev.

Preglednica XIX: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemičnih kazalcev kostne preнове glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini moških preiskovancev (RANKL – ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OC – osteokalcin, PTH – parathormon, OPG – osteoprotegerin, N – število preiskovancev)

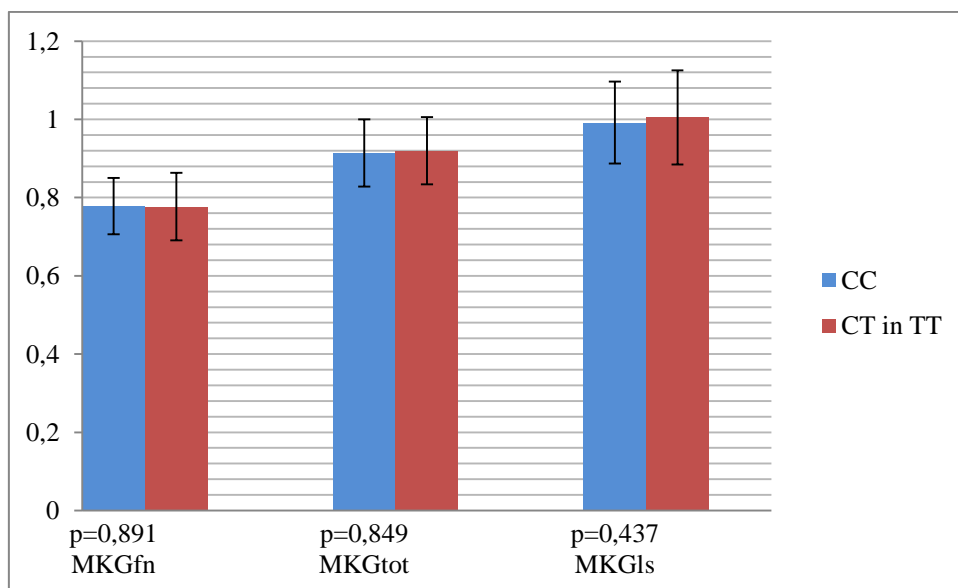
Genotip	RANKL [pmol/L]	OC [ $\mu$ g/L]	PTH [ng/L]	OPG [pmol/L]	vitamin D <sub>nmol/L</sub>
CC	0,146 $\pm$ 0,122 (N=20)	9,058 $\pm$ 5,877 (N=24)	95,047 $\pm$ 122,975 (N=21)	5,634 $\pm$ 1,641 (N=20)	33,90 $\pm$ 14,317 (N=21)
CT in TT	0,177 $\pm$ 0,124 (N=8)	8,955 $\pm$ 3,609 (N=8)	49,333 $\pm$ 15,933 (N=6)	5,870 $\pm$ 1,476 (N=8)	36,50 $\pm$ 11,777 (N=6)
p	0,469	0,832	0,140	0,728	0,670

Pri ostalih vrednostih za biokemične kazalce kostne preнове nismo dokazali statistično značilne razlike med posameznimi genotipi.

#### 4.5.2. SKUPINA PREMENOPAVZNIH ŽENSK

Skupino premenopavznih žensk predstavlja 59 žensk, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc ter serumske vrednosti RANKL, OC, PTH, CTX, BALP, OPG in katepsina K. Srednje vrednosti izmerjenih MKG in rezultate statistične obdelave prikazuje histogram IX.

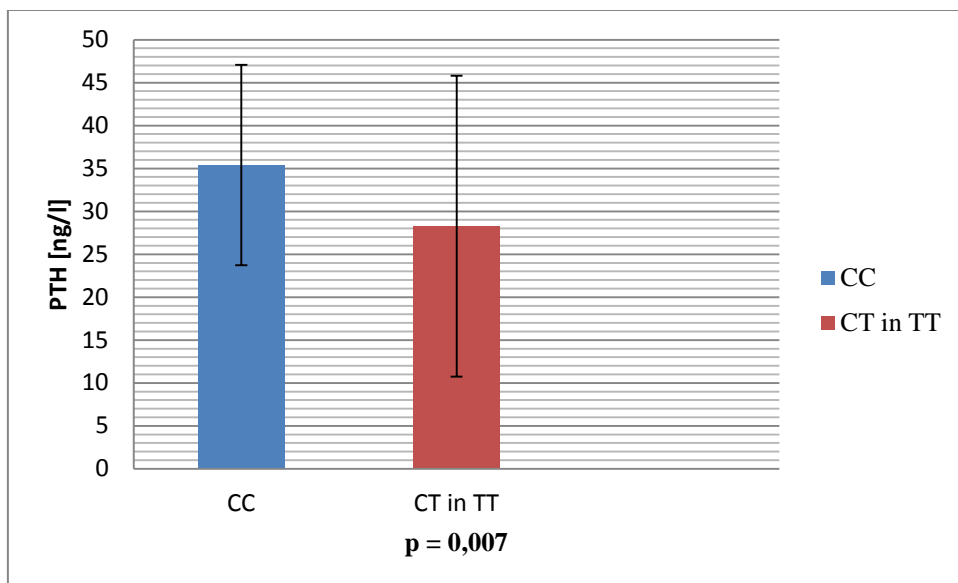
Histogram IX: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini premenopavznih žensk (MKG fn - MKG vratu stegenice, MKG tot - MKG kolka, MKG ls - MKG ledvenih vretenc)



Polimorfizem *rs3736228* v genu za LRP5 ni povezan z MKG.

Srednje vrednosti za biokemične kazalce kostne preнове prikazujeta histogram X in preglednica XX.

Histogram X: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) PTH [ng/l] glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini premenopavznih žensk (PTH – parathormon)



Statistično značilno razliko smo dokazali v primeru PTH ( $p=0,007$ ). Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma v genu za LRP5 statistično značilno vpliva na serumsko vrednost PTH. Najverjetneje gre za trenutno pospešeno izločanje parathormona, ker se zvišane vrednosti parathormona, ki so še znotraj referenčnih vrednosti [12-65ng/L], ne odražajo na vrednosti MKG.

Preglednica XX: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne preнове glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini premenopavznih žensk (RANKL – ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OC – osteokalcin, CTX - C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N – število preiskovancev)

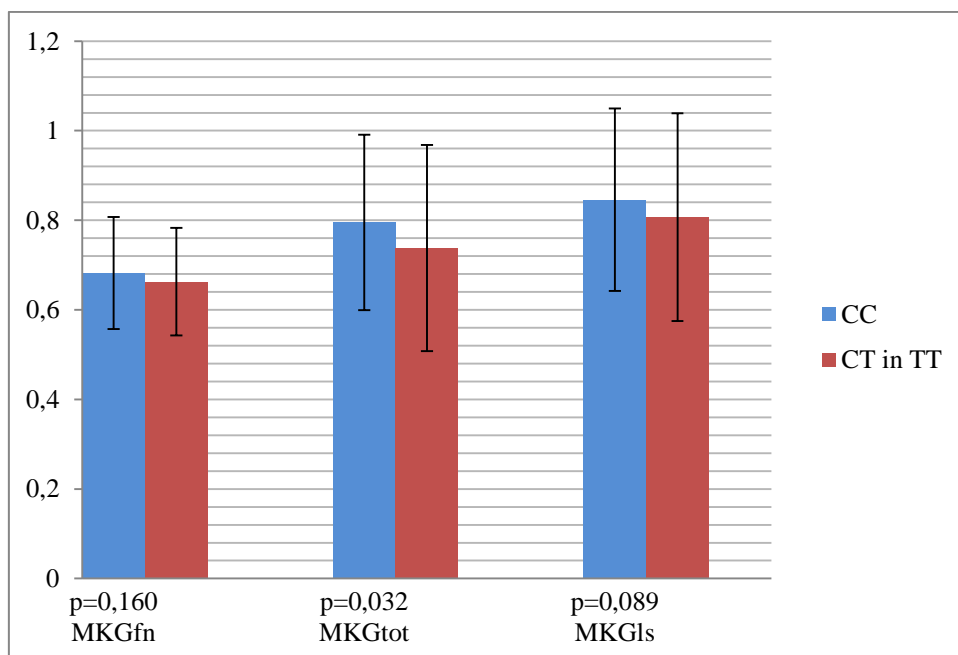
Genotip	RANKL [pmol/L]	OC [ $\mu$ g/L]	CTX [pmol/L]	BALP [ $\mu$ g/L]	OPG [pmol/L]	katapsin K [pmol/L]
CC	0,488 $\pm$ 0,336 (N=42)	11,135 $\pm$ 4,377 (N=42)	2730,88 $\pm$ 1305,81 (N=42)	8,467 $\pm$ 3,167 (N=40)	298,985 $\pm$ 86,980 (N=42)	7,852 $\pm$ 20,197 (N=40)
CT in TT	0,526 $\pm$ 0,669 (N=15)	11,013 $\pm$ 6,713 (N=15)	2796,0 $\pm$ 1733,884 (N=14)	7,642 $\pm$ 2,837 (N=15)	322,700 $\pm$ 58,202 (N=15)	11,940 $\pm$ 21,808 (N=15)
p	0,669	0,447	0,733	0,510	0,446	0,179

Pri ostalih vrednosti za biokemične kazalce kostne preнове nismo dokazali statistično značilne razlike med posameznimi genotipi.

### 4.5.3. SKUPINA POMENOPAVZNIH ŽENSK

V statistično analizo smo vključili 629 pomenopavznih žensk, ki jim je bila izmerjena MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc ter serumske vrednosti RANKL, OC, PTH, CTX, BALP, OPG in katepsina K. Srednje vrednosti izmerjenih MKG in rezultate statistične obdelave prikazuje histogram XI.

Histogram XI: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG [kg/m<sup>2</sup>] glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini pomenopavznih žensk (MKG fn - MKG vratu stegenice, MKG tot - MKG kolka, MKG ls - MKG ledvenih vretenc)



V skupini pomenopavznih žensk smo dokazali statistično značilno razliko pri MKG kolka ( $p=0,032$ ), torej polimorfizem v genu za LRP5 vpliva na MKG kolka. Opazimo tudi nižjo  $p$  vrednost pri MKG ledvenih vretenc ( $p=0,089$ ), ki pa ni statistično značilna. Lahko sklepamo, da polimorfizem predstavlja dejavnik tveganja za razvoj osteoporoze pri pomenopavznih ženskah.

Srednje vrednosti ostalih izmerjenih parametrov in rezultate statistične obdelave prikazuje preglednica XXI.

Preglednica XXI: Primerjava srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemičnih kazalcev kostne preнове glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini pomenopavznih žensk (RANKL – ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OC – osteokalcin, PTH – parathormon, CTX – C-terminalni telopeptid, BALP – kostna alkalna fosfataza, OPG – osteoprotegerin, N – število preiskovancev)

Genotip	RANKL [pmol/L]	OC [ $\mu$ g/L]	PTH [ng/L]	CTX [pmol/L]	BALP [ $\mu$ g/L]	OPG [pmol/L]	katapsin K [pmol/L]
CC	0,323 $\pm$ 0,458 (N=132)	20,011 $\pm$ 11,831 (N=167)	48,372 $\pm$ 31,338 (N=150)	4030,34 $\pm$ 2032,868 (N=144)	12,451 $\pm$ 5,323 (N=119)	5,590 $\pm$ 1,803 (N=162)	8,334 $\pm$ 27,620 (N=50)
CT in TT	0,344 $\pm$ 0,288 (N=31)	20,226 $\pm$ 13,64 (N=53)	82,844 $\pm$ 213,388 (N=40)	4496,61 $\pm$ 235,331 (N=40)	12,063 $\pm$ 4,805 (N=33)	5,821 $\pm$ 1,742 (N=40)	2,433 $\pm$ 3,027 (N=9)
p	0,134	0,806	0,248	0,298	0,902	0,839	0,306

Pri vrednostih za biokemične kazalce kostne preнове nismo dokazali statistično značilne razlike med posameznimi genotipi.

#### 4.5.4. FARMAKOGENETSKA ANALIZA

##### 4.5.4.1. ZDRAVLJENJE Z RALOKSIFENOM

V raziskavo je bilo vključenih 56 osteoporoznih pomenopavznih žensk, ki so se zdravile z raloksifenom v obdobju enega leta. MKG vratu stegenice, kolka in ledvenih vretenc ter serumske vrednosti kostne alkalne fosfataze, osteokalcina in  $\beta$ -CTX smo jim izmerili pred pričetkom in ob koncu zdravljenja. Preglednica XXII prikazuje srednje vrednosti sprememb parametrov in rezultate statistične obdelave.



Preglednica XXII: Spremembe srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne preнове po enoletnem zdravljenju z raloksifenom v skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 (MKG *fn* - MKG vratu stegenice, MKG *tot* - MKG kolka, MKG *ls* - MKG ledvenih vretenc, BALP – kostna alkalna fosfataza, OC – osteokalcin, N – število preiskovancev)

<b>Genotip</b>	<b>MKG <i>fn</i></b> [kg/m <sup>2</sup> ]	<b>MKG <i>tot</i></b> [kg/m <sup>2</sup> ]	<b>MKG <i>ls</i></b> [kg/m <sup>2</sup> ]	<b>BALP</b> [μg/L]	<b>OC</b> [μg/L]	<b>β-CTX</b> [%]
CC	1,270 $\pm$ 5,327 (N=41)	0,285 $\pm$ 8,658 (N=41)	2,052 $\pm$ 4,657 (N=41)	-25,246 $\pm$ 20,699 (N=35)	-25,059 $\pm$ 18,826 (N=40)	-27,380 $\pm$ 28,458 (N=40)
CT in TT	2,268 $\pm$ 5,914 (N=10)	-5,665 $\pm$ 31,740 (N=10)	1,632 $\pm$ 4,613 (N=10)	-23,187 $\pm$ 20,333 (N=9)	-23,387 $\pm$ 12,909 (N=10)	-25,997 $\pm$ 23,631 (N=10)
p	0,691	0,864	0,929	0,689	0,104	0,886

V skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk zdravljenih z raloksifenom nismo dokazali statistično značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi sprememb izmerjenih parametrov, iz česar lahko sklepamo, da polimorfizem v genu za LRP5 nima vpliva na zdravljenje z raloksifenom.

#### 4.5.4.2. ZDRAVLJENJE Z ALENDRONATOM

V raziskavo je bilo vključenih 53 osteoporoznih pomenopavznih žensk, ki so se eno leto zdravile z alendronatom. MKG kolka in ledvenih vretenc ter serumske vrednosti kostne alkalne fosfataze, osteokalcina in deokspiridinolina smo jim izmerili pred pričetkom in ob koncu zdravljenja. V preglednici XXIII so prikazane srednje vrednosti sprememb parametrov in rezultati statistične obdelave.

Preglednica XXIII: Spremembe srednjih vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne preнове po enoletnem zdravljenju z alendronatom v skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 (MKG tot - MKG kolka, MKG ls - MKG ledvenih vretenc, BALP – kostna alkalna fosfataza, OC – osteokalcin, DPYR – deoksi piridinolin, N – število preiskovancev)

Genotip	MKG <sub>tot</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	MKG <sub>ls</sub> [kg/m <sup>2</sup> ]	BALP [μg/L]	OC [μg/L]	DPYR [%]
CC	4,433 $\pm$ 2,897 (N=29)	6,788 $\pm$ 4,902 (N=29)	39,779 $\pm$ 14,696 (N=22)	53,967 $\pm$ 20,240 (N=29)	67,289 $\pm$ 30,810 (N=33)
CT in TT	3,521 $\pm$ 3,484 (N=16)	6,315 $\pm$ 3,824 (N=16)	51,641 $\pm$ 43,181 (N=12)	59,849 $\pm$ 25,496 (N=16)	78,594 $\pm$ 30,493 (N=14)
p	0,192	0,831	0,606	0,446	0,343

V skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk zdravljenih z alendronatom nismo dokazali statistično značilnih razlik med povprečnimi vrednostmi sprememb izmerjenih parametrov, torej vpliva na odzivnost na zdravljenje z alendronatom pri polimorfizmu v genu za LRP5 nismo pokazali.

#### 4.5.5. POGOSTOST POLIMORFIZMA *rs3736228* V GENU ZA LRP5 MED OSTEOPOROZNIMI, OSTEOARTROZNIMI IN ZDRAVIMI PREISKOVANCI

V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti pogostost polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini zdravih preiskovancev, preiskovancev z osteoporozo in preiskovancev z osteoartrozo. Kriterij za razdelitev preiskovancev v tri skupine je bil enak kot pri polimorfizmu v genu za Wnt16. Tudi vprašanje raziskave je bilo enako kot pri polimorfizmu v genu za Wnt16 in sicer, ali kateri od treh genotipov predstavlja tveganje za pojav osteoporoze in/ali osteoartroze v posamezni skupini.

##### 4.5.5.1. SKUPINA MOŠKIH

Skupino moških smo razdelili v tri podskupine in sicer zdravi moški, moški z osteoporozo in moški z osteoartrozo. Z primerjavo relativnih frekvenc genotipov med podskupinami smo želeli ugotoviti ali kateri genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 predstavlja tveganje za pojav bolezni. Preglednica XXIV prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.

Preglednica XXIV: Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini moških preiskovanec (N – število preiskovancev)

Genotip	zdravi moški	moški z osteoporozo	moški z osteoartrozo
CC	83,1 (N=64)	56,8 (N=21)	75,0 (N=12)
CT in TT	16,9 (N=13)	43,2 (N=16)	25,0 (N=4)

S  $\chi^2$  smo potrdili statistično značilno razliko ( $P=0,010$ ) med zdravimi preiskovanci, preiskovanci z osteoporozo in preiskovanci z osteoartrozo. Podskupina moških z osteoporozo se najbolj razlikuje od ostalih dveh podskupin. Pri moških z osteoporozo sta pogostejša genotipa CT in TT, kar kaže, da ta dva genotipa predstavljata tveganje za osteoporozo. Smiselno bi bilo raziskavo ponoviti na večji skupini preiskovancev.

#### 4.5.5.2. SKUPINA ŽENSK

Preglednica XXV prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.

Preglednica XXV: Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini ženskih preiskovank (N – število preiskovancev)

Genotip	zdrave ženske	ženske z osteoporozo	ženske z osteoartrozo
CC	77,4 (N=216)	73,5 (N=244)	64,7 (N=11)
CT in TT	22,6 (N=63)	26,5 (N=88)	35,3 (N=6)

S  $\chi^2$  smo potrdili, da ni statistično značilnih razlik v frekvencah genotipov ( $P=0,327$ ) med zdravimi preiskovankami, preiskovankami z osteoporozo in preiskovankami z osteoartrozo.

#### 4.5.6. PRIMERJAVA PRESKOVANCEV BREZ ZLOMA Z PRESKOVANCI Z ZLOMOM

V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti povezanost polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 z preiskovanci brez zloma in preiskovanci z zlomom.

#### 4.5.6.1. SKUPINA MOŠKIH

Preglednica XXVI prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.

Preglednica XXVI: Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini moških preiskovancev brez zloma in z zlomom (N – število preiskovancev)

Genotip	moški brez zloma	moški z zlomom
CC	71,4 (N=20)	75,0 (N=18)
CT in TT	28,6 (N=8)	25,0 (N=6)

S  $\chi^2$  smo potrdili, da ni statistično značilnih razlik ( $P=0,772$ ) med frekvencami genotipov med preiskovanci z zlomom in brez njega.

#### 4.5.6.2. SKUPINA ŽENSK

Preglednica XXVII prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.

Preglednica XXVII: Primerjava relativnih frekvenc (%) glede na genotip polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 v skupini ženskih preiskovank brez zloma in z zlomom (N – število preiskovancev)

Genotip	ženske brez zloma	ženske z zlomom
CC	72,8 (N=179)	72,0 (N=85)
CT in TT	27,2 (N=67)	28,0 (N=33)

S  $\chi^2$  smo potrdili, da ni statistično značilnih razlik ( $P=0,884$ ) med frekvencami genotipov med preiskovankami z zlomom in brez njega.

#### 4.5.7. PRIMERJAVA REZULTATOV NAŠE RAZISKAVE Z REZULATI DRUGIH RAZISKAV ZA POLIMORFIZEM *rs3736228* V GENU ZA LRP5

Več polimorfizmov v genu za LRP5 je bilo povezano s kostno maso in z zlomi, med njimi tudi polimorfizem *rs3736288*, ki je najpogosteje proučevani polimorfizem. V študiji GWA z 8.557 preiskovanci bele rase, starejših od 18 let, so ugotovili povezanost polimorfizma

*rs3736288* z  $MKG_{ls}$  in  $MKG_{fn}$  (25). Meta-analiza pri 19.195 Evropejcev (do 88% žensk med 18 in 96 let starosti) je pokazala tudi povezavo gena LRP5 z  $MKG_{ls}$  (26). Naša raziskava je vključevala 973 preiskovancev (705 žensk, leta  $68 \pm 15$ ; 184 moških, leta  $67 \pm 8$ ), pri katerih smo iskali povezanost polimorfizma *rs3736228* z  $MKG_{fn}$ ,  $MKG_{ls}$  in  $MKG_{tot}$  ter biokemičnimi kazalci kostne premene. Rezultati raziskave so pokazali vpliv polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 na  $MKG_{ls}$  pri moških in  $MKG_{tot}$  pri pomenopavznih ženskah ( $n=629$ ) in s tem se naša raziskava pridružuje tistim, ki so dokazale povezanost med polimorfizmom *rs3736228* in  $MKG_{ls}$  in  $MKG_{tot}$ . Pri moških z osteoporozo smo ugotovili, da genotipa CT in TT predstavljata tveganje za osteoporozo.

V študiji GWA ( $n=31.016$ ) je bil polimorfizem *rs3736228* povezan z zvečanim tveganjem za osteoporozne zlome kjerkoli v skeletu razen prstov na roki in nogi ter zlomi lobanje. V naši raziskavi pa nismo ugotovili povezanosti polimorfizma s preiskovanci brez zloma in preiskovanci z zlomom kolka. Razlika je morda tudi posledica tega, da smo v našo raziskavo vključevali preiskovance z zlomom kolka, smiselno pa bi bilo raziskavo ponoviti na večjem številu preiskovancev.

Rezultati naše raziskave so potrdili klinični pomen polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5. Polimorfizem *rs3736228* je klinično pomemben in bi ga lahko uporabili kot diagnostični kazalec za identifikacijo preiskovancev z večjim tveganjem za razvoj bolezni. Polimorfizem *rs3736228* v genu za LRP5 predstavlja tudi potencialno terapevtsko tarčo za razvoj zdravil za zdravljenje osteoporoze.

## 5. SKLEP

Z analizo 889 vzorcev smo ugotovili sledeče:

- Relativne frekvence genotipov polimorfizma *rs2707466* v genu za *Wnt16* v celotni skupini preiskovancev znašajo 23,6% : 42,7% : 26,1% za genotipe CC : CT : TT.
- V skupini premenopavznih žensk smo dokazali statistično značilno razliko v vrednostih za BALP ( $p=0,031$ ), in sicer so imele preiskovanke z genotipom TT v genu za *Wnt16* statistično značilno višje koncentracije BALP, kar pomeni, da je povečana tvorba kosti, ki pa se ne odraža v vrednostih MKG.
- Pri osteoporoznih ženskah, zdravljenih z raloksifenom, smo ugotovili po enoletnem zdravljenju statistično značilno zmanjšanje vrednosti osteokalcina v serumu pri ženskah z genotipom CT, kar nakazuje, da je odzivnost na zdravljenje z raloksifenom genotipsko pogojena.
- Pri osteoporoznih ženskah, zdravljenih z alendronatom, smo ugotovili, da je zdravilo najmanj učinkovito pri preiskovankah z genotipom TT, saj je pri njih vrednost deoksipiridinolina v serumu največja, kar kaže na najmanjše zaviranje kostne razgradnje.
- Pogostost polimorfizma v genu za *Wnt16* med zdravimi, osteoporoznimi in osteoartrozni preiskovanci ni bila statistično različna.
- Relativne frekvence genotipov polimorfizma *rs3736228* v genu za *LRP5* v celotni skupini preiskovancev znašajo 65,0% : 20,2% : 1,6% za genotipe CC : CT : TT.
- V skupini moških smo dokazali vpliv polimorfizma v genu za *LRP5* na vrednost MKG ledvenih vretenc ( $p=0,016$ ) in sicer moški z genotipom CT in TT imajo nižjo MKG ledvenih vretenc kot moški z genotipom CC.
- Prisotnost polimorfizma v genu za *LRP5* statistično značilno vpliva na serumsko vrednost parathormona v skupini premenopavznih žensk ( $p=0,007$ ), čeprav so koncentracije PTH v obeh skupinah znotraj referenčnih vrednosti.
- V skupini pomenopavznih žensk smo dokazali, da je polimorfizem v genu za *LRP5* povezan z nižjo MKG kolka, zato predstavlja dejavnik tveganja za razvoj osteoporoze.

- Prisotnost polimorfizma v genu za LRP5 ne vpliva na odzivnost na zdravljenje bodisi z raloksifenom bodisi z alendronatom.
- Genotipa CT in TT polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 predstavljata rizična genotipa za pojav osteoporoze in/ali osteoartroze pri moških.
- V raziskavi nismo ugotovili povezanosti proučevanih polimorfizmov s pojavnostjo zlomov.

Rezultati naše raziskave predstavljajo prispevek k pojasnjevanju genetskih vplivov na nagnjenost k osteoporozi. Polimorfizem v genu za LRP5 ima klinično pomemben vpliv na razvoj osteoporoze. Pri ugotavljanju povezanosti polimorfizma v genu za *Wnt16* nismo ugotovili pomembnih povezav z osteoporoznim fenotipom. Potrditev kliničnega pomena polimorfizma *rs3736228* v genu za LRP5 bo lahko omogočila njegovo uporabo kot diagnostičnega kazalca za identifikacijo preiskovancev z večjim tveganjem za razvoj osteoporoze, predstavlja pa tudi potencialno tarčo za razvoj zdravil za zdravljenje osteoporoze.

## LITERATURA

1. Kocijančič A: Osteoporoza: diagnostika in zdravljenje. Farmacevtski vestnik 1999; 50: 1-6
2. Preželj J: Motnje presnove kalcija in kostne bolezni. Interna medicina, 4. Izdaja, Ljubljana 2011
3. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V et al: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. Farmacevtski vestnik 2012; 63: 269-278
4. Paradowska A, Lacki JK: Genetic aspect of osteoporosis. Central European Journal Immunology 2007; 32 (3): 172-180
5. Liu YJ, Zhang L, Papasian CJ et al: Genome-wide association studies for osteoporosis: A 2013 Update. Journal of Bone Metabolism 2014; 21: 99-116
6. Estrada K, Stykarsdottir U, Evangelou E et al: Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. Nature Genetics 2012; 44 (5): 491-501
7. Ralston SH, Uitterlinden AG: Genetics of osteoporosis. Endocrine Reviews 2010; 31 (5): 629-662
8. Ralston SH: Genetics of osteoporosis. New York Academy of Sciences. 2010; 1192: 181-189
9. Liu F, Kohlmeier S, Wang CY: Wnt signaling and skeletal development. Cellular Signalling 2008; 20: 999 – 1009
10. Kobayashi Y, Maeda K, Takahashi N: Roles of Wnt signaling in bone formation and resorption. Japanese Dental Science Review 2008; 44, 76-82
11. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA: Regulation of bone mass by Wnt signaling. Journal of Clinic Investigation 2006; 116: 1202-1208
12. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM: Wnt signaling in osteoblasts and bone disease. Gene 2004; 341: 19-39



13. Sugimura R, Li L: Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Research* 2010; 90: 243-256
14. Baron R, Kneissel M: WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature medicine* 2013; 19: 179-192
15. Zheng HF, Tobias JH, Duncan E et al: *Wnt16* influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *Plos Genetics* 2012; 8: 1-13
16. Wnt16 wingless-type MMTV integration site family, member 16 [*Homo sapiens* (human)]: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51384> dostopno 17.08.2014
17. Wnt16\_Human: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UBV4> dostopno 17.08.2014
18. García-Ibarbia C, Pérez-Núñez M, Olmos JM et al: Missense polymorphisms of the WNT16 gene are associated with bone mass, hip geometry and fractures. *Osteoporos Int* 2013; 24: 2449-2454
19. Koller DL, Zheng HF, Karasik D et al: Meta-analysis of genome-wide studies identifies *WNT16* and *ESR1* SNPS associated with bone mineral density in premenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research* 2013; 28 (3): 547-558
20. Koay MA, Brown MA: Genetic disorders of the LRP5-Wnt signalling pathway affecting the skeleton. *Trends in Molecular Medicine* 2005; 11: 129-137
21. LRP5\_Human: <http://www.uniprot.org/uniprot/O75197> dostopno 17.08.2014
22. LRP5 low density lipoprotein receptor-related protein 5 [*Homo sapiens* (human)]: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4041> dostopno 17.08.2014
23. Riancho JA, Olmos JM, Pineda B et al: Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of *LRP5* and *LRP6* polymorphisms with replication. *European Journal of Endocrinology* 2011; 164: 123-131
24. Van Wesenbeeck J, Cleiren E, Gram J et al: Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (*LRP5*) gene in different conditions with an increased bone density. *The American Journal of Human Genetics*. 2003; 72: 763-771

25. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M et al: Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *The Lancet* 2008; 371: 1505-12
26. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K et al: Twenty bone-mineral-density loci identified by large scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nature genetics* 2009; 41: 1199-1206
27. Zavrtnik A, Preželj J, Kocijančič A et al: Exonic, but not intronic polymorphisms of ESR1 gene might influence the hypolipemic effect of raloxifene. *Science Direct* 2007; 104: 22-26
28. Arko B, Preželj J, Komel R et al: No major effect of estrogen receptor beta gene *RsaI* polymorphism on bone mineral density and response to alendronate therapy in postmenopausal osteoporosis. *Pergamon* 2002; 81: 14-152
29. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmacevtski vestnik* 2004; 55: 215-220
30. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR, ABI Applied Biosystems, Tutorial, 1-15:  
[http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr\\_vs\\_tradpcr.pdf](http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf)  
dostopno 25.02.2014
31. TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix Protocol, ABI Applied Biosystems Part Number 4304449. Rev. D.:  
[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042996.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042996.pdf) dostopno 25.02.2014
32. Poole KE, Reeve J: Parathyroid hormone-a bone anabolic and catabolic agent. *Current Opinion in Pharmacology* 2005; 5(6): 612-7

## PRILOGE

Priloga I: Z osteoporozo povezani geni, odkriti v GWA študijah in meta analizah (7)

Gen	P - vrednost	Študija	Populacija	Gen	P - vrednost	Študija	Populacija	Gen	P - vrednost	Študija	Populacija
<i>ABCF2</i>	$2,56 \times 10^{-5}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>C12ORF23</i>	$9,6 \times 10^{-10}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>CTNNB1</i>	$8,1 \times 10^{-10}$	meta-analiza	belci severne Evrope
<i>AD-AMTS18</i>	$2,56 \times 10^{-5}$	GWAS	belci ZDA	<i>C18ORF19</i>	$4,9 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>CYLD</i>	$6,2 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>ALDH7A1</i>	$2,08 \times 10^{-9}$	GWAS	Kitajci	<i>CDKAL1</i>	$1,8 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>DCDC5</i>	$2,3 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci severne Evrope
<i>ANAPC1</i>	$1,5 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>CLCN7</i>	$1,5 \times 10^{-16}$	GWAS	pomenopavzne ženske bele rase	<i>DHH</i>	$1,2 \times 10^{-15}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>ARHGAP1</i>	$4,0 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci severne Evrope	<i>CLDN14</i>	$4,15 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>DNM3</i>	$8,5 \times 10^{-15}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>AXINI</i>	$2,2 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>CPN1</i>	$9 \times 10^{-10}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>DOK6</i>	$8,87 \times 10^{-7}$	GWAS	belci ZDA
<i>C7orf58</i>	$1,1 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>CRHR1</i>	$1,4 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci severne Evrope	<i>ERC1</i>	$5,6 \times 10^{-12}$	meta-analiza	belci in Azijci

Priloga I: Z osteoporozo povezani geni, odkriti v GWA študijah in meta analizah (7)

Gen	P - vrednost	Študija	Populacija	Gen	P - vrednost	Študija	Populacija	Gen	P - vrednost	Študija	Populacija
<i>ESR1</i>	$6,1 \times 10^{-11}$	GWAS	belci Islandije	<i>GPR177/WLS</i>	$3,3 \times 10^{-13}$	meta-analiza	belci severne Evrope	<i>KCNMA1</i>	$1,5 \times 10^{-12}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>FAM9B</i>	$1,2 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>HDAC5</i>	$1,7 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci severne Evrope	<i>LACTB2</i>	$4,7 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>FLJ42280</i>	$9,4 \times 10^{-12}$	meta-analiza	belci severne Evrope	<i>IBSP</i>	$7,6 \times 10^{-7}$	GWAS	pomenopavzne ženske bele rase	<i>LEKR1</i>	$4,5 \times 10^{-12}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>FMN2/GREM2</i>	$1,9 \times 10^{-8}$	GWAS	belci severne Evrope	<i>IDUA</i>	$5,2 \times 10^{-15}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>LIN7C</i>	$4,9 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>FOXL1</i>	$1,7 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci severne Evrope	<i>IL21R</i>	$2,31 \times 10^{-6}$	GWAS	Kitajci	<i>LRP4</i>	$4,0 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci severne Evrope
<i>FUBP3</i>	$3,1 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>INSIG2</i>	$1,2 \times 10^{-10}$	meta-analiza	belci in Azijci	<b><i>LRP5</i></b>	<b><math>6,3 \times 10^{-12}</math></b>	<b>GWAS</b>	<b>belci</b>
<i>GALNT3</i>	$2,3 \times 10^{-5}$	GWAS	pomenopavzne ženske bele rase	<i>JAG1</i>	$5,27 \times 10^{-8}$	GWAS	ženske južne Kitajske	<i>LRRC4C</i>	$8,89 \times 10^{-7}$	GWAS	belci ZDA
<i>GPATCH1</i>	$9,2 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>KIAA2018</i>	$4,1 \times 10^{-10}$	ni podatka	belci in Azijci	<i>MARK3</i>	$1,8 \times 10^{-9}$	GWAS	Islandija

Priloga I: Z osteoporozo povezani geni, odkriti v GWA študijah in meta analizah (7)

Gen	P - vrednost	Študija	Populacija	Gen	P - vrednost	Študija	Populacija	Gen	P - vrednost	Študija	Populacija
<i>MBL2</i>	$1,6 \times 10^{-12}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>NTANI</i>	$1,7 \times 10^{-11}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SOX4</i>	$1,8 \times 10^{-8}$	GWAS	pomenopavzne ženske bele rase
<i>MEF2C</i>	$1,3 \times 10^{-13}$	GWAS	pomenopavzne ženske	<i>RSPO3</i>	$2,2 \times 10^{-9}$	GWAS	pomenopavzne ženske bele rase	<i>SOX6</i>	$6,4 \times 10^{-10}$	meta-analiza	belci severne Evrope
<i>MEPE</i>	$4,0 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci severne Evrope	<i>RUNX2</i>	$5,6 \times 10^{-11}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SOX9</i>	$3,7 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>MPP7</i>	$2,9 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SALL1/CYLD</i>	$5,0 \times 10^{-12}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SP7</i>	$9,9 \times 10^{-11}$	GWAS	Islandija
<i>OSBPL1A</i>	$4,22 \times 10^{-7}$	GWAS	belci ZDA	<i>SLC25A13</i>	$8,1 \times 10^{-48}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SPP1</i>	$6,0 \times 10^{-8}$	GWAS	pomenopavzne ženske bele rase
<i>PTHLH</i>	$1,9 \times 10^{-12}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SMG6</i>	$1,7 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SPP2</i>	$4,64 \times 10^{-7}$	GWAS	belci ZDA
<i>RAP1A</i>	$2,8 \times 10^{-7}$	GWAS	belci ZDA	<i>SMOC1</i>	$3,98 \times 10^{-13}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SPTBN1</i>	$1,6 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci severne Evrope
<i>PKDCC</i>	$1,3 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci in Azijci	<i>SOST</i>	$2,1 \times 10^{-8}$	GWAS	Islandija	<i>STARD3NL</i>	$1,1 \times 10^{-9}$	meta-analiza	belci severne Evrope

## Priloga I: Z osteoporozo povezani geni, odkriti v GWA študijah in meta analizah (7)

<b>Gen</b>	<b>P -vrednost</b>	<b>Študija</b>	<b>Populacija</b>
<i>TBC1DB</i>	$1,48 \times 10^{-7}$	GWAS	belci ZDA
<i>TGFBR3</i>	$2,13 \times 10^{-8}$	GWAS	belci ZDA
<i>TNFSF11/RANKL</i>	$2,0 \times 10^{-14}$	GWAS	belci
<i>TNFRS-F11A/RANK</i>	$9,4 \times 10^{-9}$	GWAS	Islandija
<i>TNFRS-F11B/OPG</i>	$3,5 \times 10^{-16}$	GWAS	Islandija
<b><i>WNT16</i></b>	<b><math>1,4 \times 10^{-16}</math></b>	<b>meta-analiza</b>	<b>belci in Azijci</b>
<i>WNT4</i>	$9,6 \times 10^{-11}$	meta-analiza	belci severne Evrope
<i>XKR9</i>	$4,7 \times 10^{-8}$	meta-analiza	belci in Azijci
<i>ZBTB40</i>	$3,2 \times 10^{-10}$	meta-analiza	belci severne Evrope

Priloga II: Genotipi preiskovancev za polimorfizem *rs2707466* v genu za *Wnt16* in polimorfizem *rs3736228* v genu za *LRP5*

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
666	prevalenca	CC	CC	702	prevalenca	CT	CC
667	prevalenca	TT	CT	703	prevalenca	CC	CC
668	prevalenca	TT	CC	704	prevalenca	TT	CC
669	prevalenca	TT	CC	705	prevalenca	TT	CC
670	prevalenca	TT	CC	706	prevalenca	TT	CT
671	prevalenca	CT	CT	707	prevalenca	CT	CC
672	prevalenca	CT	CC	708	prevalenca	CT	CC
673	prevalenca	CT	CC	709	prevalenca	CT	CC
674	prevalenca	TT	CC	710	prevalenca	CT	CC
676	prevalenca	CT	CC	711	prevalenca	CC	CT
677	prevalenca	TT	CC	712	prevalenca	CT	CT
678	prevalenca	CT	CT	713	prevalenca	CT	CC
679	prevalenca	TT	CC	714	prevalenca	CT	CC
680	prevalenca	CT	CC	715	prevalenca	CC	CT
681	prevalenca	CC	CC	716	prevalenca	CC	CC
682	prevalenca	CT	CC	717	prevalenca	CT	CC
683	prevalenca	*	CC	718	prevalenca	CT	CC
684	prevalenca	CT	CC	719	prevalenca	CT	CC
685	prevalenca	TT	CT	720	prevalenca	CT	CC
686	prevalenca	TT	CC	721	prevalenca	CC	CC
687	prevalenca	CC	CC	722	prevalenca	CC	CC
688	prevalenca	CC	CC	723	prevalenca	CT	CC
689	prevalenca	CC	CT	724	prevalenca	CT	CT
690	prevalenca	CC	CC	725	prevalenca	TT	CT
691	prevalenca	TT	CT	726	prevalenca	CT	CC
692	prevalenca	CC	CC	727	prevalenca	TT	CC
693	prevalenca	TT	CC	728	prevalenca	CT	CT
694	prevalenca	CT	CC	729	prevalenca	CT	CT
695	prevalenca	CT	CC	730	prevalenca	CC	CC
696	prevalenca	CT	CC	731	prevalenca	CT	CC
697	prevalenca	CT	CC	732	prevalenca	CC	CC
698	prevalenca	TT	CC	733	prevalenca	CT	CT
699	prevalenca	TT	CT	734	prevalenca	TT	CT
700	prevalenca	CT	CC	735	prevalenca	CT	CC
701	prevalenca	CT	CT	736	prevalenca	TT	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
737	prevalenca	TT	CC	780	prevalenca	TT	CT
738	prevalenca	CT	CT	781	prevalenca	TT	CC
739	prevalenca	TT	CC	782	prevalenca	CT	CT
740	prevalenca	CT	CC	783	prevalenca	CT	CC
741	prevalenca	CT	CC	785	prevalenca	CC	CC
742	prevalenca	TT	CC	786	prevalenca	TT	CT
743	prevalenca	TT	CC	787	prevalenca	CT	TT
744	prevalenca	CT	CT	792	prevalenca	TT	CC
745	prevalenca	TT	CC	793	prevalenca	CT	CC
746	prevalenca	TT	CC	794	prevalenca	TT	CC
747	prevalenca	CT	CC	795	prevalenca	CC	CC
748	prevalenca	CT	CC	796	prevalenca	TT	CT
749	prevalenca	CT	TT	797	prevalenca	TT	CC
750	prevalenca	TT	CC	798	prevalenca	TT	CC
751	prevalenca	CC	CC	799	prevalenca	TT	CT
752	prevalenca	CC	CC	800	prevalenca	TT	CC
753	prevalenca	CC	CC	801	prevalenca	CT	CC
754	prevalenca	TT	CC	802	prevalenca	CC	CC
756	prevalenca	TT	CC	803	prevalenca	TT	CT
758	prevalenca	*	CT	804	prevalenca	CC	CC
759	prevalenca	*	CC	805	prevalenca	TT	CT
760	prevalenca	CT	CC	806	prevalenca	CC	CC
761	prevalenca	CT	CC	807	prevalenca	CT	CC
762	prevalenca	CT	CT	808	prevalenca	CT	CC
763	prevalenca	*	CC	809	prevalenca	TT	CC
765	prevalenca	TT	CC	810	prevalenca	CT	CC
766	prevalenca	CC	CC	811	prevalenca	CT	CC
767	prevalenca	CC	CC	812	prevalenca	CC	CC
769	prevalenca	*	CC	813	prevalenca	CT	CC
770	prevalenca	CT	CC	814	prevalenca	TT	CC
771	prevalenca	CC	CC	815	prevalenca	CT	CC
772	prevalenca	*	CC	816	prevalenca	CC	CC
773	prevalenca	TT	CC	817	prevalenca	CC	CT
774	prevalenca	*	CC	818	prevalenca	CT	CC
775	prevalenca	CC	CT	819	prevalenca	CT	CC
778	prevalenca	CT	CC	820	prevalenca	CT	CC
779	prevalenca	CC	CT	821	prevalenca	CT	CC



Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
822	prevalenca	CT	CC	944	prevalenca	CT	CC
823	prevalenca	CT	CC	945	prevalenca	CT	CT
824	prevalenca	CC	CC	946	prevalenca	TT	CC
825	prevalenca	CT	CC	947	prevalenca	CT	CC
826	prevalenca	CC	CC	948	prevalenca	CT	CT
827	prevalenca	CC	CC	949	prevalenca	CC	CT
913	prevalenca	CT	CC	950	prevalenca	CC	CT
914	prevalenca	TT	CC	951	prevalenca	CT	CC
915	prevalenca	CT	CC	952	prevalenca	*	CC
916	prevalenca	CT	CC	953	prevalenca	TT	CC
917	prevalenca	CC	CC	954	prevalenca	CC	CC
918	prevalenca	TT	CT	955	prevalenca	CT	CT
919	prevalenca	CC	CC	956	prevalenca	CC	CC
920	prevalenca	CC	CC	957	prevalenca	TT	CC
921	prevalenca	CT	CC	958	prevalenca	CT	CC
922	prevalenca	CT	CC	959	prevalenca	TT	CC
923	prevalenca	TT	CC	960	prevalenca	TT	CC
924	prevalenca	CT	CC	961	prevalenca	**	CT
925	prevalenca	CT	CT	962	prevalenca	TT	CC
926	prevalenca	CC	CC	963	prevalenca	CC	CC
927	prevalenca	CT	CC	964	prevalenca	CC	CC
928	prevalenca	CT	CC	965	prevalenca	CT	CC
929	prevalenca	TT	CC	966	prevalenca	CT	CC
930	prevalenca	CT	CC	967	prevalenca	TT	CC
931	prevalenca	TT	CC	968	prevalenca	CT	CT
932	prevalenca	TT	CC	969	prevalenca	CT	CC
933	prevalenca	CC	CC	970	prevalenca	*	CC
934	prevalenca	CC	CC	971	prevalenca	*	CC
935	prevalenca	CT	CT	972	prevalenca	*	CC
936	prevalenca	CC	CC	973	prevalenca	CT	CT
937	prevalenca	CT	CC	974	prevalenca	CT	CC
938	prevalenca	TT	CC	975	prevalenca	CC	CC
939	prevalenca	CC	CC	976	prevalenca	CT	CC
940	prevalenca	CT	CT	977	prevalenca	CC	CC
941	prevalenca	CT	CC	978	prevalenca	CT	CT
942	prevalenca	CT	CT	979	prevalenca	CT	CT
943	prevalenca	CT	CT	980	prevalenca	CC	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
981	prevalenca	TT	CC	1018	prevalenca	*	CC
982	prevalenca	CC	CC	1019	prevalenca	TT	CT
983	prevalenca	CT	CC	1020	prevalenca	CC	CC
984	prevalenca	TT	CT	1021	prevalenca	CT	CC
985	prevalenca	CC	CC	1022	prevalenca	CC	CT
986	prevalenca	CC	CC	1023	prevalenca	*	CC
987	prevalenca	CT	CC	1024	prevalenca	*	CC
988	prevalenca	TT	CC	1025	prevalenca	CT	CC
989	prevalenca	TT	CC	1026	prevalenca	CT	CC
990	prevalenca	TT	CC	1027	prevalenca	CT	CC
991	prevalenca	CT	CC	1028	prevalenca	TT	CC
992	prevalenca	CT	CC	1029	prevalenca	CT	CT
993	prevalenca	CC	CC	1030	prevalenca	TT	CC
994	prevalenca	CT	CC	1031	prevalenca	CT	CC
995	prevalenca	TT	CC	1032	prevalenca	CT	CC
996	prevalenca	TT	CT	1033	prevalenca	TT	CC
997	prevalenca	CT	CT	1034	prevalenca	CC	CC
998	prevalenca	TT	TT	1035	prevalenca	TT	CC
999	prevalenca	*	CC	1036	prevalenca	CC	CC
1000	prevalenca	CC	CC	1037	prevalenca	TT	CC
1001	prevalenca	TT	CT	1038	prevalenca	CT	CC
1002	prevalenca	CT	CC	1039	prevalenca	CT	CC
1003	prevalenca	CT	CT	1040	prevalenca	TT	CT
1004	prevalenca	CT	CC	1041	prevalenca	TT	CC
1005	prevalenca	TT	CC	1042	prevalenca	CT	CT
1006	prevalenca	CT	CC	1043	prevalenca	CT	CT
1007	prevalenca	CT	CC	1044	prevalenca	TT	CT
1008	prevalenca	CT	CC	1045	prevalenca	*	CC
1009	prevalenca	TT	CC	1046	prevalenca	CC	CC
1010	prevalenca	CT	CC	1047	prevalenca	*	CT
1011	prevalenca	TT	CC	1048	prevalenca	*	CC
1012	prevalenca	TT	CT	1049	prevalenca	CC	CC
1013	prevalenca	CC	CC	1050	prevalenca	*	CC
1014	prevalenca	TT	CT	1052	prevalenca	*	CC
1015	prevalenca	CT	TT	1053	prevalenca	*	CC
1016	prevalenca	CT	CC	1054	prevalenca	CC	CC
1017	prevalenca	CC	CC	1055	prevalenca	*	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
1056	prevalenca	TT	CC	1094	prevalenca	CC	CC
1057	prevalenca	CT	CC	1095	prevalenca	TT	CT
1058	prevalenca	CC	CC	1096	prevalenca	TT	CC
1059	prevalenca	CC	TT	1097	prevalenca	CT	CC
1060	prevalenca	TT	CC	1098	prevalenca	CC	CC
1061	prevalenca	CT	CC	1099	prevalenca	CT	CT
1062	prevalenca	TT	CC	1100	prevalenca	TT	CT
1063	prevalenca	CC	CC	1101	prevalenca	CC	CT
1064	prevalenca	CC	CC	1102	prevalenca	CT	CC
1065	prevalenca	CT	CC	1103	prevalenca	TT	CC
1066	prevalenca	TT	CC	1104	prevalenca	CT	CC
1067	prevalenca	CT	CC	1105	prevalenca	CT	CT
1068	prevalenca	CC	CC	1106	prevalenca	CT	CT
1069	prevalenca	CC	CT	1107	prevalenca	CC	CC
1070	prevalenca	CT	CC	1108	prevalenca	TT	CC
1071	prevalenca	TT	CC	1109	prevalenca	CC	CT
1072	prevalenca	TT	CC	1110	prevalenca	CT	CC
1073	prevalenca	TT	CC	1111	prevalenca	CT	CT
1074	prevalenca	CT	CT	1112	prevalenca	CC	CC
1075	prevalenca	CT	CT	1113	prevalenca	TT	TT
1076	prevalenca	TT	CC	1115	prevalenca	CC	CC
1077	prevalenca	CT	CT	1116	prevalenca	CT	CT
1078	prevalenca	CT	CC	1117	prevalenca	TT	CC
1079	prevalenca	CT	CC	1118	prevalenca	*	CT
1080	prevalenca	CT	CT	1119	prevalenca	CT	CC
1081	prevalenca	CT	CC	1120	prevalenca	CT	CC
1082	prevalenca	CT	CC	1121	prevalenca	TT	CC
1083	prevalenca	CT	CC	1122	prevalenca	TT	CC
1084	prevalenca	CT	CT	1123	prevalenca	CT	CC
1085	prevalenca	CC	CC	1124	prevalenca	CC	CC
1086	prevalenca	TT	CT	1125	prevalenca	CC	CC
1087	prevalenca	CC	CC	1126	prevalenca	CT	CT
1088	prevalenca	CC	CT	1127	prevalenca	*	CC
1089	prevalenca	CT	CC	1129	prevalenca	CT	CT
1090	prevalenca	TT	CC	1130	prevalenca	CT	CC
1091	prevalenca	TT	CT	1131	prevalenca	CC	CT
1092	prevalenca	CC	CC	1132	prevalenca	CT	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
1133	prevalenca	TT	CC	C20	Vindišar	TT	CT
1134	prevalenca	CT	CC	C21	Vindišar	TT	CC
1135	prevalenca	CC	CC	C22	Vindišar	CC	/
1136	prevalenca	CT	CC	C23	Vindišar	CC	CC
1137	prevalenca	TT	CT	C24	Vindišar	TT	CC
1138	prevalenca	CC	CT	C25	Vindišar	TT	/
1139	prevalenca	CC	CC	C26	Vindišar	CC	CT
1140	prevalenca	**	CC	C27	Vindišar	TT	CC
1141	prevalenca	TT	CT	C28	Vindišar	CT	/
1142	prevalenca	CC	CC	C29	Vindišar	CT	/
1143	prevalenca	CC	CC	C30	Vindišar	CT	CC
1144	prevalenca	CC	CC	C31	Vindišar	CC	CC
1145	prevalenca	CC	CC	C32	Vindišar	CT	CC
1146	prevalenca	CT	CC	C33	Vindišar	CC	CC
1147	prevalenca	*	CC	C34	Vindišar	CT	CC
1148	prevalenca	CT	CT	C35	Vindišar	CC	CC
1149	prevalenca	CT	CC	C36	Vindišar	CC	/
1150	prevalenca	CT	CC	C37	Vindišar	TT	CT
C1	Vindišar	CT	CT	C38	Vindišar	TT	CC
C2	Vindišar	TT	CC	C39	Vindišar	TT	CC
C3	Vindišar	CT	/	C41	Vindišar	CT	/
C4	Vindišar	TT	CC	C42	Vindišar	CC	/
C5	Vindišar	TT	TT	C43	Vindišar	CC	/
C6	Vindišar	CT	CC	C44	Vindišar	CC	/
C7	Vindišar	CT	/	C45	Vindišar	CT	CT
C8	Vindišar	CT	CC	C49	Vindišar	CC	/
C9	Vindišar	CT	/	C50	Vindišar	TT	CC
C10	Vindišar	TT	CC	C51	Vindišar	CC	/
C11	Vindišar	CT	/	C52	Vindišar	CT	CC
C12	Vindišar	CT	CC	C53	Vindišar	TT	
C13	Vindišar	CT	CT	C54	Vindišar	TT	CC
C14	Vindišar	CC	CT	C55	Vindišar	CC	CT
C15	Vindišar	CT	/	C56	Vindišar	CT	CC
C16	Vindišar	TT	/	C57	Vindišar	CT	CT
C17	Vindišar	CC	CT	C61	Vindišar	TT	CC
C18	Vindišar	CT	CC	C62	Vindišar	CT	CC
C19	Vindišar	CC	CT	C65	Vindišar	TT	CT

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
C66	Vindišar	CT	/	o27	opg	CC	CC
C101	Vindišar	CT	/	o28	opg	TT	CC
C102	Vindišar	CC	/	o29	opg	TT	CC
C103	Vindišar	CT	/	o30	opg	TT	CC
C104	Vindišar	CT	/	o31	opg	CT	CT
C105	Vindišar	TT	/	o32	opg	CT	CC
C106	Vindišar	CT	/	o33	opg	TT	CT
C107	Vindišar	CC	/	o34	opg	TT	CC
C108	Vindišar	CC	/	o35	opg	TT	CC
C109	Vindišar	TT	/	o36	opg	CT	CC
C110	Vindišar	TT	/	o37	opg	CT	CC
o1	opg	CT	/	o38	opg	TT	CC
o2	opg	TT	CC	o39	opg	CT	CC
o3	opg	TT	CC	o40	opg	CT	CT
o4	opg	**	CT	o41	opg	CT	CC
o5	opg	CC	CC	o42	opg	CC	CC
o6	opg	**	CC	o43	opg	**	CC
o7	opg	CT	CC	o44	opg	TT	CC
o8	opg	CT	CC	o45	opg	CT	CC
o9	opg	TT	CC	o46	opg	CT	CC
o10	opg	CC	TT	o47	opg	CT	CC
o11	opg	CC	CC	o48	opg	CT	CC
o12	opg	CC	CT	o49	opg	CT	CC
o13	opg	CT	CC	o50	opg	TT	CC
o14	opg	CC	CT	o51	opg	TT	CC
o15	opg	CT	CC	o52	opg	CT	CC
o16	opg	CT	CT	o53	opg	CT	CC
o17	opg	TT	CC	o54	opg	CT	CC
o18	opg	CC	CC	o55	opg	CT	CC
o19	opg	TT	CC	o56	opg	TT	CT
o20	opg	TT	CC	o57	opg	CT	CC
o21	opg	CC	CC	o58	opg	CC	CC
o22	opg	CT	CC	o59	opg	CT	CC
o23	opg	CC	CC	o60	opg	TT	CC
o24	opg	TT	CT	o61	opg	TT	TT
o25	opg	**	CC	o62	opg	CT	CC
o26	opg	CT	CC	o63	opg	CT	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
o64	opg	CT	CC	o103	opg	CT	CC
o65	opg	TT	CC	o104	opg	TT	CC
o66	opg	CC	CC	o105	opg	CT	CT
o67	opg	CC	CC	o106	opg	CT	CC
o68	opg	CT	CC	o107	opg	CT	CC
o69	opg	CC	CC	o108	opg	CT	CC
o70	opg	CT	CC	o110	opg	CT	CC
o71	opg	CC	CC	o111	opg	CT	TT
o72	opg	CT	CC	o112	opg	CT	CT
o73	opg	CT	CT	o113	opg	CT	CT
o74	opg	CT	CT	o114	opg	CT	CT
o75	opg	CT	CT	o115	opg	TT	CC
o76	opg	CT	CC	o116	opg	*	CC
o77	opg	TT	CC	o117	opg	CT	CT
o78	opg	CT	CT	c1	D.Komadina	CC	CC
o79	opg	TT	CC	c2	D.Komadina	CT	CT
o80	opg	CT	CC	c3		CT	/
o81	opg	CT	CT	c4		CC	/
o83	opg	CT	CC	c5	D.Komadina	CT	CC
o84	opg	CC	CC	c6	D.Komadina	CT	CC
o85	opg	CC	CT	c7		CT	/
o86	opg	CC	CC	c8		TT	/
o87	opg	CC	CC	c9	D.Komadina	CT	CT
o88	opg	TT	CC	c10		TT	/
o89	opg	CT	CC	c12	D.Komadina	CT	CT
o90	opg	CC	CT	c13		TT	/
o91	opg	CC	CC	c14	D.Komadina	TT	CC
o92	opg	CT	CC	c31		CT	/
o94	opg	CT	CC	c33		CC	/
o95	opg	CT	CC	c34		CT	/
o96	opg	CT	CT	c35	D.Komadina	TT	CT
o97	opg	CT	CT	c36	D.Komadina	CT	CC
o98	opg	CT	CC	c37	D.Komadina	CC	CC
o99	opg	CT	CC	c38		CC	/
o100	opg	CT	CC	c39		CC	/
o101	opg	CT	CC	c40	D.Komadina	TT	TT
o102	opg	TT	CC	c41	D.Komadina	CT	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
c42	D.Komadina	TT	CC	c80		CC	/
c43	D.Komadina	CT	CC	c81		CT	/
c44		TT	/	c82		CT	/
c45	D.Komadina	CC	CT	c83		CT	/
c46		CT	/	c84	D.Komadina	CT	CC
c47		CT	/	c85		TT	/
c48		CC	/	c87		CT	/
c49	D.Komadina	CT	CC	c88		CC	/
c50	D.Komadina	CT	CC	c89		CT	/
c51		CT	/	c90	D.Komadina	CC	CC
c52	D.Komadina	CT	CC	c91		CT	/
c53	D.Komadina	CC	CC	c92		CT	/
c54		CT	/	c93		CC	/
c55		CT	/	c94		**	/
c56		CC	/	c95		CT	/
c57		CC	/	c96		CT	/
c58		CT	/	c97		CT	/
c59		TT	/	c98		TT	/
c60		TT	/	c99		TT	/
c61		CC	/	c100		CT	/
c62		TT	/	r587	ralo	CT	CC
c63		TT	/	r588	ralo	CT	CC
c64		CT	/	r589	ralo	CT	CC
c65		CT	/	r590	ralo	CC	CC
c66		CC	/	r591	ralo	CT	CC
c67		CC	/	r593	ralo	CC	CT
c69		CT	/	r594	ralo	CC	CC
c70		TT	/	r595	ralo	CC	CC
c71		CC	/	r596	ralo	CT	CC
c72		CC	/	r597	ralo	CC	CC
c73		CC	/	r598	ralo	**	CC
c74		CC	/	r599	ralo	CT	CC
c75		CC	/	r600	ralo	TT	CC
c76		CT	/	r601	ralo	TT	CC
c77		TT	/	r602	ralo	TT	CC
c78		CT	/	r603	ralo	CT	CC
c79		TT	/	r604	ralo	CT	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
r605	ralo	CC	CC	r662	ralo	CC	CC
r606	ralo	TT	CT	r663	ralo	CT	CC
r607	ralo	TT	CC	r664	ralo	CC	CC
r608	ralo	TT	CC	r665	ralo	CC	CC
r609	ralo	CC	CC	r666	ralo	CC	CC
r610	ralo	CT	TT	r667	ralo	TT	CC
r611	ralo	CC	CC	f92	Fosamax	CT	/
r612	ralo	CT	CC	f93	Fosamax	CC	/
r613	ralo	TT	CC	f94	Fosamax	TT	CC
r614	ralo	CT	CC	f95	Fosamax	CT	CC
r615	ralo	TT	CT	f96	Fosamax	CC	CC
r616	ralo	CT	CC	f97	Fosamax	TT	CC
r617	ralo	CT	CT	f98	Fosamax	CT	CC
r618	ralo	CC	CC	f99	Fosamax	TT	CC
r619	ralo	CT	CT	f100	Fosamax	CT	CT
r620	ralo	CC	CC	f101	Fosamax	CC	CC
r621	ralo	CC	CC	f103	Fosamax	TT	CC
r622	ralo	CT	CC	f106	Fosamax	CT	CC
r623	ralo	TT	CC	f107	Fosamax	CC	/
r624	ralo	TT	CC	f108	Fosamax	TT	CT
r625	ralo	TT	CC	f109	Fosamax	TT	CC
r626	ralo	CT	CC	f110	Fosamax	CC	CC
r627	ralo	CT	CT	f111	Fosamax	CT	CT
r628	ralo	CT	CC	f112	Fosamax	CC	CC
r629	ralo	CT	CT	f113	Fosamax	CT	CT
r630	ralo	CT	CT	f114	Fosamax	TT	CC
r631	ralo	CT	CC	f115	Fosamax	CC	CC
r633	ralo	CT	CT	f116	Fosamax	CT	/
r635	ralo	TT	CC	f117	Fosamax	CT	CC
r636	ralo	CC	CC	f118	Fosamax	CT	CC
r637	ralo	CT	CC	f119	Fosamax	CC	CC
r638	ralo	CT	CT	f120	Fosamax	CT	CT
r639	ralo	CT	CC	f121	Fosamax	CT	CC
r640	ralo	CC	CC	f122	Fosamax	TT	CT
r642	ralo	CT	/	f123	Fosamax	CT	CC
r643	ralo	CT	/	f124	Fosamax	TT	CT
r659	ralo	CC	CC	f125	Fosamax	CC	CT



Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
f126	Fosamax	CT	CC	f163	Fosamax	CT	CC
f127	Fosamax	CC	/	f165	Fosamax	*	/
f128	Fosamax	TT	/	f167	Fosamax	CT	CC
f129	Fosamax	CT	CC	f168	Fosamax	CC	CC
f130	Fosamax	TT	CC	f169	Fosamax	CC	CC
f131	Fosamax	CC	CC	f170	Fosamax	TT	CT
f132	Fosamax	CC	/	f172	Fosamax	TT	/
f133	Fosamax	CT	/	f173	Fosamax	TT	/
f134	Fosamax	CC	CT	f174	Fosamax	CT	CT
f135	Fosamax	TT	CT	f175	Fosamax	CT	CC
f136	Fosamax	CT	CC	f176	Fosamax	TT	CC
f137	Fosamax	CT	CC	z1002	ZIT	CT	CC
f138	Fosamax	CC	CC	z1003	ZIT	TT	CC
f139	Fosamax	TT	CC	z1005	ZIT	CT	CT
f140	Fosamax	TT	CT	z1007	ZIT	TT	CC
f141	Fosamax	CT	/	z1008	ZIT	CT	CC
f142	Fosamax	CT	CC	z1009	ZIT	CC	CC
f143	Fosamax	CT	/	z1010	ZIT	CT	CC
f144	Fosamax	CT	/	z1012	ZIT	CT	CC
f145	Fosamax	TT	/	z1021	ZIT	TT	CC
f146	Fosamax	CC	CC	z1028	ZIT	CT	CC
f147	Fosamax	CT	/	z1029	ZIT	CT	/
f148	Fosamax	CC	/	z1031	ZIT	CC	CC
f149	Fosamax	TT	CC	z1032	ZIT	TT	CC
f150	Fosamax	CT	/	z1033	ZIT	TT	CC
f151	Fosamax	TT	/	z1034	ZIT	TT	CC
f152	Fosamax	CT	/	z1035	ZIT	TT	CC
f153	Fosamax	CT	/	z1036	ZIT	TT	CC
f154	Fosamax	*	/	z1037	ZIT	CC	CT
f155	Fosamax	CT	CC	z1038	ZIT	CC	CC
f156	Fosamax	TT	CC	z1039	ZIT	CT	CC
f157	Fosamax	CT	/	z1040	ZIT	CT	CT
f158	Fosamax	CT	CC	z1041	ZIT	TT	CC
f159	Fosamax	TT	CC	z1042	ZIT	TT	CC
f160	Fosamax	TT	CT	z1043	ZIT	CT	CC
f161	Fosamax	CT	CC	z1044	ZIT	CT	/
f162	Fosamax	CT	/	z1045	ZIT	CT	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
z1046	ZIT	CT	/	z1088	ZIT	CT	CC
z1047	ZIT	CT	/	z1089	ZIT	CT	CC
z1049	ZIT	CC	CC	z1090	ZIT	TT	CC
z1050	ZIT	TT	/	z1091	ZIT	CT	CC
z1051	ZIT	CC	CC	z1092	ZIT	CT	CC
z1052	ZIT	CC	CT	z1093	ZIT	CT	CC
z1053	ZIT	CT	CC	z1094	ZIT	CC	CC
z1054	ZIT	CT	CC	z1095	ZIT	TT	CT
z1055	ZIT	CC	CC	z1098	ZIT	CC	CT
z1056	ZIT	CC	CC	z1099	ZIT	TT	/
z1057	ZIT	CT	CT	z1100	ZIT	TT	CC
z1058	ZIT	TT	CC	z1101	ZIT	TT	CC
z1059	ZIT	CT	CC	z1102	ZIT	TT	CT
z1060	ZIT	CC	CC	z1103	ZIT	CT	CT
z1061	ZIT	CT	CC	z1104	ZIT	CT	CC
z1064	ZIT	CT	CT	z1105	ZIT	CC	CT
z1065	ZIT	CT	CT	z1106	ZIT	CT	CC
z1066	ZIT	CC	CC	z1107	ZIT	TT	CC
z1067	ZIT	CT	CC	z1108	ZIT	CC	CT
z1068	ZIT	CT	CC	z1109	ZIT	CT	/
z1069	ZIT	TT	CC	z1110	ZIT	CC	CC
z1070	ZIT	CT	CC	z1112	ZIT	CT	/
z1071	ZIT	CT	CC	z1113	ZIT	CT	/
z1072	ZIT	TT	CC	z1114	ZIT	CT	/
z1073	ZIT	TT	/	1536		CC	CC
z1074	ZIT	CT	CC	1538		CT	CC
z1075	ZIT	TT	CT	1539		TT	CC
z1076	ZIT	TT	CT	1540		CT	CT
z1077	ZIT	TT	CC	1541		CT	CT
z1078	ZIT	TT	CC	1542		CT	CT
z1079	ZIT	CC	CT	1543		CC	CC
z1080	ZIT	CT	/	1544		CT	CC
z1081	ZIT	CT	CT	1546		CC	CC
z1082	ZIT	TT	CC	1548		CT	CC
z1083	ZIT	CC	CC	1549		CT	CC
z1085	ZIT	CT	CC	1550		CC	CC
z1087	ZIT	CT	CC	1551		CC	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
1552		TT	CC	1603		CC	CC
1553		CT	CC	1604		CT	CC
1554		CT	CC	1606		CC	CC
1555		CT	CC	1607		TT	CT
1558		CT	CT	1608		CC	CT
1559		CC	CT	1609		CC	CC
1560		CT	CC	1610		CT	CC
1561		TT	CC	1611		CT	CC
1562		CT	CC	1612		CC	CC
1564		CT	CC	1613		CT	CT
1565		CC	CC	1614		CC	CC
1566		CT	CC	1615		TT	CC
1567		CT	CC	1616		TT	TT
1569		CC	CC	1617		*	CC
1570		CC	CC	1618		CT	CC
1572		CT	CC	1619		CT	CC
1573		CT	CC	1620		CT	CC
1574		TT	CC	1621		TT	CC
1575		CT	CC	1622		CC	CC
1578		TT	CT	1623		TT	CT
1580		CT	CC	1624		CT	CC
1581		CC	CC	1625		TT	CC
1582		TT	CT	1626		CT	CC
1583		CT	CT	1627		CT	CC
1584/1		*	CT	1628		CT	CT
1584/2		CC	CT	1630		CC	CC
1585		CT	CC	1631		CT	CC
1587		CC	CC	1632		CT	CC
1588		CC	CC	1633		TT	CC
1590		CT	CC	1634		CT	CT
1592		CT	CT	1636		CT	CC
1595		CT	CT	1638		CC	CT
1596		CT	CC	1639		TT	CT
1597		TT	CC	1640		TT	CC
1598		TT	CC	1641		CC	CC
1599		CT	CC	1643		TT	CC
1602		TT	TT	1644		CT	CC

Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5	Št. vzorca	oznaka	Wnt16	LRP5
1645		TT	CC	1655		TT	CC
1646		CT	CT	1656		TT	CT
1648		TT	CT	1657		CC	CT
1649		TT	CC	1658		CT	CC
1651		TT	CC	1659		CC	CC
1652		CC	CC	1660		CC	CT
1653		TT	CC	1661		CT	CC
1654		CT	CC				

\*neuspešni vzorci

\*\*ni vzorca