

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA VRHOVEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA VRHOVEC

**OCENA POVEZANOSTI IZRAŽANJA GENOV ZA VNETNE
CITOKINE IN GENOV SISTEMA RANK/RANKL/OPG V
SUBHONDRALEM KOSTNEM TKIVU**

**THE CORRELATION OF GENE EXPRESSION BETWEEN THE
INFLAMMATORY CYTOKINES AND THE RANK/RANKL/OPG
SYSTEM IN SUBCHONDRAL BONE TISSUE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem izdelala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod vodstvom mentorice prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorice asist. dr. Janje Zupan, mag. farm.

Vzorci subhondralne kostnine smo pridobili na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Izolacijo molekule RNA iz kostnega tkiva, vrednotenje izolirane RNA ter prepis izolirane RNA v cDNA so opravili na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Rada bi se zahvalila svoji mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., za možnost izdelave magistrske naloge in za strokoven pregled vsebine naloge. Še posebej se zahvaljujem somentorici asist. dr. Janji Zupan, mag. farm., za potrpežljivost in za vso strokovno pomoč pri delu v laboratoriju ter pisanju magistrske naloge.

Iskreno se zahvaljujem staršem, ker mi vedno stojijo ob strani in so mi omogočili študij. Zahvala gre tudi sestri za podporo in vse spodbudne besede.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Janje Zupan, mag. farm.

Barbara Vrhovec

Ljubljana, oktober 2015

Člani komisije za zagovor in oceno magistrske naloge:

Predsednik: prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Mentorica: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Somentorica: asist. dr. Janja Zupan, mag. farm.

Članica: doc. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	SUBHONDRA LNA KOSTNINA KOT SESTAVNI DEL SKLEPA	1
1.2	SISTEM DEJAVNIKOV RANK/RANKL/OPG	1
1.2.1	Sistem dejavnikov RANK/RANKL/OPG in njihov vpliv na osteoklastogenezo.....	1
1.2.2	Prenos signala v osteoklastih.....	3
1.3	POVEZANOST KOSTNEGA IN IMUNSKEGA SISTEMA	4
1.3.1	Osteoimunologija	4
1.3.2	Imunski odziv in njegov vpliv na osteoklastogenezo.....	5
1.4	VPLIV VNETNIH CITOKINOV IN DRUGIH MEDIATORJEV VNETJA NA SISTEM DEJAVNIKOV RANK/RANKL/OPG IN PROCES KOSTNE REMODELACIJE	6
1.4.1	Vpliv dejavnika tumorske nekroze $-\alpha$ (TNF- α) na sistem RANK/RANKL/OPG.....	6
1.4.2	Vpliv interleukina 1β (IL- 1β) na sistem RANK/RANKL/OPG.....	7
1.4.3	Vpliv interleukina 6 (IL-6) na sistem RANK/RANKL/OPG.....	7
1.4.4	Vpliv interferona- γ (IFN- γ) na sistem RANK/RANKL/OPG.....	7
1.4.5	Vpliv interleukina 10 (IL-10) na sistem RANK/RANKL/OPG.....	8
1.4.6	Vpliv transformirajočega rastnega dejavnika $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) na sistem RANK/RANKL/OPG.....	8
1.4.7	Vpliv prostaglandina E_2 (PGE $_2$) na sistem RANK/RANKL/OPG	9
1.4.8	Vpliv dušikovega oksida (NO) na sistem RANK/RANKL/OPG.....	10
1.5	OSTEOARTROZA.....	11
1.5.1	Opre delitev bolezni in etiologija	11
1.5.2	Patogeneza osteoartroze	11
1.5.3	Zdravljenje.....	13
2	NAMEN DELA	14
3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	VZORCI.....	15
3.2	KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR) ZA MERJENJE IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV	15
3.2.1	Materiali in naprave.....	15

3.2.2	Priprava materiala in komore za PCR	16
3.2.3	Princip metode qPCR za merjenje izražanja preiskovanih genov	17
3.3	STATISTIČNE METODE	22
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1	OSNOVNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANE SKUPINE	24
4.2	METODA qPCR.....	24
4.3	ZAZNAVANJE POMNOŽENIH PRODUKTOV PRI REAKCIJI qPCR.....	25
4.4	ANALIZA qPCR PODATKOV	27
4.4.1	Analiza krivulje pomnoževanja	27
4.4.2	Odčitavanje vrednosti Cp	28
4.4.3	Priprava standardne krivulje.....	29
4.4.4	Ocena talilne krivulje.....	30
4.5	UPORABA REFERENČNIH GENOV	31
4.6	OPTIMIZACIJA OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV	31
4.6.1	Priprava reakcijske zmesi za qPCR.....	32
4.6.2	Priprava standardov	32
4.6.3	Priprava kontrol	32
4.6.4	Priprava mikrotitrne ploščice za analizo	33
4.6.5	Rezultati in analiza optimizacije oligonukleotidnih začetnikov.....	34
4.7	OCENA IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV V VZORCIH SUBHONDRALE KOSTNINE.....	37
4.8	STATISTIČNA ANALIZA IN REZULTATI IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV V VZORCIH SUBHONDRALE KOSTNINE	40
4.8.1	Statistična analiza	40
4.8.2	Medsebojna povezanost izražanja genov za RANK, RANKL in OPG.....	42
4.8.3	Ocena povezanosti med izražanjem genov za vnetne citokine in geni sistema dejavnikov RANK/RANKL/OPG.....	43
4.8.4	Povezava med izražanjem gena za IFN- γ in gena za TNF- α	44
4.8.5	Medsebojna povezanost izražanja genov za IL-1 β , TNF- α in IL-6.....	45
4.8.6	Medsebojna povezanost izražanja gena za NOS3 in gena za TGF- β 1	46
5	SKLEP.....	48
6	LITERATURA	50
7	PRILOGE	54

7.1	Priloga 1: Test normalnosti porazdelitve izražanja preiskovanih genov v subhondralni kostnini.....	54
7.2	Priloga 2: Preglednica izmerjenih vrednosti izražanja preiskovanih in referenčnih genov v posameznih vzorcih subhondralne kostnine.....	55
7.3	Priloga 3: Spearmanova korelacijska analiza za preiskovane gene v subhondralni kostnini.....	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Pogoji za izvedbo reakcije qPCR in nastanek talilne krivulje.	17
Preglednica II: Priprava standardov.	18
Preglednica III: Priprava reakcijske zmesi za merjenje izražanja OPG, TGF- β 1, TNF- α , IL-6, IL-10, PTGER4 in GAPDH.	18
Preglednica IV: Priprava reakcijske zmesi za merjenje izražanja IL-1 β in IFN- γ	19
Preglednica V: Priprava reakcijske zmesi za merjenje izražanja iNOS, NOS3, COX-2 in B2M.	19
Preglednica VI: Izbrani oligonukleotidni začetniki za qPCR.	20
Preglednica VII: Shema priprave mikrotitrne ploščice za analizo izražanja enega gena v vzorcih subhondralne kostnine.	21
Preglednica VIII: Opis preiskovane skupine.	24
Preglednica IX: Preglednica priprave standardov za analizo enega gena (npr. iNOS) pri treh različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov.	32
Preglednica X: Shema priprave mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinicami pri treh različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov za določitev optimalnega izražanja enega gena (predstavljen je le del mikrotitrne ploščice).	33
Preglednica XI: Shema pipetiranja za gene IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , NOS3, COX-2 in PTGER4 (predstavljen je le del mikrotitrne ploščice).	34
Preglednica XII: Rezultati optimizacije koncentracije oligonukleotidnih začetnikov.	35
Preglednica XIII: Primerjava vrednosti za standard 2 pri treh koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov za posamezen gen.	36
Preglednica XIV: Rezultati analize izražanja genov.	38
Preglednica XV: Rezultati opisne statistike v programu SPSS.	40
Preglednica XVI: Statistično značilne korelacije med analiziranimi geni.	41
Preglednica XVII: Povezave med vnetnimi citokini in triado RANK/RANKL/OPG.	43
Preglednica XVIII: Statistično značilne povezave med geni za IL-1 β , TNF- α in IL-6.	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizem delovanja triade RANK/RANKL/OPG na kostne celice..	3
Slika 2: Spremembe v subhondralni kostnini in sklepnem hrustancu, ki nastanejo pri razvoju OA..	12
Slika 3: Shema nastavitve programa na aparaturi LightCycler® 480II.	22
Slika 4: Vgrajevanje barvila SYBR Green v nastajajočo dsDNA med reakcijo qPCR.	26
Slika 5: Krivulja pomnoževanja pri uspešno izvedeni reakciji qPCR. Krivuljo smo dobili pri analizi izražanja gena OPG v vzorcih subhondralne kostnine.	27
Slika 6: Krivulja pomnoževanja prikazuje potek verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)..	28
Slika 7: Standardna krivulja pri analizi izražanja gena OPG v vzorcih subhondralne kostnine.....	29
Slika 8: Analiza talilne krivulje, ki smo jo dobili pri določevanju izražanja gena za OPG v vzorcih subhondralne kostnine.	30
Slika 9: Krivulja pomnoževanja pri analizi izražanje iNOS.....	37
Slika 10: Tvorba dimerov oligonukleotidnih začetnikov pri analizi B2M.....	39
Slika 11: Normalizirane vrednosti izražanja genov v subhondralni kostnini.....	42

POVZETEK

Že dolgo je znano, da pride pri vnetnih boleznih do izgube kostne mase. Izguba kostne mase je posledica porušenega ravnotežja med procesoma kostne razgradnje in kostne tvorbe. Raziskave so dokazale, da lahko vnetni citokini (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-4, itd.), ki jih tvorijo aktivirani limfociti T med vnetnim odzivom, posredno ali neposredno uravnavajo delovanje sistema RANK/RANKL/OPG, vendar večina raziskav temelji na *in vitro* študijah na celičnih kulturah in na živalskih modelih kostnih bolezni. Zato je bil namen magistrske naloge ugotoviti značilnosti omenjenih povezav v humanem subhondralnem kostnem tkivu. Dobljene povezave bi omogočile odkritje novih označevalcev sprememb v strukturi subhondralnega kostnega tkiva, ki so ena izmed zgodnjih značilnosti razvoja osteoartroze.

V raziskavi smo uporabili 21 vzorcev subhondralnega kostnega tkiva preiskovancev brez bolezni kosti in sklepov. V vzorcih smo z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času izmerili izražanje šestih genov za vnetne citokine (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ in IL-4) in genov sistema dejavnikov RANK/RANKL/OPG. V raziskavo smo vključili še druge dejavnike, kot so TGF- β 1, COX-2, PTGER4, iNOS in NOS3, ki so prisotni pri vnetnih procesih ter vplivajo na proces kostne remodelacije. Za določitev statistično značilnih povezav med izmerjenimi geni smo uporabili Spearmanov korelacijski koeficient.

Statistično značilni negativni povezavi smo dobili med IL-1 β in OPG ($\rho = -0,560$, $p = 0,016$) ter TNF- α in OPG ($\rho = -0,572$, $p = 0,013$) in statistično značilno pozitivno povezavo med RANK in IFN- γ ($\rho = 0,564$, $p = 0,015$). Statistično značilne pozitivne povezave pa smo dobili tudi med vnetnimi citokini in drugimi dejavniki vnetja (med NOS3 in TGF- β 1, med IL-6 in IL-10 in TNF- α , med IFN- γ in IL-10, TNF- α in IL-6, med IL-1 β in TNF- α , med IL-10 in TNF- α in IL-1 β).

Rezultati našega dela bi lahko nakazovali pomembno vlogo vnetnih citokinov pri nadzoru sistema RANK/RANKL/OPG v humanem subhondralnem kostnem tkivu. Poleg povezanosti z RANK/RANKL/OPG pa so vnetni citokini in drugi dejavniki vnetja povezani tudi med seboj, kar nakazuje na kompleksnost kostnega mikrookolja. Za natančnejše razumevanje povezav med vnetnimi citokini in triado RANK/RANKL/OPG ter njihov prispevek k razvoju osteoartroze pa bodo potrebne nadaljnje študije v smislu ovrednotenja teh povezav s kvaliteto subhondralne kostnine in hrustanca.

Ključne besede: osteoimunologija, RANK/RANKL/OPG, vnetni citokini, subhondralna kostnina, osteoartroza.

ABSTRACT

It has been long known that inflammatory diseases are linked to loss of bone mass. A loss of bone mass is a result of imbalance between bone resorption and bone formation. It has been shown that inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-4, etc., which are produced by activated T lymphocytes during inflammatory response, can directly or indirectly modulate the RANK/RANKL/OPG system. As most of the evidence is based on *in vitro* studies on isolated cell cultures and animal models of various bone diseases, the aim of this thesis is to determine these interactions in human subchondral bone tissue. The obtained interactions would enable discovery of new markers, that could predict changes in the structure of subchondral bone, which are an early characteristics of osteoarthritis.

We used subchondral bone samples of 21 persons without symptoms of bone or joint diseases. To specify gene expression of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ in IL-4) and molecular triad RANK/RANKL/OPG, we used quantitative real-time polymerase chain reaction. We also included some other factors such as TGF- β 1, COX-2, PTGER4, iNOS, and NOS3 into our study. These factors are part of inflammatory response and can regulate bone remodeling. For the correlation analysis we used Spearman's correlation coefficient.

We discovered two statistically significant negative correlations between IL-1 β and OPG ($\rho = -0,560$, $p = 0,016$), TNF- α and OPG ($\rho = -0,572$, $p = 0,013$) and one statistically significant positive correlations between RANK and IFN- γ ($\rho = 0,564$, $p = 0,015$). Moreover, statistically significant positive correlations were observed between inflammatory cytokines and other inflammation markers as well (between NOS3 and TGF- β 1, between IL-6 and IL-10 and TNF- α , between IFN- γ and IL-10, TNF- α and IL-6, between IL-1 β and TNF- α , between IL-10 and TNF- α and IL-1 β).

Our results indicate a possible important role of inflammatory cytokines in controlling RANK/RANKL/OPG triad in human subchondral bone tissue. In addition to their influence on RANK/RANKL/OPG, there is also interconnection within different inflammatory cytokines and inflammation markers indicating the complexity of the bone microenvironment. For better understanding of interactions between inflammatory cytokines and RANK/RANKL/OPG system and their contribution to pathogenesis of

osteoarthritis further studies are needed in terms of evaluating the influence of these correlations to the quality of the subchondral bone and cartilage tissue.

Key words: osteoimmunology, RANK/RANKL/OPG, inflammatory cytokines, subchondral bone, osteoarthritis.

SEZNAM OKRAJŠAV

AP-1	aktivacijski protein, <i>activator protein-1</i>
B2M	β -2-mikroglobulin, <i>β-2-microglobulin</i>
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina, <i>complementary DNA</i>
COX-	ciklooksigenaza-, <i>cyclooxygenase-</i>
Cp	točka prečkanja, <i>crossing point</i>
Cq	cikel kvantifikacije, <i>quantification cycle</i>
dH ₂ O	ultra čista voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	dvovijačna DNA, <i>double-stranded DNA</i>
FADD	s Fas povezana smrtna domena, <i>Fas-associated death domain protein</i>
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, <i>glyceraldehyde phosphate dehydrogenase</i>
gDNA	genomska DNA, <i>genomic DNA</i>
IFN- γ	interferon gama, <i>interferon gamma</i>
IL-	interlevkin-, <i>interleukin-</i>
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik, <i>macrophage-colony stimulating factor</i>
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina, <i>messenger ribonucleic acid</i>
NF- κ B	jedrni dejavnik kapa beta, <i>nuclear factor κB</i>
NFATc1	jedrni dejavnik aktiviranih celic T, <i>nuclear factor of activated T cells</i>
NOS	dušikov oksid sintaza, <i>nitric oxide synthase</i>
NSAID	nesteroidne protivnetne učinkovine, <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>

NTC	slepi vzorec, <i>no-template control</i>
OA	osteoartroza, <i>osteoarthritis</i>
OPG	osteoprotegerin, <i>osteoprotegerin</i>
OSCAR	z osteoklasti povezani receptor, <i>osteoclast-associated receptor</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo, <i>polymerase chain reaction</i>
PGE ₂	prostaglandin E ₂ , <i>prostaglandin E₂</i>
PIR-A	parni imunoglobulinom podobni receptor A, <i>paired Ig-like receptor A</i>
PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (EP4), <i>prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)</i>
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času, <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, <i>receptor activator of nuclear factor κB</i>
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B, <i>receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>
RNA	ribonukleinska kislina, <i>ribonucleic acid</i>
SB	subhondralna kostnina, <i>subchondral bone</i>
SEM	standardna napaka povprečja, <i>standard error of the mean</i>
ssDNA	enovijačna DNA, <i>single-stranded DNA</i>
st	standard
SD	standardni odklon, <i>standard deviation</i>
TGF- β 1	transformirajoči rastni dejavnik beta1, <i>transforming growth factor beta1</i>
Tm	temperatura talilne krivulje, <i>melting temperature</i>
TNF	dejavnik tumorske nekroze, <i>tumor necrosis factor</i>

TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa, <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRADD	z receptorjem dejavnika tumorske nekroze 1 povezana smrtna domena, <i>TNFR1-associated death domain protein</i>
TRAF	z družino receptorjev za dejavnike tumorske nekroze povezani dejavnik, <i>TNF receptor associated factor</i>
TRAP	na tartrat odporna kislina fosfataza, <i>tartrate resistant acid phosphatase</i>
UDG	uracil DNA-glikozilaza, <i>uracil DNA glycosylase</i>

1 UVOD

1.1 SUBHONDURALNA KOSTNINA KOT SESTAVNI DEL SKLEPA

Sklepe sestavljajo sklepni hrustanec, subhondralna kostnina, sklepna ovojnica, sinovialna tekočina in ligamenti ter meniskus v kolenskem sklepu (1).

Subhondralna kostnina se nahaja na končnem, razširjenem delu dolgih kosti, ki ga imenujemo epifiza. Delimo jo na kortikalno in trabekularno subhondralno kostnino. Subhondralno kostnino prekriva sklepni hrustanec. Gre za vrsto hialinega hrustančnega tkiva, ki ga sestavljajo hrustančne celice (hondrociti) in zunajcelično ogrodje. Hondrociti, ki sintetizirajo sestavine zunajceličnega ogrodja, so edine celice, prisotne v sklepnem hrustancu. Zunajcelično ogrodje tvorijo predvsem kolagenska vlakna tipa II in agrekan, ki je najpomembnejši proteoglikan v hrustančnem tkivu. Proteoglikani, ki vežejo velike količine vode in kolagenska vlakna dajejo sklepnemu hrustancu posebne mehanske lastnosti. V sklepnem hrustancu ni prisotnih krvnih in limfnih žil. Prav tako ni oživčen. Sklepni hrustanec se deli v štiri sloje: vrhnji, vmesni, globoki in kalcificirani sloj, ki se med seboj razlikujejo po sestavi medceličnine in orientiranosti kolagenskih vlaken ter fenotipu hondrocitov. Najgloblja plast sklepnega hrustanca je kalcificirana plast, ki je že del kortikalne subhondralne kostnine (1, 2). Pod kortikalno plastjo leži trabekularna subhondralna kostnina, ki je v primerjavi s kortikalno bolj porozna in metabolno aktivna (3).

Sklepni hrustanec v sodelovanju s sinovialno tekočino zmanjša trenje, ki nastane med gibanjem sosednjih kosti in tako zaščiti subhondralno kostnino pred mehanskimi obremenitvami (2).

1.2 SISTEM DEJAVNIKOV RANK/RANKL/OPG

1.2.1 Sistem dejavnikov RANK/RANKL/OPG in njihov vpliv na osteoklastogenezo

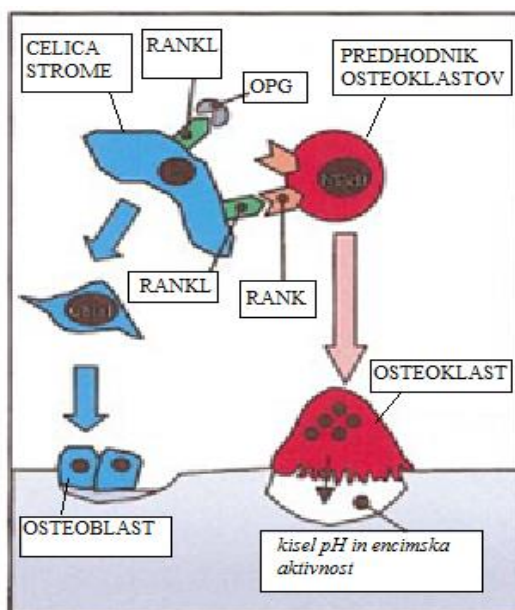
Raziskave kažejo, da ima sistem RANK/RANKL/OPG osrednjo vlogo pri uravnavanju procesa kostne resorpcije (4). Ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANKL) je poleg makrofagne kolonije stimulirajočega dejavnika (M-CSF) nujen in zadosten dejavnik za razvoj osteoklastov (5). Osteoklasti se razvijejo iz hematopoetskih

celic monocitno-makrofagne vrste v procesu, imenovanem osteoklastogeneza. Glavna naloga osteoklastov je razgradnja (resorpcija) kostnine (4).

M-CSF nastaja v osteoblastih in celicah strome kostnega mozga. Z vezavo na receptor c-fms, ki se izraža na površini celic monocitno-makrofagne vrste, aktivira proliferacijo predhodnikov osteoklastov, diferenciacijo osteoklastov in poveča preživetje zrelih osteoklastov (4).

RANKL je protein, ki spada v naddružino ligandov za dejavnik tumorske nekroze z oznako 11 (TNFSF11, angl. tumor necrosis factor (ligand) superfamily 11) (6). Nastaja v celicah strome kostnega mozga in osteoblastih. Dražljaj za njegovo izločanje posredujejo hormoni (kalcitriol, parathormon, glukokortikoidi), rastni dejavniki, vnetni citokini (IL-1, TNF- α , IL-6) in prostaglandin E₂ (7, 8). RANKL nastaja tudi v drugih celicah organizma, med katerimi so za proces nastanka osteoklastov pomembni še aktivirani limfociti T in B, hondrociti ter vaskularne endotelijske celice (6). Novejše študije nakazujejo, da so pri normalni kostni remodelaciji pravzaprav osteociti glavni vir RANKL (9). V človeškem telesu sta prisotni transmembransko vezana in topna oblika proteina. Topna oblika proteina lahko nastane neposredno v celicah v procesu alternativnega izrezovanja in se nato izloči v zunajcelični prostor ali posredno s proteolitično cepitvijo transmembranske oblike RANKL (6). Obe obliki proteina RANKL delujeta kot agonista na receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANK), ki se izraža na predhodnikih osteoklastov, celicah T in B, dendritskih celicah, fibroblastih ter na zrelih osteoklastih (5, 8). Na površini osteoklastov RANK specifično veže RANKL (10). Interakcija med RANKL in RANK aktivira različne znotrajcelične signalnih poti, ki inducirajo diferenciacijo predhodnikov osteoklastov do zrelih osteoklastov, stimulirajo resorpcijsko sposobnost zrelih osteoklastov in upočasnijo proces apoptoze zrelih osteoklastov (4).

V organizmu se RANKL poleg vezave na svoj funkcionalni receptor RANK, veže tudi na osteoprotegerin (OPG). RANK in OPG spadata v naddružino receptorjev za dejavnik tumorske nekroze (TNFRSF) (10). OPG je topen protein, ki ga izločajo osteoblasti, celice strome kostnega mozga, limfociti B in dendritske celice (4, 10). OPG prepreči interakcijo med RANKL in RANK in tako inhibira osteoklastogenezo. OPG lahko deluje tudi direktno na osteoklaste. Na površini osteoklastov se veže na neidentificirane receptorje in inhibira njihovo aktivnost (5). Mehanizem delovanja dejavnikov RANK, RANKL in OPG prikazuje slika 1.



Slika 1: Mehanizem delovanja triade RANK/RANKL/OPG na kostne celice. Prirejeno po (11).

Razmerje med RANKL in OPG tako uravnava kostno remodelacijo. Sprememba razmerja v korist OPG povzroči zmanjšanje kostne resorpcije, ki lahko vodi do nastanka osteopetroze. Premik razmerja v smeri povečanja RANKL vodi do povečane kostne resorpcije in možnosti razvoja osteoporoze (12). Spremembe v razmerju med RANKL in OPG so se izkazale za pomemben vzrok izgube kostne mase pri pomanjkanju estrogena, vnetjih in rakavih boleznih (4).

1.2.2 Prenos signala v osteoklastih

Za ustrezen prenos signala v osteoklastih, ki ga posreduje interakcija med RANKL in RANK, je odgovoren z družino receptorjev za dejavnike tumorske nekroze povezani dejavnik (TRAF). Poznamo šest oblik TRAF. Z intracelularno domeno RANK reagirajo TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 in TRAF6 (10). Najpomembnejša oblika je TRAF6, ki lahko neodvisno od drugih dejavnikov inducira osteoklastogenezo. TRAF6 preko, z mitogenom aktivirane protein-kinazne kaskade (MAPK, angl. mitogen-activated protein kinase), aktivira c-jun N-terminalno kinazo (JNK), ki vodi do nastanka c-Jun. TRAF6 poveča tudi izražanje c-Fos, ki skupaj s c-Jun tvori aktivacijski protein 1 (AP-1). AP-1 ima pomembno vlogo pri deljenju in diferenciaciji celic ter uravnavanju apoptoze. TRAF6 s svojim delovanjem tudi omogoči vstop jedrnega dejavnika κB (NF- κB) v jedro celice, kjer se NF- κB veže na specifična promotorska mesta na DNA in sproži prepisovanje genov (7,

13). Omenjene signalne poti omogočajo ustrezen razvoj osteoklastov. TRAF6 je vključen tudi v prenos signala, ki ga posredujejo IL-1, lipopolisaharidi in TNF- α (7, 14).

Poleg TRAF so za prenos signala v osteoklastih pomembne še kostimulatorne molekule. Kostimulatorne molekule so del zapletene znotrajcelične signalne poti, ki vodi v aktivacijo jedrnega dejavnika aktiviranih celic T (NFATc1). NFATc1 je glavni transkripcijski dejavnik, ki v jedru celice skupaj za drugimi transkripcijskimi dejavniki nadzoruje izražanje specifičnih genov za osteoklaste, kot so OSCAR, TRAP, kalcitoninski receptor in katepsin K. Kostimulatorne molekule, ki vsebujejo s tirozinom bogata aktivacijska področja imunoreceptorjev (ITAM), so DAP12 in Fc receptor γ (FcR γ). V predhodnikih osteoklastov sta z DAP12 povezana receptorja signalni regulatorni protein β 1 (SIRP β 1) in sprožilni receptor, izražen na mieloidnih celicah 2 (TREM-2). Z FcR γ pa sta povezana z osteoklasti povezani receptor (OSCAR) in parni imunoglobulinom podobni receptor A (PIR-A) (10, 15).

1.3 POVEZANOST KOSTNEGA IN IMUNKEGA SISTEMA

1.3.1 Osteoimunologija

Kostni sistem ima pomembno vlogo pri razvoju imunskih celic. Osteoblasti nadzorujejo mikrokolje kostnega mozga, kjer se nahajajo hematopoetske celice, iz katerih nastanejo vse krvotvorne in imunske celice. Makrofagi in dendrične celice si tako v hematopoetskih celicah monocitno-makrofagne vrste delijo istega predhodnika z osteoklasti (4). Obratno velja, da ima imunski sistem pomemben vpliv na kostni sistem. Že dolgo je znano, da v patoloških pogojih dolgotrajna in pretirana aktivacija imunskega sistema vodi v poškodbe kostnega tkiva (15). Šele odkritje citokina RANKL, ki je skupen obema sistemoma, in triade RANK/RANKL/OPG je omogočilo natančnejše razumevanje vpliva imunskih celic na kostno resorpcijo (8, 9).

V imunskem sistemu RANKL, ki ga izražajo aktivirane celice T, regulira delovanje in preživetje dendričnih celic (9). Odsotnost RANKL vodi v napake pri razvoju sekundarnih limfatičnih organov in celic limfatičnega sistema (8).

Vsaka aktivacija imunskega sistema ne vodi vedno do izgube kostne mase, kar pomeni, da obstaja mehanizem, ki preprečuje delovanje dejavnika RANKL. Razlago tega mehanizma je ponudila študija Takayanagia in sodelavcev. Odkrili so, da aktivirani limfociti T izločajo interferon γ (IFN- γ), ki zavira proces osteoklastogeneze (14). Povečana tvorba IFN- γ pri akutnem imunskem odzivu nasprotuje povečanemu izražanju RANKL in tako zmanjša

nastanek osteoklastov. Pri kroničnem vnetju pa naj bi bilo razmerje med RANKL in IFN- γ pomaknjeno v smeri večjega izražanja RANKL (16). Študije obeh sistemov so tudi pokazale, da številni citokini, transkripcijski faktorji, membranski receptorji in druge signalne molekule, ki nastajajo in delujejo v imunskem sistemu, nadzorujejo tudi delovanje osteoklastov in osteoblastov (8). S temi odkritji so se odprla vrata za razvoj nove vede osteoimunologije, ki proučuje interakcije med kostnimi in imunskimi celicami (9). Osteoimunologija predstavlja velik potencial za razvoj novih terapij za zdravljenje bolezni, kot so revmatoidni artritis, parodontitis, Pagetova bolezen, osteoporoza, osteoartritis, multipli mielom in nekatere oblike malignih kostnih novotvorb, ki vodijo do večje izgube kostne mase (15).

1.3.2 Imunski odziv in njegov vpliv na osteoklastogenezo

Naloga imunskega odziva je obramba lastnega organizma pred patogeni in tujimi makromolekulami. Limfociti T in limfociti B so glavne celice, ki omogočajo odziv imunskega sistema (8, 17). V organizmu obstaja več podvrst limfocitov T. Najštevilčnejši so CD4⁺ limfociti T (celice pomagalke) in CD8⁺ limfociti T (celice ubijalke) (4, 13). Za aktivacijo limfocitov T so nujno potrebne antigen predstavitvene celice, ki na svoji površini predstavijo antigene limfocitom T. Med antigen predstavitvenimi celicami imajo največjo zmožnost aktivacije naivnih limfocitov T dendrične celice, ki se lahko preoblikujejo v osteoklaste in tako neposredno vplivajo na proces kostne resorpcije (4, 10, 18).

Prisotnost antigenov v organizmu spodbudi proliferacijo in diferenciacijo CD4⁺ limfocitov T. Pri tem nastanejo efektorski ali aktivirani limfociti, ki jih glede na profil izločanja citokinov razdelimo v dve poglavitni skupini, celice T pomagalke 1 (Th1) in celice T pomagalke 2 (Th2). Th1 posredujejo celično imunost. Poleg IFN- γ in IL-2, ki definirata odziv Th1, proizvajajo še IL-12, TNF- α in TNF- β . V humoralno posredovano imunost so vključene Th2, ki tvorijo predvsem IL-4, IL-5 in IL-10 (4, 8). Opisan imunski odziv ni pojasnil vloge aktiviranih celic T pri izgubi kostne mase, saj glavni citokini obeh odzivov, kot so IFN- γ , IL-4, IL-10 in IL-2, zavirajo proces osteoklastogeneze. Razlago vpliva aktiviranih celic T na kostno resorpcijo so ponudile novejšje študije, ki so odkrile prisotnost novega podtipa CD4⁺ limfocitov T, Th17 (15). V človeškem organizmu Th17 nastanejo pod vplivom TGF- β in prisotnega vnetja. Th17 izdelujejo IL-17, IL-22, IL-26, RANKL in TNF- α . IL-17 inducira izražanje RANK na predhodnikih osteoklastov in RANKL na

celicah strome ter osteoblastih. Hkrati IL-17 spodbuja lokalno prisotno vnetje z aktivacijo imunskih celic. V vnetišču nastaneta TNF- α in IL-1, ki stimulirata izražanje RANKL (4). Študije revmatoidnega artritisa, ki predstavljajo najpomembnejša odkritja vpliva citokinov na kostno razgradnjo, so dokazale povečano izražanje IL-17 v vnetih sklepkih (10, 15). Pri revmatoidnem artritisu Th17 povečajo izražanje RANKL v fibroblastih, ki so glavni vir RANKL v sinovialni tekočini (9).

Pomembna podvrsta CD4⁺ limfocitov T so tudi regulatorni limfociti T (Treg), ki sodelujejo pri razvoju in ohranjanju imunske tolerance (4, 15). Treg, ki izločajo IL-4, IL-10 in TGF- β , delujejo protivnetno in antiosteoklastogeno (19).

Različni vnetni citokini in rastni dejavniki imajo tako sposobnost, da stimulirajo ali zavirajo diferenciacijo in delovanje osteoklastov. Od nabora citokinov, ki se tvorijo v vnetih tkivih, je odvisen njihov končni učinek na kostno resorpcijo (20).

1.4 VPLIV VNETNIH CITOKINOV IN DRUGIH MEDIATORJEV VNETJA NA SISTEM DEJAVNIKOV RANK/RANKL/OPG IN PROCES KOSTNE REMODELACIJE

1.4.1 Vpliv dejavnika tumorske nekroze - α (TNF- α) na sistem RANK/RANKL/OPG

Poznamo dve obliki dejavnika tumorske nekroze (TNF), TNF- α in TNF- β . Obe obliki posredujeta podobne biološke učinke in stimulirata kostno resorpcijo (10). TNF- α večinoma tvorijo aktivirani makrofagi. Delovanje TNF- α vpliva na razvoj osteoklastov. V celicah se lahko veže na dva različna receptorja, TNFR-1 in TNFR-2. Receptorje za TNF izražajo številne celice, tudi hematopoetske celice kostnega mozga. TNF- α posreduje večino svojih učinkov preko receptorja TNFR-1. Na TNFR-1 se najprej veže TRADD (z receptorjem dejavnika tumorske nekroze 1 povezana smrtna domena), ki omogoča vezavo drugih signalnih proteinov. Interakcija med TRADD in FADD (s Fas povezana smrtna domena) aktivira sistem kaspaz, ki pripelje do apoptoze celic. Na TRADD se veže tudi TRAF-2, ki aktivira NF- κ B in AP-1. TNFR-2 neposredno veže TRAF-2, ki ima večjo afiniteto do TRADD kot do TNFR-2 (5, 13).

V osteoklastih TNF- α dopolnjuje učinke RANKL zaradi sinergističnega delovanja na signalnih poteh NF- κ B in AP-1. Učinki TNF- α vključujejo povečan nastanek RANKL in M-CSF v celicah strome kostnega mozga in povečano odzivnost predhodnikov

osteoklastov na RANKL (4). Na osteoklastih TNF stimulira izražanje c-fms in kostimulatornega receptorja PIR-A (10). TNF- α inhibira nastanek osteoblastov s tvorbo proteina Dickkopf 1 (DKK1), ki zavira signalno pot Wnt (8).

1.4.2 Vpliv interleukina 1 β (IL-1 β) na sistem RANK/RANKL/OPG

Podobno kot TNF, tudi IL-1 obstaja v dveh oblikah, IL-1 α in IL-1 β . Obe obliki imata enako delovanje. IL-1, ki ga izločajo predvsem monociti, je močan stimulator kostne resorpcije. Na osteoklaste deluje direktno in indirektno preko povečanega izražanja RANKL (10, 13). Receptorja za IL-1 sta dva. Tip I receptorja (IL-1RI), ki posreduje vse znane biološke učinke IL-1, za prenos signala potrebuje dodaten protein, IL-1RAcP (IL-1 receptor accessory protein). Delovanje IL-1 na tip I receptorja vodi v aktivacijo specifične TRAF oblike in NF- κ B. Vezava IL-1 na receptor tipa II (IL-1RII), ki ne prevaja signala, onemogoči aktivacijo IL-1RI (5, 10, 13).

Pri pomenopavzni osteoporozi zaviranje delovanja IL-1 zmanjša kostno resorpcijo (4).

1.4.3 Vpliv interleukina 6 (IL-6) na sistem RANK/RANKL/OPG

IL-6 je, tako kot TNF- α in IL-1 β , proznetni citokin, ki stimulira kostno resorpcijo (5). Glavni vir IL-6 in njegovega receptorja v kostnem tkivu so osteoblasti (10). IL-6 se specifično veže na membransko vezan receptor za IL-6 (IL-6R) ali na njegovo topno obliko (sIL-6R) (21). Kompleks IL-6 in sIL-6R aktivira protein gp130, ki je del receptorja za IL-6 in drugih citokinskih receptorjev, ter omogoča ustrezen prenos signala (10). IL-6 ima izrazito avtokrino delovanje. V osteoblastih poveča izražanje RANKL in drugih dejavnikov, ki aktivirajo diferenciacijo osteoklastov (5). Delovanje IL-6 je tesno povezano z učinki TNF- α in IL-1, ki stimulirata nastanek IL-6 v celicah strome kostnega mozga in omogočata nastanek sIL-6R s cepitvijo membransko vezane oblike receptorja (10).

1.4.4 Vpliv interferona- γ (IFN- γ) na sistem RANK/RANKL/OPG

IFN- γ spada v razred II interferonov in je edini predstavnik v omenjenem razredu (13). Tvorijo ga aktivirane celice T. *In vitro* in *in vivo* študije na miših so dokazale, da je IFN- γ močan inhibitor osteoklastogeneze. V osteoklastih z razgradnjo TRAF6 zavira prenos signala, ki ga posreduje interakcija med RANK in RANKL. IFN- γ aktivira sistem ubikvitin-proteasom. Proteasom je velik proteinazni kompleks, sestavljen iz več podenot, ki razgrajuje znotrajcelične proteine. Proteini z vezavo več molekul ubikvitina pridobijo ustrezen signal, potreben za razgradnjo v proteasomu. Takayanagi in sodelavci so pokazali,

da začetek ubikvitinacije TRAF6 sproži RANKL in jo nato poveča IFN- γ (16). Kljub dokazanemu antiosteoklastogenem delovanju so v študijah na ljudeh odkrili, da lahko IFN- γ pod določenimi pogoji stimulira kostno resorpcijo. IFN- γ aktivira proces predstavljanja antigenov limfocitom T. Pri tem nastanejo proosteoklastogeni dejavniki, ki izravnavajo antiosteoklastogeni učinek IFN- γ (4). Novejše študije povezujejo omenjeni učinek aktivacije limfocitov T z izgubo kostne mase pri pomanjkanju estrogena (22). IFN- γ tudi ne prepreči kostne razgradnje pri revmatoidnem artritisu (4).

1.4.5 Vpliv interleukina 10 (IL-10) na sistem RANK/RANKL/OPG

IL-10 je močan protivnetni citokin, ki preprečuje izdelavo vnetnih citokinov in proliferacijo imunskih celic. Izločajo ga aktivirane celice T in makrofagi. V kostnem sistemu zavira začetne stopnje razvoja osteoklastov na ta način, da zadrži diferenciacijo predhodnikov osteoklastov do enojedrnih osteoklastov. IL-10 neposredno zavira izražanje NAFTc1 in njegovo translokacijo v jedro celice ter izražanje c-Fos in c-Jun, sproženo s signaliziranjem RANK/RANKL. Na proces osteoklastogeneze lahko deluje tudi posredno. Zmanjša izražanje dejavnikov RANKL in M-CSF ter poveča izražanje OPG. IL-10 lahko zavira tudi proces nastanka osteoblastov (10, 23).

1.4.6 Vpliv transformirajočega ravnega dejavnika β 1 (TGF- β 1) na sistem RANK/RANKL/OPG

Poleg TGF- β 1 poznamo še dve obliki TGF- β 2 in TGF- β 3. Vse tri izooblike se vežejo na isti receptorski kompleks. Številne celice, med katerimi so tudi celice kostnega mozga, osteoblasti in celice strome, lahko tvorijo TGF- β . Izloča se v latentni obliki. Za posredovanje bioloških učinkov TGF- β je tako potrebna predhodna aktivacija. V kostnem matriksu so shranjene velike zaloge TGF- β , ki se sproščajo in aktivirajo pri kostni resorpciji (4). Med vsemi izooblikami v kostnem tkivu prevladuje TGF- β 1. *In vitro* raziskave so pokazale, da so učinki delovanja TGF- β 1 na osteoklaste in osteoblaste odvisni od pogojev, v katerih so jih raziskali. Kljub nasprotujočim si podatkom iz raziskav lahko v literaturi najdemo splošno sprejet mehanizem delovanja pri tvorbi kostnine, ki ga podpira večina raziskav. TGF- β 1, ki se sprošča pri kostni resorpciji, v začetni stopnji stimulira kostno tvorbo. Na mesto resorpcije kosti privablja predhodnike osteoblastov, stimulira njihovo proliferacijo in diferenciacijo do osteoblastov ter tvorbo kostnega matriksa. V pozni fazi diferenciacije in tvorbe zrelih osteoblastov pa TGF- β 1 deluje inhibitorno. Hkrati

zavira proces mineralizacije osteoida (24). Z uravnavanjem izražanja dejavnika RANKL lahko tudi na kostno resorpcijo deluje stimulatorno in inhibitorno (7, 10). V *in vivo* pogojih je učinek delovanja TGF- β 1 močno odvisen od kostnega mikrookolja in drugih rastnih dejavnikov (24).

1.4.7 Vpliv prostaglandina E₂ (PGE₂) na sistem RANK/RANKL/OPG

Prostaglandini so lipidni mediatorji vnetja in homeostaze. Tvorba lipidnih mediatorjev je povečana pri osteoporozi, revmatoidnem artritisu, osteoartritisu in parodontitisu. Biosinteza prostaglandinov poteče iz arahidonske kisline, ki je shranjena v membranskih fosfolipidih. Odcepitev arahidonske kisline omogoča fosfolipaza A₂ (PLA₂). Dve znani obliki ciklooksigenaze (COX-1 ali COX-2) katalizirata pretvorbo arahidonske kisline do predhodnika PGH₂. COX-1 je konstitutiven encim, ki zagotavlja homeostazo tkiv. COX-2 je inducibilen encim, ki med vnetjem tvori velike količine prostanoidov. PGH₂ se pod vplivom prostaglandin-E-sintetaze (PGES) metabolizira do prostaglandina E₂ (PGE₂) (19, 21).

V kostnem tkivu PGE₂ tvorijo osteoblasti. Različni dejavniki, ki vplivajo na kostno remodelacijo (npr. vnetni citokini), regulirajo nastanek PGE₂ predvsem z uravnavanjem izražanja COX-2. PGE₂ deluje preko s proteinom G sklopljenih receptorjev. Obstajajo štiri receptorji za PGE₂ (EP1–EP4) (21, 25). V različnih živalskih vrstah so na osteoblastih prisotni vsi štiri receptorji, medtem ko so na človeških osteoblastih opazili le prisotnost EP3 in EP4 (26). Mehanizem delovanja PGE₂ na kostno tkivo je kompleksen. *In vitro* študije so pokazale, da lahko PGE₂ z vezavo na osteoblaste posredno poveča kostno resorpcijo. V osteoblastih naj bi stimuliral tvorbo RANKL in zaviral izražanje OPG. S stimulacijo proliferacije in diferenciacije osteoblastov lahko PGE₂ vpliva tudi na tvorbo kostnega tkiva. Za oba procesa je pomembna prisotnost receptorjev EP2 in EP4 na osteoblastih. Hkrati obstajajo tudi dokazi o direktnem delovanju PGE₂ na osteoklaste (21, 25).

Različni učinki PGE₂ na kostno tkivo, ki so opisani v študijah, so verjetno posledica možnosti delovanja PGE₂ tako na osteoblaste kot tudi na osteoklaste in prisotnosti štirih receptorjev za PGE₂, ki posredujejo učinke po različnih signalnih poteh. V *in vivo* pogojih je delovanje PGE₂ odvisno od fizioloških in patoloških pogojev v organizmu (21).

1.4.8 Vpliv dušikovega oksida (NO) na sistem RANK/RANKL/OPG

Dušikov oksid (NO) je prosti radikal, ki nastane v organizmu iz L-arginina s pomočjo encima NO-sintaza (NOS) in v neencimskih reakcijah. Poznamo tri izoformne oblike encima NOS, in sicer nevronske NOS (nNOS ali NOS1), endotelijske NOS (eNOS ali NOS3) in inducibilne NOS (iNOS ali NOS2). Izoformi eNOS in iNOS sta dokazano prisotni v kostnem tkivu. Za izražanje nNOS v kostnih celicah obstaja bolj malo dokazov (11).

Pri fizioloških pogojih v kostnem tkivu prevladuje eNOS, ki se konstantno izraža v celicah strome kostnega mozga in v vseh treh vrstah kostnih celic (11, 27). Izražanje je največje pri novorojenčkih in se s starostjo zmanjšuje. Delovanje eNOS naj bi zagotavljalo vzdrževanje ustrezne kostne mase (27). eNOS nadzoruje delovanje osteoblastov, posreduje anabolne in antiresorptivne učinke estrogena na kostno tkivo ter pri mehanskih obremenitvah v sodelovanju s prostaglandini zavira kostno resorpcijo in stimulira kostno tvorbo (11).

V odraslem zdravem kostnem tkivu se iNOS ne izraža. Prisotna je le pri razvoju ploda, kar nakazuje, da omenjeni encim verjetno sodeluje pri razvoju skeleta. Po stimulaciji z vnetnimi citokini in/ali bakterijskimi endotoksini pride do izražanja iNOS tudi v odraslem kostnem tkivu. Nastaja v celicah kostnega mozga in osteoblastih. Nekatere študije so zaznale šibko izražanje iNOS v osteoklastih (11).

Učinek NO na proces kostne resorpcije je odvisen od stopnje indukcije in aktivacije iNOS (27). IL-1 in TNF sprožita izražanje iNOS v kostnih celicah in nastanek NO, ki poveča s citokini in vnetjem spodbujeno kostno resorpcijo. Aktivacija vnetnih citokinov in nastanek NO sta povezana s patogenezo osteoporoze in vnetnih bolezni, kot je revmatoidni artritis. IFN- γ močno poveča izražanje iNOS in v kombinaciji z IL-1 in/ali TNF- α vodi v nastanek še večje koncentracije NO, ki zavira proces kostne remodelacije. Povečane koncentracije NO, ki so posledica delovanja vnetnih citokinov, zavirajo tudi rast in diferenciacijo osteoblastov (11).

V študiji, ki so jo objavili leta 2006, so Zheng in sodelavci odkrili, da lahko RANKL med razvojem osteoklastov z dejavniki NF- κ B in IFN- β inducira izražanje iNOS. NO, ki nastane v tem procesu, deluje na principu negativne povratne zanke in zavira osteoklastogenezo, ki jo sproži delovanje dejavnika RANKL (28).

1.5 OSTEOARTROZA

1.5.1 Opredelitev bolezni in etiologija

Osteoartroza (OA) oz. osteoartritis je degenerativna bolezen sinovialnih sklepov, ki prizadene vse sklepne strukture in ob sklepne kite in mišice. Vzroke za nastanek bolezni lahko razdelimo na genetske in negenetske. Med genetske uvrščamo dednost, med negenetske pa starost, spol, prekomerno telesno maso, poškodbe in stalne mehanske obremenitve sklepov ter številne druge dejavnike. Spremembe, ki nastanejo pri OA, onemogočajo normalno delovanje sklepa. Takšni sklepi so togi, manj gibljivi in boleči. Prisotno je tudi vnetje. Bolezen najpogosteje prizadene sklepe kolen, rok in kolkov ter hrbtenico (1, 29).

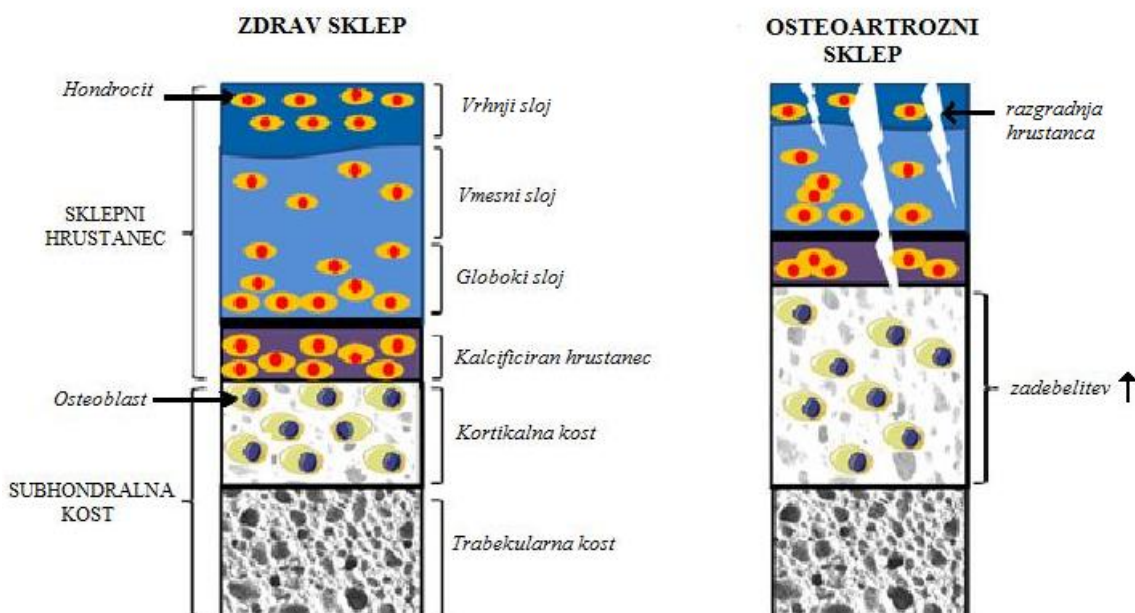
OA zmanjšuje kakovost življenja in zaradi naraščajoče prevalence ter incidence predstavlja velik javnozdravstveni problem (1).

1.5.2 Patogeneza osteoartroze

Spremembe v sklepnem hrustancu in subhondralni kostnini so pri OA posledica iztirjenih katabolnih in anabolnih procesov v omenjenih tkivih. Mehanske obremenitve in različni biološki ter biokemični dejavniki lahko porušijo homeostazo sklepnega hrustanca. Na spremembe se odzovejo hondrociti s povečano tvorbo kolagena tipa II in drugih anabolnih dejavnikov, ki poskušajo popraviti poškodovano zunajcelično ogrodje. V patoloških pogojih hondrociti v večjem obsegu sintetizirajo katabolne dejavnike in različne proteinaze (metaloproteinaze matriksa (MMP) in agrekanaze), ki razgrajujejo komponente hrustančnega ogrodja in onemogočijo njegovo uspešno obnovo. Poveča se sinteza kolagena tipa I, ki nadomesti razgrajen kolagen tipa II. Spremembe v sestavi hrustančnega ogrodja onemogočajo normalno delovanje hondrocitov in vodijo v apoptozo hondrocitov. Posledično pride do stanjšanja hrustanca in na površini se pojavijo razpoke. Delci poškodovanega hrustanca preidejo v sinovialno tekočino in povzročijo vnetje sinovialne membrane (29, 30). Sinovitis in aktivirani makrofagi v sklepu, ki sodelujejo pri neprekinjeni tvorbi provnetnih citokinov, dokazano prispevajo k patogenezi OA. Najpomembnejša citokina, prisotna pri razvoju OA, sta IL-1 in TNF- α (31). IL-1, ki ga tvorijo hondrociti ali sinoviociti, vzdržuje katabolne procese v sklepnem hrustancu s tvorbo razgradnih encimov in drugih katabolnih citokinov (npr. IL-6). Hkrati vzdržuje vnetni proces, ki nastane pod vplivom delovanja TNF- α (29).

V subhondralni kosti pride pri OA najprej do povečanja kostne resorpcije in izgube kostne mase. V kasnejši fazi razvoja bolezni se proces kostne remodelacije obrne v smeri povečane tvorbe kostnine. Spremembe povzročijo sklerozo subhondralne kostnine, spremenjeno mineralizacijo kostnine in tvorbo subhondralnih cist ter osteofitov ob zunanjih robovih sklepa. Subhondralna sklerozo zajame kortikalni del subhondralne kostnine in kalcificirano plast sklepnega hrustanca. Zadebelitev poteka v smeri nemineraliziranega hrustanca, ki se ne more ustrezno obnoviti, kar povzroči dodatno stanjšanje in fibrilacijo sklepnega hrustanca. Povečana kostna remodelacija naj bi bila povezana s prilagoditvijo na spremembe v sklepnem hrustancu, kar vodi v začaran krog napredovanja bolezni (1, 3).

Proces kostne remodelacije spremlja povečana vaskularizacija, ki pripelje do razraščanja krvnih žil iz subhondralne kostnine v plasti sklepnega hrustanca (3). V hrustanec, ki normalno ni oživčen, sčasoma prodrejo tudi senzorični živci in povzročijo nastanek bolečine (30). Sinovialna tekočina, kamor se izločajo produkti obeh tkiv, in vzpostavljene nove žilne povezave omogočajo prehod celic ter njihovih produktov med sklepnim hrustancem in subhondralno kostnino (1). Spremembe v sklepu, ki nastanejo pri OA, prikazuje slika 2.



Slika 2: Spremembe v subhondralni kostnini in sklepnem hrustancu, ki nastanejo pri razvoju OA.

Prيرهeno po (1).

Niso še popolnoma pojasnili, kje najprej pride do sprememb pri OA, v sklepnem hrustancu ali subhondralni kostnini. Vemo pa, da do sprememb v sklepu pride, preden se pojavijo simptomi bolezni (1).

1.5.3 Zdravljenje

Zdravljenje OA je usmerjeno v zmanjševanje bolečine, izboljšanje gibljivosti sklepa in zaviranje napredovanja bolezni. Priporočljiva je kombinacija nefarmakološkega zdravljenja (npr. fizioterapija, fizikalna terapija, zmanjšanje povečane telesne mase, izbira ustrezne obutve) in farmakološkega zdravljenja. Za zmanjšanje bolečine uporabljamo analgetike (npr. paracetamol) ali nesteroidne protivnetne učinkovine (NSAID), ki hkrati zmanjšujejo vnetje. Za zdravljenje OA uporabljamo še zdravila, ki dolgoročno vplivajo na razvoj bolezni. To so glukozamin, hondroitin sulfat in diacerein. Kadar je taka oblika zdravljenja neuspešna in bolezen napreduje, je potrebno kirurško zdravljenje (npr. artroplastika) (29, 32).

2 NAMEN DELA

Pri vnetnih boleznih pride do povečane kostne razgradnje. Študije so pokazale, da vnetni citokini vplivajo na delovanje sistema dejavnikov RANK/RANKL/OPG, ki ima v kostnem tkivu osrednjo vlogo pri uravnavanju procesa kostne razgradnje (4, 20). Večina v uvodu omenjenih študij temelji na *in vitro* poskusih na izoliranih celicah in na živalskih sistemih pri različnih patoloških stanjih organizma. Kakšna je povezava med kostnim in imunskim sistemom v humanem kostnem tkivu in v nepatoloških pogojih, pa je veliko manj znano.

Namen magistrske naloge je ugotoviti, ali obstaja povezava med izražanjem genov za vnetne citokine (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ in IL-4) in genov sistema dejavnikov RANK/RANKL/OPG v humanem subhondralnem kostnem tkivu. V ta namen bomo uporabili vzorce subhondralne kostnine preiskovancev brez znanih degenerativnih bolezni kosti in sklepov. V raziskavo bomo poleg vnetnih citokinov vključili še druge dejavnike, kot so TGF- β 1, COX-2, PTGER4, iNOS in NOS3, ki nastajajo in sodelujejo v vnetnih procesih, vendar jih ne uvrščamo med vnetne citokine. Omenjeni dejavniki hkrati tudi vplivajo na proces kostne remodelacije.

S predhodno optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov bomo v vzorcih z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) izmerili izražanje preiskovanih genov. Hkrati bomo v vzorcih izmerili še izražanje dveh referenčnih genov, GAPDH in B2M. Za posamezen vzorec bomo vrednost izražanja preiskovanega gena normalizirali na povprečje koncentracij referenčnih genov. Normalizirane rezultate bomo nato statistično obdelali z uporabo računalniškega programa SPSS.

Rezultati našega dela nam bodo tako omogočili vpogled v vlogo vnetnih citokinov pri nadzoru sistema RANK/RANKL/OPG ter s tem kostne remodelacije v kompleksnem kostnem mikrokolju pri nepatoloških stanjih organizma.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili 21 vzorcev subhondralne kostnine preiskovancev brez prisotnih simptomov in znakov bolezni kosti in sklepov. Vzorce subhondralne kostnine so pridobili na Inštitutu za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Vzorci subhondralne kosti s pripadajočim hrustančnim tkivom so bili odvzeti iz glave stegenice pri obdukcij preiskovancev. Na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani so predhodno izvedli ločitev obeh tkiv, izolacijo RNA iz posameznega tkiva in prepis izolirane RNA v komplementarno verigo deoksiribonukleinske kisline (cDNA). Pred prepisom v cDNA so ovrednotili še čistost in koncentracijo izolirane RNA. Ker so molekule RNA v tkivih in pri izolaciji izpostavljene razgradnji z ribonukleazami (RNaze), so določili tudi ohranjenost izolirane RNA z izračunom parametra RIN (RNA Integrity Number). RIN ima vrednost od 1 do 10. 10 je idealna vrednost, ki označuje najbolj ohranjeno RNA. Vrednost 1 pomeni popolnoma razgrajeno RNA (33). Vzorce z vrednostjo RIN, večjo od 3, so s pomočjo encima reverzne transkriptaze prevedli v cDNA in te vzorce smo uporabili v nalogi.

3.2 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR) ZA MERJENJE IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV

3.2.1 Materiali in naprave

- Reagenti:
 - ultra čista voda (dH₂O)
 - SYBR[®] Select Master Mix (Life technologies[™])
 - začetni in končni oligonukleotidni začetniki za preiskovane gene (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ , iNOS, NOS3, COX-2, PTGER4, in OPG) (Sigma-Aldrich)
 - začetni in končni oligonukleotidni začetniki za referenčna gena (GAPDH in B2M) (Sigma-Aldrich)

- Laboratorijski material:
 - epice (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL)

- nastavki za pipete
- mikrotitrna ploščica s 384 vdolbinicami (Roche Diagnostic, Nemčija)
- folija za mikrotitrsko ploščico (Roche Diagnostic, Nemčija)
- Laboratorijska oprema:
 - pipete (0,5-1 μL , 2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL) (Eppendorf Research, Nemčija)
 - komora za delo z DNA z UV lučjo: DNA/RNA UV-CLENER UVT-S-AR (Biosan, Latvija)
 - aparatura za qPCR: LightCycler[®]480II. (Roche Diagnostic, Nemčija)
 - avtoklav: LABOKLAV 25 (SHP Steriltechnik AG, Nemčija)
 - rotacijski stresalnik, vortex: FVL-2400N Combi-Spin (Biosan, Latvija)
 - centrifuga za mikrotitrsko ploščico: CENTRIC 322A (Tehtnica, Slovenija)
 - sušilnik
 - zamrzovalnik
 - hladilnik

3.2.2 Priprava materiala in komore za PCR

Pred pričetkom dela smo nastavke za pipete zložili v posebne plastične vsebnike, epice pa v steklene vsebnike s priprtim pokrovom. Vsebnike, ki preprečujejo kontaminacijo steriliziranega materiala pri prenosih in shranjevanju v laboratoriju, smo predhodno od zunaj in od znotraj obrisali s 70-odstotnim etanolom ter jih, napolnjene, označili še z indikatorskim trakom za avtoklaviranje, ki po uspešno izvedeni sterilizaciji potemni. Tako pripravljen material smo sterilizirali v avtoklavu po vnaprej nastavljenem programu P2. Sterilizacija poteka 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1 bar. Komoro za PCR smo pripravili neposredno pred začetkom pipetiranja. S hipokloritom smo obrisali celotno delovno površino komore, vortex in ves material (pipete, steklene in plastične vsebnike ter stojala za epice), ki smo ga zložili v komoro. Na koncu smo v komori prižgali še UV-luč za 20 minut. Med delom v laboratoriju smo uporabljali rokavice, ki smo si jih pred vstopom v komoro za PCR vedno sterilizirali s 70-odstotnim etanolom. Z opisanimi ukrepi zmanjšamo možnost kontaminacije reakcijske zmesi in vzorcev, ki lahko vpliva na končne rezultate.

3.2.3 Princip metode qPCR za merjenje izražanja preiskovanih genov

qPCR je kvantitativna metoda, ki omogoča pomnoževanje točno določenega odseka cDNA in sprotno detekcijo nastajajočih produktov v vsakem ciklu reakcije. Metoda omogoča določevanje izražanja molekule RNA, ki jo je potrebno pred reakcijo PCR s pomočjo encima reverzne transkriptaze prevesti v cDNA. Nastanek in količino pomnoženih produktov spremljamo z uporabo fluorescenčnih barvil (34).

V vzorcih smo z metodo qPCR izmerili izražanje genov za dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α), transformirajoči rastni dejavnik beta 1 (TGF- β 1), prostaglandin E receptor 4 (PTGER4), ciklooksigenazo 2 (COX-2), interferon gama (IFN- γ), inducibilno NO-sintazo (iNOS), endotelijsko NO-sintazo (NOS3), interleukine 10, 1 β , in 6 (IL-10, IL-1 β in IL-6), osteoprotegerin (OPG) ter izražanje dveh referenčnih genov, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH) in β -2-mikroglobulin (B2M).

V vzorcih smo želeli izmeriti tudi izražanje gena za IL-4, vendar smo ta gen kasneje izločili iz naše analize.

V preglednici I je predstavljen program za izvedbo reakcije qPCR na aparatu LightCycler[®]480II, ki smo ga uporabili pri merjenju izražanja preiskovanih genov v vzorcih.

Preglednica I: Pogoji za izvedbo reakcije qPCR in nastanek talilne krivulje.

Stopnje reakcije	Temperatura (° C)	Čas	Število ciklov
Aktivacija UDG	50	2min	1
Aktivacija polimeraze	95	2min	1
Denaturacija	95	15s	45
Prileganje in podaljševanje	60	1min	
Talilna krivulja (melting)	95	5s	1
	65	1min	
	97	-	
Ohlajanje (cooling)	40	30s	1

Za vsak gen, ki smo ga analizirali, smo naredili standardno krivuljo. Iz izhodiščne zaloge cDNA (100 ng/ μ L) smo z redčenjem z dH₂O naredili šest standardov. Koncentracije

standardov in način priprave standardov prikazuje preglednica II. Končni volumen standardov je preračunan za analizo 15 genov (13 preiskovanih genov + 2 rezervi).

Preglednica II: Priprava standardov.

Standard	volumen cDNA μL	volumen dH ₂ O μL	končni volumen	prenos v naslednje redčenje
st1 (5,0 ng/μL)	25 izhodiščne cDNA	475	500	250
st2 (2,5 ng/μL)	250	250	500	250
st3 (1,25 ng/μL)	250	250	500	250
st4 (0,625 ng/μL)	250	250	500	250
st5 (0,313 ng/μL)	250	250	500	250
st6 (0,156 ng/μL)	250	250	500	

Na podlagi predhodne določitve optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov smo za analizo genov OPG, TGF-β1, TNF-α, IL-6, IL-10, PTGER4 in GAPDH pripravili reakcijsko zmes za qPCR s 100 nM začetniki (preglednica III), za gena IL-1β in IFN-γ z 200 nM začetniki (preglednica IV) ter za gene iNOS, NOS3, COX-2 in B2M s 600 nM začetniki (preglednica V). Osnovna koncentracija začetnikov F in R, iz katere smo pripravili želeno koncentracijo začetnikov, je znašala 20 μM. Vrstni red pipetiranja komponent v epico je potekal po načelu pipetiranja manjših volumnov v večje, zato smo najprej odpipetirali SYBR[®] Select Master Mix in nazadnje oligonukleotidne začetnike.

Preglednica III: Priprava reakcijske zmesi za merjenje izražanja OPG, TGF-β1, TNF-α, IL-6, IL-10, PTGER4 in GAPDH.

	1x	96x
	Volumen (μL)	Volumen (μL)
SYBR Select2x	7,5	720
dH ₂ O	2,35	225,6
Primer F	0,075	7,2
Primer R	0,075	7,2
cDNA	5,0	

Preglednica IV: Priprava reakcijske zmesi za merjenje izražanja IL-1 β in IFN- γ .

	1x	96x
	Volumen (μ L)	Volumen (μ L)
SYBR Select2x	7,5	720
dH ₂ O	2,2	211,2
Primer F	0,15	14,4
Primer R	0,15	14,4
cDNA	5,0	

Preglednica V: Priprava reakcijske zmesi za merjenje izražanja iNOS, NOS3, COX-2 in B2M.

	1x	96x
	Volumen (μ L)	Volumen (μ L)
SYBR Select2x	7,5	720
dH ₂ O	1,6	153,6
Primer F	0,45	43,2
Primer R	0,45	43,2
cDNA	5,0	

Dvakrat koncentriran reagent SYBR[®] Select Master Mix je komercialno dostopen reagent, ki poleg barvila SYBR Green vsebuje še ostale osnovne komponente za izvedbo reakcije PCR, kot so AmpliTaq[®] DNA-polimeraza, zmes deoksinukleozidtrifosfatov (dNTP) in reakcijski pufer ter encim uracil DNA-glikozilaza (UDG). Ob uporabi SYBR[®] Select Master Mix smo v reakcijsko zmes dodali le ustrezne oligonukleotidne začetnike, vzorec cDNA in dH₂O (35, 36).

Vzorce z izhodiščno koncentracijo cDNA 100 ng/ μ L smo redčili na enako koncentracijo kot standard 2 (2,5 ng/ μ L). Za redčenje smo uporabili dH₂O.

Pri našem delu smo uporabili že predhodno načrtovane oligonukleotidne začetnike. Pred analizo izražanja genov v vzorcih smo za izbrane oligonukleotidne začetnike izvedli optimizacijo oligonukleotidnih začetnikov. V preglednici VI so predstavljena zaporedja oligonukleotidnih začetnikov za preiskovane gene in referenčna gena.

Preglednica VI: Izbrani oligonukleotidni začetniki za qPCR.

Gen	Uradna oznaka gena (37)	Oligonukleotidni začetnik	Nukleotidno zaporedje	Vir
TNF- α	TNF	F-začetnik R-začetnik	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	(38)
TGF- β 1	TGFB1	F-začetnik R-začetnik	TGGACACCAACTATTGCTTCA GGCAGAAGTTGGCATGGTAG	(38)
PTGER4	PTGER4	F-začetnik R-začetnik	CGAGATCCAGATGGTCATCTTAC GGCTGATATAACTGGTTGACGA	(38)
COX-2	PTGS2	F-začetnik R-začetnik	ACCCACTTCAAGGGATTTTGGGA TGTC AATCAAATGTGATCTGGATGT	(38)
NOS3	NOS3	F-začetnik R-začetnik	CTCATGGGCACGGTGATG ACCACGTCATACTCATCCATACAC	(39)
IL-10	IL10	F-začetnik R-začetnik	GTGATGCCCAAGCTGAGA CACGGCCTTGCTCTTGTTTT	(39)
IFN- γ	IFNG	F-začetnik R-začetnik	ATTGGAAGAGGAGAGTGACAGA CACACTCTTTTGGATGCTCTGG	(38)
IL-1 β	IL1B	F-začetnik R-začetnik	ACGATGCACCTGTACGATCAC AGAACACCACTTGTGCTCCAT	(38)
IL-6	IL6	F-začetnik R-začetnik	GGCACTGGCAGAAAACAACC GCAAGTCTCCTCATTGAATCC	(39)
IL-4	IL4	F-začetnik R-začetnik	ACATTGTCCTGCAAATCGACACC TGTCCTGTTACGGTCAACTCGGTGC	(40)
iNOS	NOS2	F-začetnik R-začetnik	ATTCAGGTACGCTGTGTTTGG CATGGTGAACACGTTCTTGG	(41)
GAPDH	GAPDH	F-začetnik R-začetnik	TGCACCACCAACTGCTTAGC GGCATGGACTGTGGTCATGAG	(42)
B2M	B2M	F-začetnik R-začetnik	AGATGAGTATGCCTGCCGTG GCGGCATCTTCAAACCTCCA	(43)
OPG	TNFRSF11B	F-začetnik R-začetnik	GAAGGGCGCTACCTTGAGAT GCAAACCTGTATTTGCTCTGG	(44)

Po končani pripravi standardov, reakcijske zmesi za qPCR in vzorcev smo vse komponente nanesli na mikrotitrsko ploščico. V vsaki vdolbinici je bilo 10 μ L reakcijske zmesi za qPCR z izbrano koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov in 5 μ L cDNA ustreznega vzorca subhondralne kostnine (SB) ali standarda.

Pri naši analizi smo uporabili še negativno kontrolo (NTC), s katero ugotavljamo prisotnost nastanka dimerov oligonukleotidnih začetnikov in prisotnost neželenih nukleinskih kislin (35). V primeru negativne kontrole smo namesto cDNA dodali 5 μ L dH₂O.

Vsak standard smo nanegli v treh ponovitvah, kontrolo NTC v štirih in vsak vzorec subhondralne kostnine v treh ponovitvah. Na eni ploščici smo izvedli analizo treh genov. Priprava mikrotitrskje ploščice za analizo izražanja enega gena pri izbrani koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov je predstavljena v preglednici VII.

Preglednica VII: Shema priprave mikrotitrskje ploščice za analizo izražanja enega gena v vzorcih subhondralne kostnine.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	st1	-	-	st2	-	-	st3	-	-	st4	-	-	st5	-	-	st6	-	-	-	-	NTC	-	-	-
B	SB 21	-	-	SB 22	-	-	SB 23	-	-	SB 25	-	-	SB 26	-	-	SB 27	-	-	SB 28	-	-	SB 30	-	-
C	SB 32	-	-	SB 33	-	-	SB 34	-	-	SB 35	-	-	SB 36	-	-	SB 37	-	-	SB 38	-	-	SB 40	-	-
D	SB 42	-	-	SB 44	-	-	SB 45	-	-	SB 47	-	-	SB 48	-	-									

Po končani pripravi smo ploščico prekrili s prozorno samolepilno folijo za mikrotitrsko ploščico in ploščico centrifugirali 5 minut pri 2500 obratih/min. Ploščico smo vstavili v aparaturu za qPCR in nastavili ustrezen reakcijski volumen (15 μ L) ter program za izvedbo reakcije qPCR (preglednica I). S programsko opremo aparata za qPCR smo na ploščici označili naše vzorce v posameznih vdolbinicah (standarde, vzorce SB in NTC), njihove koncentracije in ponovitve (replikate) (slika 3).

– Step 2: Select Samples

Subset: All Samples

Replicate of

Cannot have more than 12 colors.

– Step 3: Edit Abs Quant Properties

Sample Name

Sample Type

Unknown Negative Control

Positive Control/Calibrator

Standard Concentration Auto Std Curve

Make Replicates

Pos	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type	Concentration
A1	Blue	A1	ST1	Standard	5.00E0
A2	Red	A1	ST1	Standard	5.00E0
A3	Green	A1	ST1	Standard	5.00E0
A4	Magenta	A4	ST2	Standard	2.50E0
A5	Grey	A4	ST2	Standard	2.50E0
A6	Yellow	A4	ST2	Standard	2.50E0
A7	Brown	A7	ST3	Standard	1.25E0
A8	Cyan	A7	ST3	Standard	1.25E0
A9	Dark Green	A7	ST3	Standard	1.25E0
A10	Orange	A10	ST4	Standard	6.25E-1
A11	Purple	A10	ST4	Standard	6.25E-1
A12	Light Blue	A10	ST4	Standard	6.25E-1
A13	Blue	A13	ST5	Standard	3.13E-1
A14	Red	A13	ST5	Standard	3.13E-1
A15	Green	A13	ST5	Standard	3.13E-1
A16	Magenta	A16	ST6	Standard	1.56E-1
A17	Grey	A16	ST6	Standard	1.56E-1
A18	Yellow	A16	ST6	Standard	1.56E-1
A19	Brown	A16	ST6	Standard	1.56E-1
A20	Cyan	A16	ST6	Standard	1.56E-1
A21	Dark Green	A21	NTC	Negative Con	
A22	Orange	A21	NTC	Negative Con	
A23	Purple	A21	NTC	Negative Con	
A24	Light Blue	A21	NTC	Negative Con	
B1	Blue	B1	SB21	Unknown	
B2	Red	B1	SB21	Unknown	
B3	Green	B1	SB21	Unknown	
B4	Magenta	B4	SB22	Unknown	
B5	Grey	B4	SB22	Unknown	
B6	Yellow	B4	SB22	Unknown	
B7	Brown	B7	SB23	Unknown	
B8	Cyan	B7	SB23	Unknown	
B9	Dark Green	B7	SB23	Unknown	

Slika 3: Shema nastavitve programa na aparaturi LightCycler® 480II.

3.3 STATISTIČNE METODE

Pri statistični analizi podatkov smo uporabili računalniški program SPSS/PASW, verzija 18.0.0 (IBM, Chicago, IL, USA) in MS Excel 2010.

S statistično obdelavo podatkov smo želeli poiskati odgovor na vprašanje, ali med preiskovanimi geni v subhondralni kostnini obstajajo medsebojne statistično značilne povezave, zato smo izvedli korelacijsko analizo. Za oceno povezanosti uporabljamo Pearsonov in Spearmanov koeficient korelacije (45). Pearsonov koeficient korelacije uporabimo takrat, ko sta obe spremenljivki normalno porazdeljeni. Kadar se vsaj ena od spremenljivk ne porazdeljuje normalno, izberemo Spearmanov koeficient korelacije. Normalnost porazdelitve smo pred izvedbo korelacijske analize preverili s Shapiro-Wilkovim testom. Pri testu nas je zanimala stopnja značilnosti oz. signifikantnosti (p oz. Sig.). Kadar je $p > 0,05$, se spremenljivke porazdeljujejo normalno. Pri $p < 0,05$ spremenljivke niso normalno porazdeljene (46). Test normalnosti porazdelitve je pokazal,

da se vse izmerjene vrednosti izražanja preiskovanih genov ne porazdeljujejo normalno, zato smo uporabili Spearmanov korelacijski koeficient.

Koeficient korelacije lahko zavzame vrednosti na intervalu od -1 do $+1$. Statistično značilna vrednost -1 pomeni, da med spremenljivkama obstaja največja možna negativna povezanost, vrednost $+1$ pa največjo možno pozitivno povezanost. Kadar je koeficient korelacije enak 0 , povezave med spremenljivkama ni (45).

Zaradi velikega števila preiskovanih genov, vključenih v našo analizo, smo stopnjo značilnosti znižali na $0,02$ in na ta način zmanjšali verjetnost naključno pridobljenih povezav med izražanjem genov. V naši raziskavi med analiziranimi genoma obstaja statistično značilna povezava, kadar je $p < 0,02$.

S pomočjo opisne statistike (Descriptives) v programu SPSS smo izračunali še povprečno vrednost izražanja posameznega gena v subhondralni kostnini in standardni odklon (SD). Opisno statistiko smo uporabili tudi za opis značilnosti preiskovancev (starost, telesna višina, masa ter indeks telesne mase), katerih vzorce subhondralne kostnine smo analizirali v raziskavi.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANE SKUPINE

Vsakemu vzorcu subhondralne kostnine je bila priložena dokumentacija, ki je vsebovala osnovne podatke o preiskovancu (spol, starost, telesna masa in višina), vzrok smrti in podatke o morebitnem zdravljenju z zdravili. V raziskavo smo vključili 21 vzorcev preiskovancev, ki niso imeli znanih degenerativnih bolezni kosti in sklepov. Med preiskovanci je bilo 17 moških in 3 ženske. Najmlajša oseba je bila stara 38 let, najstarejša pa 87 let. Za eno osebo osnovnih podatkov nismo imeli. Ker omenjeni podatki nimajo vpliva na izvedbo analize izražanja genov in je vzorec ustrezal drugim vključenim dejavnikom, smo ga vseeno uporabili v raziskavi. V preglednici VIII so predstavljene osnovne značilnosti preiskovane skupine.

Preglednica VIII: Opis preiskovane skupine.

	N	Najmanjša vrednost	Največja vrednost	Povprečna vrednost	SD
Starost (leta)	20	38	87	66,68	12,754
Telesna višina (m)	20	1,61	1,85	1,7345	0,06605
Telesna masa (kg)	20	60	94	78,20	10,611
ITM* (kg/m ²)	20	21,5	33,3	25,958	3,0034

*ITM = indeks telesne mase

4.2 METODA qPCR

Reakcija qPCR običajno obsega 40 ciklov. Vsak cikel je sestavljen iz treh korakov. V prvem koraku poteka denaturacija. Visoka temperatura (približno 95 °C) omogoči razcepitev dvovijačne matrične DNA (dsDNA) na dve enovijačni DNA (ssDNA). Sledi prileganje oligonukleotidnih začetnikov na ssDNA. Temperatura prileganja je odvisna od talilne temperature (T_m) izbranih oligonukleotidnih začetnikov in je običajno 5 °C pod T_m. V zadnjem, tretjem koraku poteče pri 70–72 °C podaljševanje komplementarne verige s temperaturno odporno DNA-polimerazo. Najpogosteje uporabljamo DNA-polimerazi Taq in Pfu, ki omogočita pripenjanje komplementarnih nukleotidov v novo dsDNA. Pri pomnoževanju krajših odsekov DNA lahko fazo prileganja in podaljševanja združimo v skupen korak, ki poteka pri 60 °C (35, 47).

Iz preglednice I je razvidno, da smo pred prvim ciklom denaturacije in pomnoževanja DNA pri analizi izražanja genov v vzorcih z metodo qPCR izvedli še dva dodatna koraka. V prvem koraku smo s segrevanjem reakcijske zmesi za kratek čas na 50 °C aktivirali delovanje uracil-DNA-glikozilaze (UDG). UDG je encim, ki omogoča cepitev vseh dsDNA, ki imajo v svoji strukturi namesto timina vgrajen uracil. V PCR-produktih so timini zamenjani z uracili in tako UDG v prvi vrsti prepreči prenos PCR-produktov med dvema reakcijama. Aktivnost UDG se nato uniči s segrevanjem na 95 °C v prvem ciklu PCR, ko poteče denaturaciji DNA. Drugi korak je bil namenjen aktivaciji DNA-polimeraze. DNA-polimeraza Taq lahko deluje že pri nižjih temperaturah (npr. pri sobni temperaturi med pripravo vzorcev za qPCR), kar lahko vodi do nespecifičnega prileganja začetnikov in nastanka nespecifičnega produkta. V reagentu SYBR[®] Select Master Mix je DNA-polimeraza Taq obdelana s t. i. hot-start mehanizmom, ki inhibira njeno delovanje pri nižji temperaturi. S segrevanjem reakcijske zmesi na 95 °C za 2 minuti pred prvim ciklom denaturacije dsDNA smo ponovno aktivirali njeno delovanje (35, 36).

4.3 ZAZNAVANJE POMNOŽENIH PRODUKTOV PRI REAKCIJI qPCR

Poznamo specifične in nespecifične metode zaznavanja pomnoženih produktov (48):

1. Specifične metode zaznavanja pomnoženih produktov pri reakciji qPCR

Nastanek produkta spremljamo z uporabo sistemov z označenimi sondami (npr. sonde TaqMan[®], molekularna svetila (Molecular Beacons), Scorpions) ali z uporabo označenih začetnikov (npr. fluorescenčni začetniki LUX[™] in Amplifluor[™] qPCR). Ločimo hibridizacijske in hidrolizirajoče sonde (35, 48).

TaqMan[®] je primer hidrolizirajoče sonde, ki se v stopnji prileganja reakcije PCR specifično veže na nukleotidno zaporedje, ki se pomnožuje. Sonda ima na enem koncu vezano barvilo, ki je poročevalec (angl. reporter) in na drugem koncu barvilo, ki je dušilec (angl. quencher). Dušilec absorbira fluorescenco, ki jo oddaja poročevalec. DNA-polimeraza s svojo endonukleazno aktivnostjo v fazi pomnoževanja DNA razcepi sondo, kar poveča razdaljo med obema barviloma. Dušilec ni več sposoben absorbirati fluorescence, ki tvori signal (47, 48).

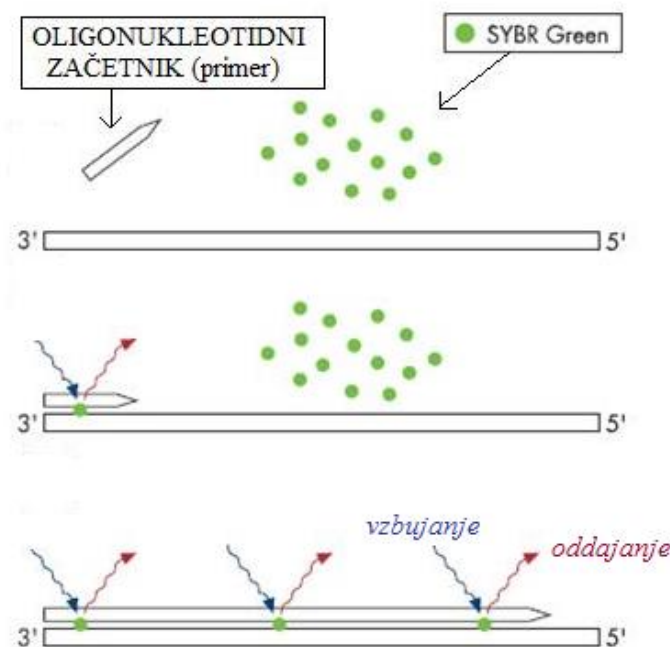
Hibridizacijske sonde so sestavljene iz dveh sond, na eno je vezano akceptorsko in na drugo donorsko barvilo. V fazi prileganja se sondi približata in pride do prenosa energije

med obema barviloma, kar vodi v porast fluorescence. V fazi podaljševanja se sonde ločita in akceptorsko barvilo ne more več tvoriti fluorescenčnega signala (34).

Pri detekciji z označenimi začetniki je nanje vezan fluorofor. Po vgraditvi začetnikov v produkt PCR zaznamo porast fluorescence (35).

2. Nespecifične metode zaznavanja pomnoženih produktov pri reakciji qPCR

Nespecifične metode temeljijo na vezavi fluorescenčnih barvil, kot je SYBR Green, v nastajajočo dsDNA, kar povzroči porast fluorescence. Pri naši analizi izražanja genov v vzorcih smo uporabili omenjeno barvilo. Količina prisotne dsDNA določa intenzivnost fluorescenčnega signala (35, 48). SYBR Green, vezan v dsDNA, oddaja tisočkrat večjo fluorescenco kot v raztopini (47). Slabost metode je njena nespecifičnost, saj se barvilo veže v vse dsDNA, ki nastanejo pri PCR in ne le v tarčno dsDNA. Barvilo se lahko veže tudi v dimere oligonukleotidnih začetnikov. Z ustreznim načrtovanjem oligonukleotidnih začetnikov se izognemo tvorbi nespecifičnih produktov in tako povečamo specifičnost reakcije, ki jo lahko po končani reakciji preverimo z analizo talilne krivulje (35). Vezavo barvila SYBR Green v nastajajočo dsDNA prikazuje slika 4.



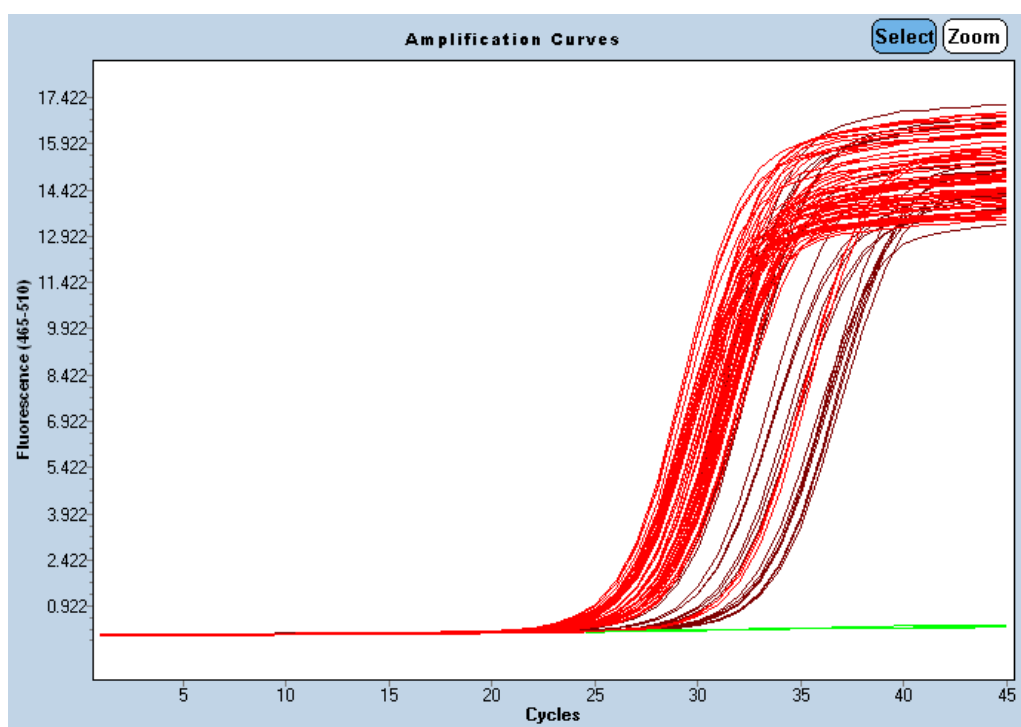
Slika 4: Vgrajevanje barvila SYBR Green v nastajajočo dsDNA med reakcijo qPCR. Prirejeno po (34).

4.4 ANALIZA qPCR PODATKOV

Analizo reakcije qPCR smo izvedli s programsko opremo naprave LightCycler[®] 480II. V nadaljevanju so podrobneje predstavljeni podatki qPCR, ki smo jih pridobili pri naši analizi in so nam služili pri vrednotenju rezultatov reakcije qPCR.

4.4.1 Analiza krivulje pomnoževanja

Med reakcijo pomnoževanja in sočasne detekcije nastalih produktov se izrisuje sigmoidna krivulja, ki predstavlja kopičenje produkta med celotno reakcijo qPCR (35). Ordinatna os grafa predstavlja jakost fluorescence, abscisna os pa število ciklov (slika 5).



Slika 5: Krivulja pomnoževanja pri uspešno izvedeni reakciji qPCR. Krivuljo smo dobili pri analizi izražanja gena OPG v vzorcih subhondralne kostnine.

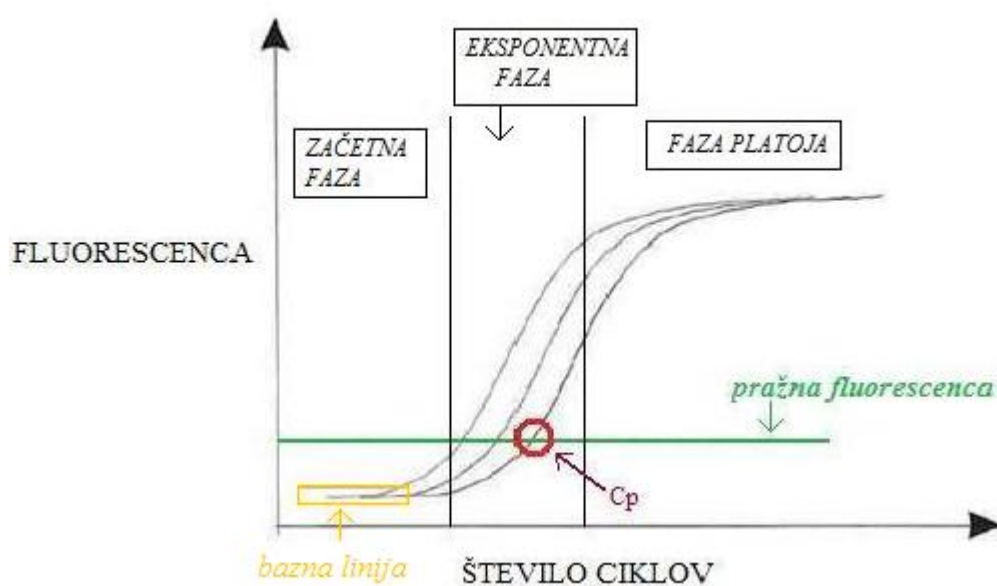
Krivuljo pomnoževanja lahko razdelimo v tri faze: začetna faza, eksponentna faza in faza platoja (48). V teoriji lahko ob predpostavki, da reakcija poteka pri 100-odstotni učinkovitosti, dobimo v vsakem ciklu dvakrat več produkta kot v predhodnem ciklu. V realnosti celotna reakcija ne poteka tako (47). Med reakcijo se porabljajo reagenti reakcijske zmesi za qPCR, zmanjša se aktivnost DNA-polimeraze in pride do kopičenja produkta, kar upočasni potek reakcije, ki se sčasoma ustavi. Posledično se količina produkta PCR ne spreminja več, zato se na krivulji pojavi plato. Metoda qPCR omogoča

pridobivanje podatkov iz eksponentne faze, kjer se DNA učinkovito podvaja in se izkoristek reakcije najbolj približa teoretični predpostavki (47, 49).

Kadar v negativni kontroli (NTC), ki ne vsebuje cDNA, ni prisotnih dimerov oligonukleotidnih začetnikov ali neželenih nukleinskih kislin, krivulja pomnoževanja ne nastane, kar na sliki 5 prikazuje zelena krivulja. Krivulje pomnoževanja ne zaznamo tudi pri analizi vzorcev SB29-RT, ki ne vsebujejo genomske DNA (gDNA) oziroma v njih ne pride do pomnoževanja gDNA. Vzorec SB29-RT smo uporabili pri optimizaciji oligonukleotidnih začetnikov.

4.4.2 Odčitavanje vrednosti C_p

Simbol C_p (angl. crossing point) označuje cikl, kjer krivulja pomnoževanja posameznega vzorca prestopi prag fluorescence (34, 35). Prag fluorescence predstavlja tisto vrednost fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja (49). Običajno linijo fluorescenčnega praga avtomatsko nastavi aparatura za qPCR (35). Točka C_p se nahaja na eksponentnem delu krivulje pomnoževanja (49) (slika 6).



Slika 6: Krivulja pomnoževanja prikazuje potek verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).

Prirejeno po (48).

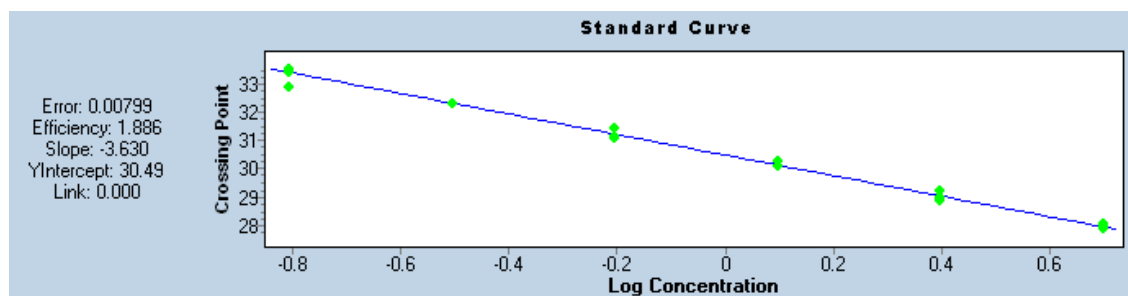
Vrednost C_p je obratnosorazmerna z začetnim številom nukleinskih kislin v vzorcu in nam omogoča primerjavo vzorcev med seboj (49). Pri primerjavi vrednosti C_p dveh vzorcev, ki se med seboj razlikujeta za en cikel, ima vzorec z manjšo vrednostjo C_p enkrat več matrice

DNA kot vzorec z večjo vrednostjo C_p ob predpostavki, da reakcija pri obeh vzorcih poteka pri 100-odstotni učinkovitosti. Razlika za dva cikla pomeni dvakratno razliko v količini matrice DNA (35, 47).

Oznaka C_p je specifična za LightCycler[®]480II. V literaturi se za označevanje omenjenega cikla uporablja bolj splošen izraz C_q (angl. quantification cycle) (50).

4.4.3 Priprava standardne krivulje

Z zaporednim redčenjem standarda znane koncentracije pripravimo vsaj pet standardov, ki jih uporabimo za izdelavo standardne krivulje (34). Standardna krivulja se izriše na grafu, ki podaja odvisnost vrednosti C_p (os y) od logaritemske vrednosti koncentracije standarda (os x) (slika 7) (35).



Slika 7: Standardna krivulja pri analizi izražanja gena OPG v vzorcih subhondralne kostnine.

S pomočjo standardne krivulje lahko na podlagi izmerjene vrednosti C_p določimo neznano koncentracijo matrice DNA v vzorcu (49). Iz krivulje pridobimo podatke o poteku reakcije in različne reakcijske parametre (npr. naklon, presečišče z osjo y in korelacijski koeficient). Naklon podaja učinkovitost reakcije pomnoževanja. Pri 100-odstotni učinkovitosti je naklon krivulje $-3,32$ (35). Ker na reakcijo pomnoževanja vplivajo različni dejavniki, reakcija redko doseže 100-odstotno učinkovitost (34). Pri uspešno izvedeni reakciji qPCR je učinkovitost med 90 % in 110 %, kar ustreza vrednostim naklona med $-3,58$ in $-3,10$ (35).

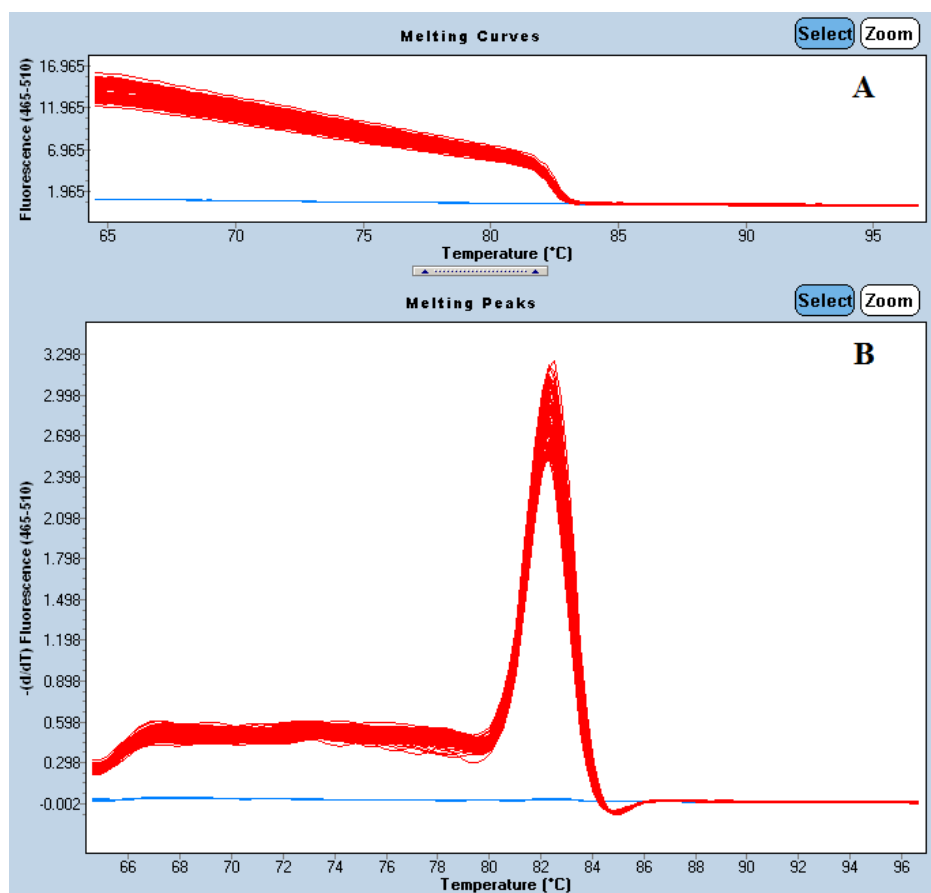
Učinkovitost izračunamo po enačbi 1:

Enačba 1: Izračun učinkovitosti reakcije qPCR. Prirejeno po (34).

$$\text{UČINKOVITOST (\%)} = (10^{(-1/\text{naklon})} - 1) \times 100$$

4.4.4 Ocena talilne krivulje

Talilno (disociacijsko) krivuljo dobimo po končani reakciji qPCR, ko v dodatnem koraku (melting) reakcijsko zmes ponovno segrejemo (preglednica I). Pri povišanju temperature pride pri T_m do razpada dvojnoverižne DNA (dsDNA) v dve enoverižni DNA (ssDNA) in posledično sproščanja barvila SYBR Green iz dsDNA, kar zaznamo kot padec fluorescenčnega signala. Z analizo vrhov talilnih krivulj posameznih vzorcev lahko ugotovimo, ali je v vzorcih prisoten želeni produkt pomnoževanja reakcije PCR. Kadar v vzorcih nastane le želeni produkt, je na grafu talilne krivulje prisoten le en vrh. Nastanek več različnih vrhov pomeni, da so v vzorcu lahko prisotni še nespecifični produkti, dimeri oligonukleotidnih začetnikov ali gDNA (35). Analizo talilne krivulje prikazujeta grafa A in B na sliki 8. Modra ravna krivulja na grafih A in B predstavlja tiste vzorce, v katerih ni prisotnih specifičnih ali nespecifičnih produktov reakcije qPCR, gDNA ali dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Takšno krivuljo dobimo v primeru uspešne analize negativne kontrole (NTC) in vzorca SB29-RT.



Slika 8: Analiza talilne krivulje, ki smo jo dobili pri določevanju izražanja gena za OPG v vzorcih subhondralne kostnine.

4.5 UPORABA REFERENČNIH GENOV

Normalizacija izražanja genov je ključen korak pri doseganju ustreznih rezultatov metode qPCR in nam omogoča primerjavo ravni izražanja molekule mRNA v različnih vzorcih (50). Potek celotne analize izražanja genov je sestavljen iz več stopenj. Različni procesi, kot so izolacija RNA iz tkiv, shranjevanje vzorcev in prepis molekule RNA v cDNA, lahko vplivajo na razlike v količini analizirane mRNA oziroma cDNA v posameznih vzorcih. Na razlike vplivata tudi kakovost in količina začetnega vzorca ter eksperimentalni postopek s prenosi materiala in napakami pri pipetiranju. Z normalizacijo rezultatov izražanja genov popravimo opisane razlike med vzorci (51, 52). Najpogosteje za normalizacijo uporabljamo predhodno izbrane najbolj optimalne referenčne gene, ki jih določimo v vzorcih poleg izražanja preiskovanih genov (50). Referenčni geni morajo ustrezati določenim zahtevam. Njihovo izražanje naj bi bilo konstantno. Hkrati naj bi izkazovali minimalne razlike pri izražanju v različnih tkivih in fizioloških stanjih organizma. Po drugi strani pa morajo biti občutljivi na razlike, ki nastanejo pri eksperimentalnem delu, saj nam tako omogočajo normalizacijo. Tem zahtevam se najbolj približajo t. i. hišni geni (angl. housekeeping genes), ki nadzorujejo metabolizem celic (52). Ker praktično ni mogoče pričakovati, da noben dejavnik ne vpliva na izražanje referenčnih genov v celicah, je potrebno za vsak eksperiment posebej določiti stabilnost izražanja referenčnih genov (51). Za uspešno normalizacijo moramo uporabiti več kot en referenčni gen (50).

V vzorcih smo tako poleg izražanja preiskovanih genov določili še izražanje dveh referenčnih genov, GAPDH in B2M, ki sta bila predhodno določena kot najbolj optimalen par referenčnih genov v subhondralnem kostnem tkivu (44).

4.6 OPTIMIZACIJA OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV

Za gene za TNF- α , TGF- β 1, PTGER4, COX-2, IFN- γ , iNOS, NOS3, IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-4 in OPG, katerih izražanje smo želeli izmeriti v vzorcih, smo morali najprej določiti optimalno koncentracijo izbranih oligonukleotidnih začetnikov. Optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov zagotavlja vezavo v cDNA in nastanek produktov PCR. Pri optimizaciji oligonukleotidnih začetnikov smo za izbran par oligonukleotidnih začetnikov preverili še njegovo specifičnost in možnost pomnoževanja gDNA ter tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov.

4.6.1 Priprava reakcijske zmesi za qPCR

Za vse gene (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ , iNOS, NOS3, COX-2, PTGER4 in OPG) smo naredili optimizacijo s koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov 100 nM, 200 nM in 600 nM. Za gena iNOS in TNF- α smo pripravili še 1000 nM oligonukleotidne začetnike. Osnovna koncentracija začetnikov F in R, iz katere smo pripravili želeno koncentracijo začetnikov, je znašala 20 μ M. Poleg oligonukleotidnih začetnikov F in R za preiskovani gen smo v reakcijsko zmes za qPCR dodali še dvakrat koncentriran reagent SYBR[®] Select Master Mix ter dH₂O. Volumen pripravljene reakcijske zmesi je odvisen od načrtovane porabe in dodane rezerve.

4.6.2 Priprava standardov

Za izdelavo standardne krivulje smo uporabili šest standardov (st). Standarde smo pripravili iz izhodiščne cDNA s koncentracijo 100 ng/ μ L, ki smo jo pridobili iz več vzorcev subhondralne kostnine. V preglednici IX so predstavljene koncentracije standardov za standardno krivuljo in način redčenja. Končni volumen pripravljenih standardov je odvisen od načrtovane porabe in upoštevanja dodatka za rezervo.

Preglednica IX: Preglednica priprave standardov za analizo enega gena (npr. iNOS) pri treh različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov.

Standard	volumen cDNA μ L	volumen dH ₂ O μ L	končni volumen	prenos v naslednje redčenje
st1 (5,0 ng/ μ L)	5 izhodiščne cDNA	95	100	50
st2 (2,5 ng/ μ L)	50	50	100	50
st3 (1,25 ng/ μ L)	50	50	100	50
st4 (0,625 ng/ μ L)	50	50	100	50
st5 (0,313 ng/ μ L)	50	50	100	50
st6 (0,156 ng/ μ L)	50	50	100	

4.6.3 Priprava kontrol

Pri naši analizi smo uporabili dve kontroli:

1. NTC (angl. no-template control) ali negativna kontrola

Z uporabo kontrole NTC ugotavljamo prisotnost nastanka dimerov oligonukleotidnih začetnikov in prisotnost neželenih nukleinskih kislin (35). V vdolbinice z negativno

kontrolno smo napipetirali 10 μL reakcijske zmesi za PCR, ki smo ji namesto vzorca cDNA dodali 5 μL dH_2O .

2. No-RT (angl. no-reverse transcriptase control) ali SB29-RT

Z omenjeno kontrolo ugotavljamo morebitno prisotnost gDNA v vzorcu RNA (35). V vdolbinice smo napipetirali 10 μL reakcijske zmesi za PCR in 5 μL vzorca SB29-RT. SB29-RT je vzorec subhondralne kostnine (SB) z oznako SB29, ki mu v procesu reverzne transkripcije niso dodali encima reverzne transkriptaze. V vzorcu tako ni prišlo do prepisa mRNA v cDNA. Iz izhodiščnega vzorca SB29-RT s koncentracijo 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ smo z redčenjem z dH_2O pripravili vzorec SB29-RT s koncentracijo 2,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, ki smo ga uporabili pri analizi.

4.6.4 Priprava mikrotitrne ploščice za analizo

V vsako vdolbinico na mikrotitrski ploščici smo nanesti 10 μL reakcijske zmesi za PCR in ji dodali 5 μL cDNA, razen v primeru obeh kontrol. Končni reakcijski volumen v vsaki vdolbinici je znašal 15 μL . Vsak standard in obe kontroli smo na mikrotitrsko ploščico nanesti v treh ponovitvah.

Za gene $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta 1$, iNOS in OPG smo pri vseh treh koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov (100 nM, 200 nM in 600 nM) pripravili standardno krivuljo. Preglednica X prikazuje načrt pipetiranja za en gen pri treh koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov. V vrstici A so 100 nM začetniki, v B 200 nM in v vrstici C 600 nM začetniki.

Preglednica X: Shema priprave mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinicami pri treh različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov za določitev optimalnega izražanja enega gena (predstavljen je le del mikrotitrne ploščice).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	st1	-	-	st2	-	-	st3	-	-	st4	-	-	st5	-	-	st6	-	-	NTC	-	-	SB29-RT	-	-
B	st1	-	-	st2	-	-	st3	-	-	st4	-	-	st5	-	-	st6	-	-	NTC	-	-	SB29-RT	-	-
C	st1	-	-	st2	-	-	st3	-	-	st4	-	-	st5	-	-	st6	-	-	NTC	-	-	SB29-RT	-	-
D																								

Zaradi omejene količine zaloge cDNA smo pri genih za IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , NOS3, COX-2 in PTGER4 naredili standardno krivuljo le pri 100 nM začetnikih. Za 200 nM in 600 nM začetnike smo nanegli na mikrotitrsko ploščico le standard 2 v treh ponovitvah in NTC v dveh ponovitvah (preglednica XI).

Preglednica XI: Shema pipetiranja za gene IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , NOS3, COX-2 in PTGER4 (predstavljen je le del mikrotitrsko ploščice).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	st1	-	-	st2	-	-	st3	-	-	st4	-	-	st5	-	-	st6	-	-	NTC	-	-	SB29-RT	-	-
B	st2	-	-	NTC	-																			
C	st2	-	-	NTC	-																			

Pri analizi 1000 nM oligonukleotidnih začetnikov za iNOS in TNF- α smo na ploščico nanegli standard 2 v treh ponovitvah, NTC v dveh in vzorec SB29-RT v treh ponovitvah.

Po končani pripravi smo ploščico prekrili s prozorno samolepilno folijo za mikrotitrsko ploščico in ploščico centrifugirali 5 minut pri 2500 obratih/min. Ploščico smo vstavili v aparaturo za qPCR in nastavili ustrezen reakcijski volumen (15 μ L) ter program za izvedbo reakcije qPCR (preglednica I).

4.6.5 Rezultati in analiza optimizacije oligonukleotidnih začetnikov

Na izbiro ustrezne koncentracije je vplivala učinkovitost pomnoževanja, ki smo jo določili s pomočjo standardne krivulje in je morala biti med 1,8 in 2,2 (idealna vrednost je 2, kar ustreza naklonu krivulje -3,3) in nastanek produkta pri čim manjši vrednosti Cp. V preglednici XII so za gene iNOS, OPG, TGF- β 1 in TNF- α predstavljeni rezultati optimizacije pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov, ki je bila najbolj optimalna in smo jo uporabili pri analizi izražanja genov.

Preglednica XII: Rezultati optimizacije koncentracije oligonukleotidnih začetnikov.

Gen	Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov (nM)	Naklon standardne krivulje	Učinkovitost (E)*	Cp za st 5,0 ng/μL	Cp za st 0,156 ng/μL	NTC	Talilna krivulja	Vzorec brez RT
iNOS	600	-11,9	1,2	32,0	/**	Neg	1pik	Neg
OPG	100	-3,6	1,9	28,0	33,0	Neg	1pik	Neg
TGF-β1	100	-3,4	2,0	/***/ <u>Cp za st 2,5 ng/μL</u> 25,9	30,0	Neg	1pik	Neg
TNF-α	100	-2,9	2,2	35,2	39,0	Neg	1pik	2x neg in 1x pozitiv pri Cp40
IL-6	100	-3,3	2,0	31,5	36,8	Neg	1pik	Neg
IL-10	100	-2,9	2,2	31,0	37,0	Neg	1pik	Neg
COX-2	100	-3,6	1,9	28,8	34,3	Neg	1pik	Neg
NOS3	100	-3,4	2,0	29,0	34,6	Neg	2pika	pozitiv pri Cp37
IFN-γ	100	-3,2	2,0	33,4	/**	Neg	2pika	1x neg in 2x pozitiv pri Cp40
IL-1β	100	-3,0	2,2	33,8	/**	Neg	1pik	2x neg in 1x pozitiv pri Cp40
PTGER4	100	-3,5	1,9	28,7	34,1	Neg	1pik	Neg
IL-4	100	-3,8	1,8	32,4	39,0	Neg	1pik	pozitiv pri Cp35
GAPDH	predhodno optimiziran							
B2M	predhodno optimiziran							

* LightCycler® 480II izračuna učinkovitost (angl. efficiency) po enačbi $E = 10^{(-1/naklon)}$.

** Za izris optimalne standardne krivulje smo pri genih za iNOS, IFN-γ in IL-1β izključili standard 0,156 ng/μL.

*** Pri TGF-β1 smo pri oblikovanju standardne krivulje izključili standard 5,0 ng/μL, ker je prišlo do prevelikega odstopanja, ki bi lahko bil posledica napake pri pipetiranju.

Ker smo za gene IL-6, IL-10, COX-2, NOS3, IFN- γ , IL-1 β , PTGER4 in IL-4 izdelali standardno krivuljo le pri 100 nM koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov (rezultati so podani v preglednici XII), smo ustrezno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov izbrali na podlagi primerjave vrednosti Cp za standard 2 pri 100 nM, 200 nM in 600 nM koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov. Kadar sta bili pri določeni koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov vrednosti Cp podobni, smo izbrali manjšo koncentracijo ali tisto koncentracijo, pri kateri smo iz analize treh ponovitev za standard 2 dobili manjšo standardno deviacijo. Ustrezne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za gene IL-6, IL-10, COX-2, NOS3, IFN- γ , IL-1 β in PTGER4 so podane v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Primerjava vrednosti za standard 2 pri treh koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov za posamezen gen.

Gen	Cp za st2 pri 100 nM oligonukleotidnih začetnikih	Cp za st2 pri 200 nM oligonukleotidnih začetnikih	Cp za st2 pri 600 nM oligonukleotidnih začetnikih	Izbrana koncentracija oligonukleotidnih začetnikov (nM)
IL-6	32,7	32,2	32,5	100
IL-10	32,0	32,2	31,7	100
COX-2	29,9	29,0	28,8	600
NOS3	30,1	29,4	28,8	600
IFN- γ	35,0	34,2	34,0	200
IL-1 β	35,4	33,8	34,0	200
PTGER4	29,8	29,6	29,4	100

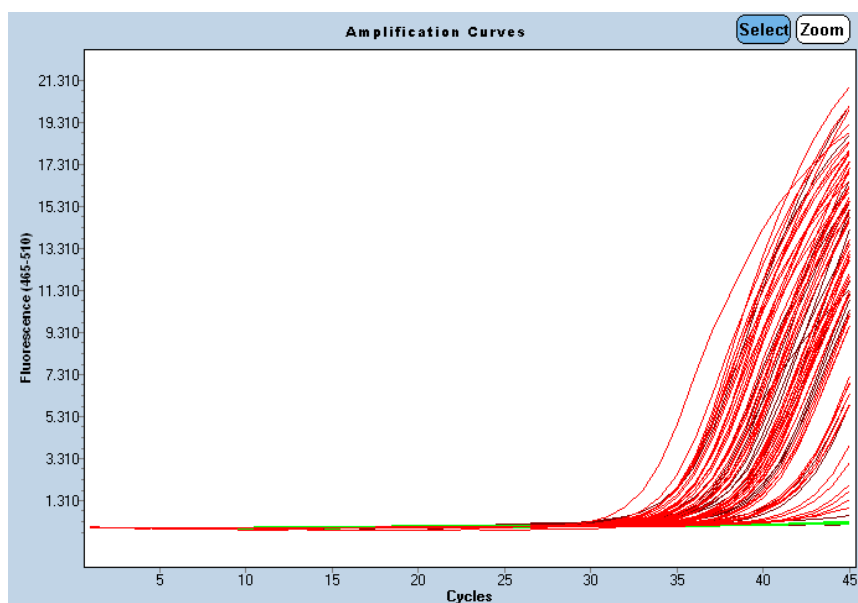
Pri optimizaciji smo preverili tudi, ali izbrani par oligonukleotidnih začetnikov tvori dimere in ali pomnožuje gDNA. V preglednici XII vidimo, da so kontrole NTC pri vseh genih negativne (neg), kar pomeni, da ni prišlo do tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Na podlagi teh rezultatov lahko trdimo, da pri našem delu tudi ni prišlo do kontaminacije vzorca, saj ni prisotnih drugih neželenih nukleinskih kislin. Pri analizi kontrole SB29-RT (v preglednici XII je označena z oznako Vzorec brez RT), ki ne vsebuje cDNA, vidimo, da je prišlo pri TNF- α , IL-1 β , NOS3 in IFN- γ do pomnoževanja gDNA. Pri TNF- α in IL-1 β je bila pozitivna (pozitiv) ena od treh ponovitev kontrole SB29-RT. Pri analizi talilnih krivulj (melting) obeh genov je bil pri vzorcu kontrole SB29-RT viden enak vrh (pik) kot pri standardih, vendar je bil vrh kontrole SB29-RT mnogo manjši. Hkrati je

bila tudi vrednost C_p vzorcev kontrole SB29-RT v primerjavi z vrednostjo C_p standarda 6 večja, kar nakazuje, da je koncentracija pomnožene gDNA zelo majhna. Ker je praktično težko pričakovati, da bi lahko v postopku izolacije mRNA popolnoma odstranili prisotno gDNA, smo zaključili, da ima pomnožena gDNA minimalen prispevek h količini fluorescenčnega signala, ki smo ga dobili pri standardih. Podobne rezultate smo dobili tudi pri NOS3 in IFN- γ , kjer sta bila na grafu talilne krivulje vidna dva vrhova. Nižji vrh, ki je predstavljal pomnoženo gDNA, je bil pomaknjen malo bolj v desno v primerjavi z vrhovi standardov. Pri analizi izražanja genov TNF- α , IL-1 β , NOS3 in IFN- γ v vzorcih subhondralne kostnine smo tako uporabili načrtovane oziroma izbrane oligonukleotidne začetnike.

Do pomnoževanja gDNA pride tudi pri IL-4. Analiza talilne krivulje je pokazala, da je vrh talilne krivulje kontrole SB29-RT popolnoma enak vrhu, ki ga dobimo pri standardih, kar pomeni, da oligonukleotidni začetniki pomnožujejo le gDNA. Za IL-4 bi bilo tako potrebno oblikovati in pri ustreznem proizvajalcu naročiti nove oligonukleotidne začetnike, zato smo omenjeni gen izključili iz nadaljnje analize.

4.7 OCENA IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV V VZORCIH SUBHONDRALNE KOSTNINE

Po končani reakciji qPCR smo pri analizi krivulje pomnoževanj in standardne krivulje ugotovili, da je bilo določevanje gena iNOS neuspešno (slika 9).



Slika 9: Krivulja pomnoževanja pri analizi izražanje iNOS.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da se v vzorcih subhondralne kostnine iNOS slabo izraža. Rezultatov izražanja iNOS nismo vključili v statistično analizo podatkov.

Za vse ostale preiskovane gene (COX-2, IL-6, IFN- γ , IL-1 β , PTGER4, IL-10, TNF- α , OPG, TGF- β 1 in NOS3) ter referenčna gena (B2M in GAPDH) je bila optimizacija izražanja genov v vzorcih subhondralne kostnine uspešna. Za vsak gen posebej smo s pomočjo analiziranih standardov dobili ustrezne standardne krivulje z vrednostmi naklonov med -4,4 in -3,3 (idealni naklon ima vrednost -3,3), kar pomeni, da se je cDNA učinkovito pomnoževala. Rezultati analize izražanja genov v vzorcih subhondralne kostnine so predstavljeni v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Rezultati analize izražanja genov.

Gen	Naklon standardne krivulje	Učinkovitost (E)*	Cp za st 5,0 ng/ml	Cp za st 0,156 ng/ μ L	NTC	Talilna krivulja	Vzorci: Cp \leq
COX-2	-3,6	1,9	27,5	32,9	pozitivno pri Cp40	1pik	31,0
B2M	-3,3	1,8	21,1	27,0	pozitivno pri Cp38	2pika	24,4
IL-6	-4,4	1,7	31,3	36,8	Neg	1pik	35,3
IFN- γ	-4,2	1,7	32,8	/**	pozitivno pri Cp40	2pika	38,2
IL-1 β	-3,3	2,0	32,7	39,0	Neg	1pik	37,7
PTGER4	-3,7	1,9	28,2	34,5	Neg	1pik	30,9
IL-10	-3,3	2,0	31,1	36,1	Neg	1pik	35,8
TNF- α	-3,7	1,9	34,3	/**	Neg	1pik	38,4
OPG	-3,6	1,9	28,0	33,3	Neg	1pik	31,8
TGF- β 1	-3,4	2,0	26,0	32,2	Neg	1pik	27,0
NOS3	-4,0	1,8	28,2	33,4	Neg	1pik	31,8
GAPDH	-4,1	1,8	20,4	25,9	Neg	2pika	23,4

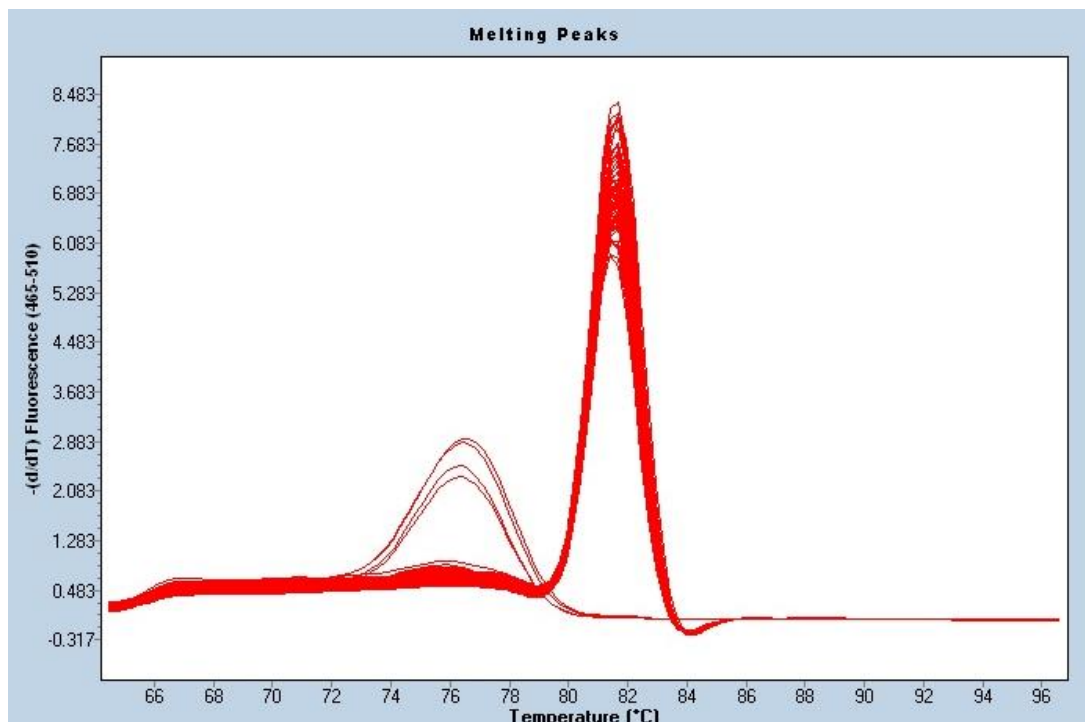
* LightCycler[®] 480II izračuna učinkovitost (angl. efficiency) po enačbi $E = 10^{(-1/\text{naklon})}$.

** Za izris optimalne standardne krivulje smo pri genih za IFN- γ in TNF- α izključili standard 0,156 ng/ μ L.

Program na aparaturi LightCycler[®] 480II je, na podlagi izmerjene vrednosti Cp vzorca z uporabo standardne krivulje posameznega gena, podal vrednost izražanja gena v

analiziranem vzorcu subhondralne kostnine. V preglednici XIV so predstavljene največje vrednosti C_p za analizirane gene, ki so bile izmerjene v vzorcu subhondralne kostnine.

Za vse preiskovane gene smo naredili tudi analizo talilne krivulje (melting). Pri izražanju gena B2M je prišlo predvsem v kontroli NTC do tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov (slika 10).



Slika 10: Tvorba dimerov oligonukleotidnih začetnikov pri analizi B2M.

Tudi pri skrbno načrtovanih oligonukleotidnih začetnikih vedno obstaja možnost, da pride do nastanka nespecifičnih produktov in tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Najpogosteje pride do tvorbe dimerov v kontroli NTC, kjer ni prisotne tarčne DNA. Dimeri oligonukleotidnih začetnikov imajo nižjo T_m od produkta reakcije qPCR, zato se njihov vrh na grafu talilne krivulje nahaja levo od vrha produkta reakcije qPCR. Nastanek dimerov v vzorcih s tarčno DNA je nezaželen, ker zmanjša učinkovitost pomnoževanja in prispeva k fluorescenčnemu signalu (35). Pri naši analizi so bili le v nekaterih vzorcih za gen B2M poleg zelenega produkta qPCR prisotni tudi dimeri oligonukleotidnih začetnikov. V omenjenih vzorcih so dimeri verjetno nastali zaradi manjše količine prisotne tarčne DNA, na katero bi se sicer oligonukleotidni začetniki lahko vezali.

4.8 STATISTIČNA ANALIZA IN REZULTATI IZRAŽANJA PREISKOVANIH GENOV V VZORCIH SUBHONDRALNE KOSTNINE

4.8.1 Statistična analiza

Vrednosti izražanja preiskovanih genov, ki jih je podal program na aparaturi LightCycler® 480II, smo normalizirali na aritmetično sredino referenčnih genov (GAPDH in B2M). Normalizirane vrednosti izražanja genov smo statistično obdelali z uporabo programa SPSS.

Izražanje genov sistema RANK/RANKL/OPG v vzorcih subhondralne kostnine, ki smo jih uporabili v raziskavi, so izmerili predhodno že v sklopu magistrske naloge z naslovom Izražanje genov za antioksidativne encime v vzorcih subhondralne kostnine avtorice Anje Penič (44). V sklopu naše naloge smo izvedli meritve izražanja genov za devet dejavnikov vnetja, in sicer IL-6, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, TNF- α , COX-2, PTGER4, TGF- β 1 in NOS3.

S pomočjo opisne statistike smo pridobili podatke o povprečni vrednosti izražanja posameznega gena v vzorcih subhondralne kostnine. Program je izračunal še standardne odklone in podal število enot (N), ki jih je upošteval pri izračunih (preglednica XV).

Preglednica XV: Rezultati opisne statistike v programu SPSS.

	Povprečna vrednost	SD	N
COX-2	4,541799	2,9800683	18
PTGER4	2,210203	1,1995617	18
TGF- β 1	3,370171	1,2332384	18
IL-6	1,742351	0,8416984	18
IFN- γ	3,536604	3,3818349	18
IL-1 β	6,244232	9,0334714	18
IL-10	1,226207	1,6105667	18
TNF- α	5,967755	7,4275955	18
NOS3	1,421097	0,6986605	18
RANK	2,8961090	2,49416455	21
RANKL	2,0221205	1,87772769	21
OPG	6,7797271	8,78547440	21

Visoki standardni odkloni (SD), ki smo jo dobili pri genih za IL-1 β , TNF- α in OPG, bi lahko bili posledica biološke variabilnosti, to je razlik v izražanju genov med posamezniki, katerih vzorce kostnega tkiva smo uporabili v raziskavi.

Za ugotavljanje medsebojnih povezav med preiskovanimi geni smo izvedli korelacijsko analizo z uporabo Spearmanovega korelacijskega koeficienta. Predvsem so nas zanimala povezave med posameznimi vnetnimi citokini (IL-6, IFN- γ , IL-1 β , IL-10 in TNF- α) ter drugimi dejavniki (COX-2, PTGER4, TGF- β 1 in NOS3) z geni sistema dejavnikov RANK/RANKL/OPG, ki imajo v kostnem tkivu osrednjo vlogo pri uravnavanju procesa kostne resorpcije (4). Spearmanova korelacijska analiza za izbrani par analiziranih genov kot rezultat poda vrednost korelacijskega koeficienta, stopnjo značilnosti (p oz. Sig.) in število enot oziroma vzorcev subhondralne kostnine (N), ki jih uporabi pri izračunu (46). V preglednici XVI so predstavljeni statistično značilni rezultati Spearmanove korelacijske analize.

Preglednica XVI: Statistično značilne korelacije med analiziranimi geni.

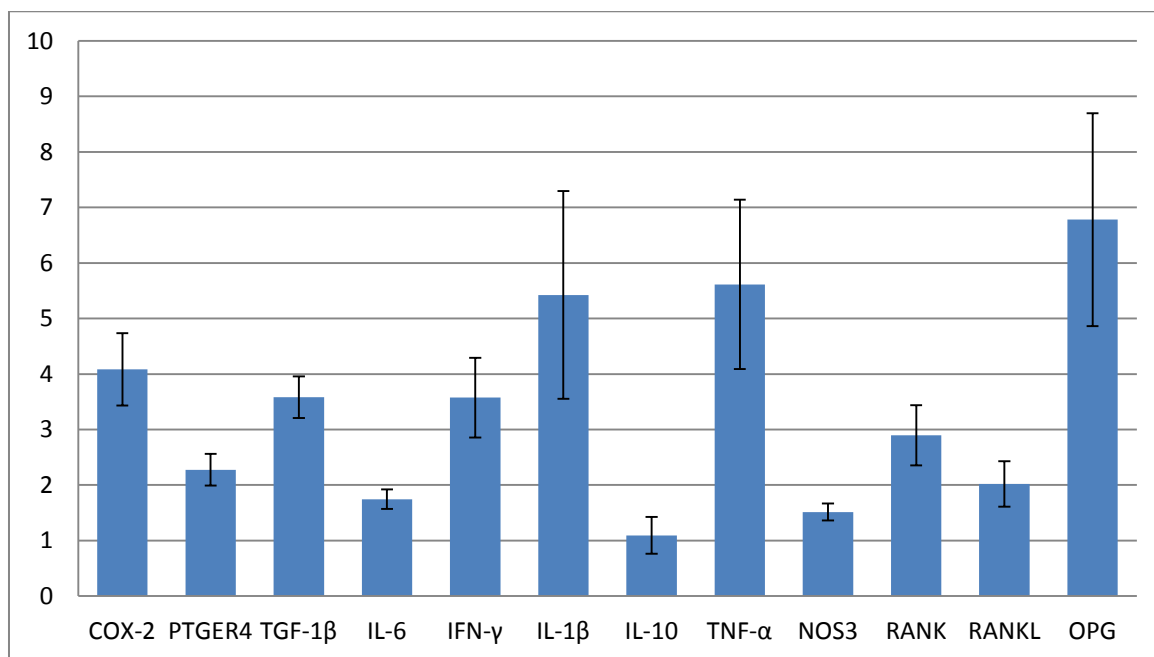
Korelacija med izbranimi genoma	p	Spearmanov korelacijski koeficient (ρ)*	N
NOS3 in TGF- β 1	0,000	0,752	18
IL-6 in IL-10	0,000	0,793	18
IL-6 in TNF- α	0,003	0,662	18
IFN- γ in IL-10	0,000	0,777	18
IFN- γ in TNF- α	0,001	0,723	18
IL-1 β in TNF- α	0,000	0,851	18
IL-10 in TNF- α	0,000	0,800	18
RANKL in OPG	0,005	0,586	21
IL-6 in IFN- γ	0,010	0,587	18
RANK in IFN- γ	0,015	0,564	18
IL-10 in IL-1 β	0,015	0,564	18
IL-1 β in OPG	0,016	-0,560	18
TNF- α in OPG	0,013	-0,572	18

*Povezanost je značilna pri $p < 0,02$.

Pri vrednosti $p < 0,02$ med analiziranimi genoma obstaja statistično značilna povezava. Moč povezave med citokinoma je razvidna iz vrednosti Spearmanovega korelacijskega

koeficienta (ρ). Pri absolutni vrednosti korelacijskega koeficienta, manjši od 0,3, imamo šibko povezanost, pri vrednosti nad 0,6 pa zelo močno povezanost med izbranimi genoma (46). Iz korelacijskih koeficientov v preglednici XVI je razvidno, da je večina statistično značilnih povezav pozitivnih, le povezavi med genoma za IL-1 β in OPG ter TNF- α in OPG sta negativni in kažeta na obratnosorazmerno spreminjanje izražanja gena OPG ter vnetnih citokinov IL-1 β in TNF- α v kostnem tkivu.

Normalizirane vrednosti izražanja preiskovanih genov (IL-6, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, TNF- α , COX-2, PTGER4, TGF- β 1 in NOS3) in genov triade RANK/RANKL/OPG v posameznih vzorcih subhondralne kostnine smo vnesli v program MS Excel 2010 in izračunali povprečno vrednost izražanja posameznega gena ter standardno napako povprečja (SEM). Rezultati analize so prikazani v obliki stolpčnega diagrama na sliki 11.



Slika 11: Normalizirane vrednosti izražanja genov v subhondralni kostnini.

Najvišje izražen gen triade RANK/RANKL/OPG je bil gen za OPG, ki je bil hkrati najvišje izražen preiskovani gen v vzorcih subhondralne kostnine. Med vnetnimi citokini je najvišje izražen gen za TNF- α , najnižje pa gen za IL-10.

4.8.2 Medsebojna povezanost izražanja genov za RANK, RANKL in OPG

Odkritje sistema dejavnikov RANK/RANKL/OPG, ki v kostnem tkivu dokazano nadzoruje proces kostne resorpcije, je bilo ključno za razvoj osteoimunologije. Študije so pokazale,

da imajo glavno vlogo v procesu kostne resorpcije pravzaprav osteoblasti, ki lahko z uravnavanjem izražanja dejavnikov RANKL in OPG nadzorujejo proces nastanka osteoklastov (4, 10).

Med genoma za RANKL in OPG smo dobili statistično značilno pozitivno povezavo ($p = 0,005$ in $\rho = 0,586$). Povečano izražanje dejavnika RANKL je bilo povezano s povečanim izražanjem OPG. Sočasno izražanje dejavnikov RANKL in OPG, ki imata nasproten učinek na kostno resorpcijo, nakazuje, da njuno ustrezno razmerje v kostnem tkivu zagotavlja homeostazo skeleta. Izražanje gena za OPG je bilo bistveno večje kot RANKL, kar je bilo v skladu s pričakovanji, saj preiskovanci niso imeli prisotnih znakov patoloških sprememb kostnega tkiva. OPG je verjetno preprečil vezavo RANKL na njegov funkcionalni receptor RANK ter tako zaščitil kostno tkivo pred povečano kostno razgradnjo.

4.8.3 Ocena povezanosti med izražanjem genov za vnetne citokine in geni sistema dejavnikov RANK/RANKL/OPG

Med geni za vnetne citokine in geni triade RANK/RANKL/OPG smo dobili tri statistično značilne povezave, na podlagi katerih lahko potrdimo odkritja predhodnih raziskav, da sta kostni in imunski sistem med seboj povezana (preglednica XVII).

Preglednica XVII: Povezave med vnetnimi citokini in triado RANK/RANKL/OPG.

Korelacija med izbranimi genoma	p	Spearmanov korelacijski koeficient (ρ)	N
IL-1 β in OPG	0,016	-0,560	18
TNF- α in OPG	0,013	-0,572	18
RANK in IFN- γ	0,015	0,564	18

V različnih objavah navajajo, da TNF- α in IL-1 β povečata izražanje dejavnika OPG (5, 9, 18). Pri analizi rezultatov naše raziskave smo za par genov TNF- α in OPG ($\rho = -0,572$) ter IL-1 β in OPG ($\rho = -0,560$) dobili negativno povezavo, kjer je povečano izražanje enega gena povezano z zmanjšanim izražanjem drugega gena. Dobljena negativna povezava bi lahko bila posledica dejstva, da smo v naši analizi uporabili celotno subhondralno kostno tkivo, ki predstavlja kompleksno kostno mikrookolje. V preiskovanem kostnem tkivu so

poleg genov za IL-1 β , TNF- α in OPG prisotni še drugi dejavniki. Tako bi lahko dodaten dejavnik vplival na zmanjšano izražanje enega od genov v analiziranem paru in s tem na negativno povezavo. Večina podatkov o medsebojnih povezavah omenjenih genov v literaturi izhaja iz *in vitro* raziskav na izoliranih celicah, kjer se ustvari idealno okolje, v katerem ni prisotnih drugih dejavnikov oziroma je dodajanje drugih dejavnikov skrbno načrtovano. Tak sistem omogoča tudi več meritev izražanja genov v daljšem časovnem obdobju, medtem ko smo pri naši analizi spremljali stanje v kostnem tkivu po odvzemu tkiva iz trupel preiskovancev. Ena od razlag bi lahko bila tudi ta, da sta dobljeni povezavi značilni za določeno fiziološko stanje, v katerem se je preiskovano tkivo v času odvzema nahajalo. Kompenzacija tega stanja bi lahko vodila v negativno korelacijo med preiskovanima genoma. Pri interpretaciji teh rezultatov je zato zelo pomembno, v kakšnem okolju je bila raziskava izvedena. Razlike v izvedbi raziskav (*in vitro*, *ex vivo*) pomembno vplivajo na rezultate pridobljenih statistično značilnih povezav za gena TNF- α in OPG ter IL-1 β in OPG.

Statistično značilno povezavo smo dobili še med genoma za RANK in IFN- γ . RANKL se na površini predhodnikov osteoklastov veže na receptor RANK in sproži nastanek zrelih osteoklastov, ki razgrajujejo kostno tkivo. Neustrezno nadzorovan proces kostne resorpcije lahko vodi v izgubo kostne mase, zato so v kostnem tkivu pomembni tudi mehanizmi, ki omejujejo signaliziranje RANK/RANKL. Poleg OPG, ki veže RANKL, zavira prenos signala preko receptorja RANK tudi IFN- γ , ki sproži razgradnjo TRAF6. IFN- γ tako onemogoči vezavo TRAF6 na intracelularno domeno receptorja RANK. Vezava TRAF6 na intracelularno domeno receptorja RANK je ključnega pomena za prevajanje signala v osteoklastih in nastanek zrelih osteoklastov. Aktivirani limfociti T, ki izločajo RANKL, so hkrati tudi vir IFN- γ (7, 9, 10).

Pozitivna povezava med genoma za RANK in IFN- γ v analiziranih vzorcih bi lahko nakazovala, da povečano izražanje receptorja RANK spremlja povečano izražanje IFN- γ . IFN- γ tako prepreči prenos signala, ki ga posreduje RANKL, preko receptorja RANK v osteoklastih. IFN- γ je tako verjetno poleg OPG zaščitil kostno tkivo preiskovancev pred povečano kostno resorpcijo.

4.8.4 Povezava med izražanjem gena za IFN- γ in gena za TNF- α

In vivo študije kostnega tkiva pri ljudeh so pokazale, da lahko IFN- γ tudi stimulira proces osteoklastogeneze in kostno resorpcijo. Sproži proces predstavljanja antigenov limfocitom

T, kar vodi v aktivacijo limfocitov T, ki posledično tvorijo večje količine citokinov RANKL in TNF- α (4, 10). Resorptivni učinki IFN- γ prevladajo pri bolezenskih spremembah kostnega tkiva, ki jih lahko opazimo pri pomenopavzni osteoporozi, vnetju in bakterijskih okužbah (31).

Pri korelacijski analizi smo med genoma za IFN- γ in TNF- α dobili pozitivno povezavo ($p = 0,001$ in $\rho = 0,723$), kar pomeni, da je povečano izražanje gena za IFN- γ povezano s povečanim izražanjem gena za TNF- α . Korelacijska analiza nam sicer ne omogoča neposrednega sklepanja, da je povečano izražanje gena za TNF- α posledica delovanja IFN- γ (45). Kljub temu lahko trdimo, da opisana povezava skupaj s povezavo, ki smo jo dobili med izražanjem genov za IFN- γ in RANK, verjetno nakazuje bolj zapleten mehanizem delovanja IFN- γ v subhondralnem kostnem tkivu preiskovancev.

4.8.5 Medsebojna povezanost izražanja genov za IL-1 β , TNF- α in IL-6

Številne študije so dokazale, da je proces osteoklastogeneze odvisen od delovanja dejavnikov M-CSF in RANKL. Hkrati so pokazale, da lahko provnetni citokini IL-1 β , TNF- α in IL-6 dodatno stimulirajo proces osteoklastogeneze (53). Glavni končni učinek delovanja vseh treh citokinov je povečanje aktivnosti dejavnika RANKL, kar vodi v povečano kostno resorpcijo (5). Omenjeni citokini lahko tudi neodvisno od dejavnika RANKL spodbujajo diferenciacijo in aktivnost osteoklastov (53). V literaturi najdemo še podatke o medsebojnih povezavah med IL-1 β , TNF- α in IL-6. IL-1 in TNF- α v začetni stopnji osteoklastogeneze stimulirata proliferacijo in diferenciacijo predhodnikov osteoklastov. Oba citokina tudi stimulirata nastanek IL-6, ki skupaj z IL-11 pospeši nastanek zrelih osteoklastov (5, 54). Obstajajo tudi dokazi, pridobljeni na mišjih modelih, da so učinki TNF- α na tvorbo osteoklastov odvisni od delovanja IL-1 (20).

V analiziranih vzorcih subhondralne kostnine je prišlo do izražanja genov za vse tri provnetne citokine (IL-1 β , TNF- α in IL-6). Med izražanjem genov za IL-6 in TNF- α ter med izražanjem genov za IL-1 β in TNF- α obstajajo statistično značilne pozitivne povezave (preglednica XVIII).

Preglednica XVIII: Statistično značilne povezave med geni za IL-1 β , TNF- α in IL-6.

Korelacija med izbranimi genoma	p	Spearmanov korelacijski koeficient (ρ)	N
IL-6 in TNF- α	0,003	0,662	18
IL-1 β in TNF- α	0,000	0,851	18

Povečano izražanje provnetnih citokinov IL-1 β , TNF- α in IL-6 je povezano predvsem z različnimi patološkimi stanji v organizmu. Pri pacientih z revmatoidnim artritisom so v sinovialni tekočini prisotne povečane količine vseh treh citokinov, ki stimulirajo osteoklastogenezo v kostnem tkivu (8, 10). Pri pomanjkanju estrogena, ki uravnava nastanek IL-1, TNF- α , IL-6, receptorjev za IL-6 in IL-1 ter dejavnika M-CSF v kostnem tkivu in v hematopoetskih celicah, pride do povečane izgube kostne mase (10). Omenjeni citokini so prisotni tudi pri patogenezi OA (31). Študije celičnih kultur so pokazale, da osteoblasti iz sklepov pacientov z OA proizvajajo šestkrat več IL-6 in PGE₂ kot osteoblasti preiskovancev brez OA (3).

V analiziranih vzorcih smo lahko opazili visoko izražanje genov za IL-1 β in TNF- α v primerjavi z izražanjem ostalih genov (slika 11). Čeprav smo v raziskavi uporabili zdravo kostno tkivo, je glede na visoko povprečno starost preiskovancev (66,7 let) težko verjeti, da v kostnem tkivu nekaterih pacientov niso prisotne določene patološke spremembe. Visoka starost je eden izmed pomembnejših vzrokov za razvoj kostnih bolezni, kot je npr. osteoartraza (1). Visoko izražanje genov za IL-1 β in TNF- α bi tako lahko nakazovalo začetek razvoja patoloških procesov v kostnem tkivu preiskovancev. Iz pozitivne povezave med genoma za IL-1 β in TNF- α ter zelo podobnih vrednosti izražanja obeh genov bi se dalo tudi sklepati, da je njuno delovanje povezano.

4.8.6 Medsebojna povezanost izražanja gena za NOS3 in gena za TGF- β 1

Pri pregledu predhodnih objav nismo našli dokazov o povezavi med izražanjem genov za NOS3 in TGF- β 1 v kostnem tkivu, zato lahko trdimo, da je statistično značilna povezava med NOS3 in TGF- β 1 nova. Iz naše raziskave lahko zaključimo, da je povečano izražanje NOS3 povezano s povečanim izražanjem TGF- β 1. Oba dejavnika bi v kostnem tkivu preiskovancev lahko sodelovala v procesu popravljanja poškodb kostnega tkiva, saj lahko v literaturi zasledimo opis njune vloge pri tvorbi novega kostnega tkiva in novih žilnih povezav (55, 56).

Ob poškodbi kostnega tkiva pride pri začetnem vnetnem odzivu do povečanega izražanja iNOS, ki mu sledi povečano izražanje NOS3 (56). V steni krvnih žil NO, ki ga tvori NOS3, povzroči relaksacijo gladkih mišic, kar vodi v širjenje žil (11). Za razvoj in vzdrževanje homeostaze krvnih žil je pomemben tudi TGF- β , saj ima ključno vlogo pri diferenciaciji celic gladke mišičnine v steni krvnih žil. Nove krvne žile nastajajo s procesoma angiogeneze in vaskularizacije. Pri angiogenezi prihaja do razraščanja že obstoječih žilnih povezav, medtem ko je vaskularizacija proces nastanka krvnih žil *de novo*. Povečana prekrvavljenost je ključnega pomena pri učinkovitem celjenju poškodb kostnega tkiva, kjer pride na mestu poškodbe zaradi prekinjenih krvnih žilnih povezav do nastanka hipoksije. Nove krvne žile v začetni fazi celjenja kostnega tkiva omogočijo preskrbo tkiva s kisikom in drugimi hranilnimi snovmi, ki so potrebne za delovanje celic. V poznejših fazah pa olajšajo tvorbo novega kostnega tkiva s prihodom matičnih celic iz kostnega mozga, ki se preoblikujejo v osteoblaste (55).

5 SKLEP

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da smo uspeli potrditi dokaze predhodnih objav, da obstajajo povezave med kostnim in imunskim sistemom. Hkrati nam rezultati našega dela omogočajo oblikovanje naslednjih sklepov:

- V subhondralnem kostnem tkivu obstaja povezava med vnetnimi citokini in dejavniki sistema RANK/RANKL/OPG. Dobljene statistično značilne povezave med vnetnimi citokini in triado RANK/RANKL/OPG nakazujejo, da imunske celice in kostne celice interagirajo.
- Statistično značilni negativni povezavi smo dokazali med geni za IL-1 β in OPG ($\rho = -0,560$, $p = 0,016$) ter TNF- α in OPG ($\rho = -0,572$, $p = 0,013$). Dobljeni rezultati so v nasprotju z rezultati predhodnih *in vitro* študij, v katerih TNF- α in IL-1 β povečata izražanje dejavnika OPG. Pri tem moramo upoštevati, da so naši rezultati pridobljeni v kompleksnem mikrookolju kostnega tkiva (*ex vivo*).
- Statistično značilno pozitivno povezavo smo dobili med RANK in IFN- γ ($\rho = 0,564$, $p = 0,015$), s katero lahko potrdimo rezultate predhodnih študij, da poleg OPG, kostno tkivo pred povečano kostno resorpcijo ščiti tudi IFN- γ .
- S statistično značilnimi pozitivnimi povezavami med geni za vnetne citokine in drugimi dejavniki vnetja (NOS3 in TGF- β 1, IL-6 in IL-10, IL-6 in TNF- α , IFN- γ in IL-10, IFN- γ in TNF- α , IL-1 β in TNF- α , IL-10 in TNF- α , IL-6 in IFN- γ ter IL-10 in IL-1 β) smo pokazali na kompleksnost kostnega mikrookolja, kjer imajo poleg vnetnih citokinov pomembno vlogo tudi drugi dejavniki.

Rezultati našega dela so pomembni, ker so pridobljeni na vzorcih humane subhondralne kostnine, ki v nasprotju z *in vitro* pogoji predstavlja kompleksno kostno mikrookolje. Raziskava nam tako omogoča vpogled v povezave med izmerjenimi geni v okolju, kjer na izražanje preiskovanih genov vplivajo še številni drugi citokini, rastni dejavniki in hormoni.

Povezanost izražanja vnetnih citokinov s sistemom RANK/RANKL/OPG v subhondralnem kostnem tkivu preiskovancev brez prisotnih znakov bolezni kosti in

sklepov bi lahko nakazovala na zgodnje patološke procese v kostnem tkivu. Ker vnetni citokini dokazano vplivajo na delovanje sistema dejavnikov RANK/RANKL/OPG in tako posredno regulirajo proces kostne resorpcije, bi lahko v kostnem tkivu preiskovancev povzročili preoblikovanje subhondralnega kostnega tkiva. Preoblikovanje subhondralnega kostnega tkiva je ena izmed značilnosti razvoja osteoartroze.

Raziskovanje povezav med kostnim in imunskim sistemom je ključnega pomena za razumevanje nastanka osteoartroze in drugih kostnih bolezni. Ker je zdravljenje osteoartroze danes usmerjeno predvsem v blaženje posledic bolezni, osteoimunologija predstavlja velik potencial za oblikovanje terapij, ki bi zavirale nastanek kostnih sprememb ter novih, učinkovitejših terapij za zdravljenje bolezni.

6 LITERATURA

1. Sharma AR, Jagga S, Lee SS, Nam JS: Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 19805-19830.
2. Barlič A, Maličev E: Zdravljenje poškodovanega sklepnega hrustanca. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 141-144.
3. Burr DB, Gallant MA: Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 665-673.
4. Mori G, D'Amelio P, Faccio R, Brunetti G: The interplay between the bone and the immune system. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 1-16.
5. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y: IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 49-60.
6. O'Brien CA: Control of RANKL gene expression. *Bone* 2010; 46: 911-919.
7. Troen BR: Molecular mechanism underlying osteoclast formation and activation. *Experimental Gerontology* 2003; 38: 605-614.
8. Nakashima T, Takayanagi H: Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol* 2009; 29: 555-567.
9. Walsh MC, Choi Y: Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front Immunol* 2014; 5:511.
10. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y: Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008; 29 (4): 403-440.
11. van't Hof RJ, Ralston SH: Nitric oxide and bone. *Immunology* 2001; 103: 255-261.
12. Mencej Bedrač S, Marc J: Sistem RANKL/RANK/OPG – nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze. *Farm Vest* 2008; 59: 175-178.
13. Kristl J: Interlevkini in interferoni. v *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. izd., Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 369-428.
14. Arron JR, Choi Y: Bone versus immune system. *Nature* 2000; 408: 535-536.
15. Danks L, Takayanagi H: Immunology and bone. *J Biochem* 2013; 154 (1): 29-39.
16. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T: T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000; 408: 600-605.

17. Zorc Pleskovič R, Milutinović Živin A, Petrovič D: Histologija: učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2006: 55-62.
18. Leibbrandt A, Penninger JM: RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 123-150.
19. Agas D, Marchetti L, Capitani M, Sabbieti MG: The dual face of parathyroid hormone and prostaglandins in the osteoimmune system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305: E1185-E1194.
20. Schett G: Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest* 2011; 41 (12): 1361-1366.
21. Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S: The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Progress in Lipid Research* 2008; 47: 107-126.
22. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T: Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005; 208: 181-193.
23. Evans KE, Fox SW: Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol* 2007; 8:4.
24. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W: Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* 2005; 26 (6): 743-774.
25. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC: Review Prostaglandins in bone: bad cop, good cop?. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21 (5): 294-301.
26. Haversath M, Catelas I, Li X, Tassemeier T, Jäger M: PGE₂ and BMP-2 in bone and cartilage metabolism: 2 intertwining pathways. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90: 1434-1445.
27. Wimalawansa SJ: Chapter 59-Skeletal effects of nitric oxide: novel agent for osteoporosis. v *Principles of bone biology*, 3rd ed., Academic Press/Elsevier, San Diego, Calif., 2008: 1273, 1275-1310.
28. Zheng H, Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P: RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. *J Biol Chem* 2006; 281 (23): 15809-15820.

29. Pal M, Krajnc I, Potočnik U: Osteoarthritis: patogeneza in farmakološko zdravljenje. *Med Meseč* 2008; 4: 88-93.
30. Mahjoub M, Berenbaum F, Houard X: Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos Int* 2012; 23 (Suppl 8): S841-S846.
31. Zupan J, Jeras M, Marc J: Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med* 2013; 23 (1): 43-63.
32. Bregar M: Novejša spoznanja na področju etiopatogeneze in zdravljenja primarne osteoartroze. *Zdrav Vestn* 2002; 71: 235-239.
33. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T: The RIN: an integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006; 7:3.
34. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. Real-Time PCR Brochure. Qiagen® 2010; 1-64.
35. Real-Time PCR: from theory to practice. Invitrogen™ 2008.
36. SYBR® Select Master Mix User Guide. Life Technologies™ 2012; 1-38.
37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (dostopano: april 2015).
38. Primer-BLAST. Dosegljivo na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
39. RTPrimerDB. Dosegljivo na: <http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/search.php>.
40. Rogan DF, Cousins DJ, Santangelo S, Ioannou PA, Antoniou M, Lee TH, Staynov DZ: Analysis of intergenic transcription in the human IL-4/IL-13 gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (8): 2446-2451.
41. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Byrne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WJ, Fowler MB: Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996; 93 (6): 1087-1094.
42. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002; 3(7): research0034.
43. Jeklar K: Izražanje genov za antioksidativne encime v vzorcih hrustanca, Magistrska naloga, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2014.

44. Penič A: Izražanje genov za antioksidativne encime v vzorcih subhondralne kostnine, Magistrska naloga, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo 2014.
45. Adamič Š: Temelji biostatistike, 2.izd., Medicinska fakulteta, Ljubljana, 1989: 113-122.
46. Šuster Erjavec H, Južnik Rotar L: Analiza podatkov s SPSS, 2. izd., Fakulteta za komercialne in poslovne vede, Celje, 2013: 46-58, 83-95.
47. Valasek MA, Repa JJ: The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151-159.
48. Slanc P: Genska informacija in kako do nje. v *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1. izd., Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 55-58.
49. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215-220.
50. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55 (4): 611-622.
51. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A: Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313 (4): 856-862.
52. Kozera B, Rapacz M: Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 2013; 54 (4): 391-406.
53. Redlich K, Smolen JS: Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 234-250.
54. Pal M, Krajnc I: Osteoimunologija: RANKL/RANK/OPG citokinski sistem. *Med Meseč* 2008; 4: 94-97.
55. Pountos I, Panteli M, Panagiotopoulos E, Jones E, Giannoudis PV: Can we enhance fracture vascularity: what is the evidence?. *Injury* 2014; 45 (Suppl 2): S49-S57.
56. Wimalawansa SJ: Nitric oxide and bone. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192: 391-403.

7 PRILOGE

7.1 Priloga 1: Test normalnosti porazdelitve izražanja preiskovanih genov v subhondralni kostnini

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
COX2	,212	18	,032	,912	18	,093
PTGER4	,172	18	,172	,839	18	,006
TGFB1	,123	18	,200*	,984	18	,980
IL6	,092	18	,200*	,966	18	,712
IFNG	,215	18	,028	,771	18	,001
IL1B	,259	18	,002	,636	18	,000
IL10	,251	18	,004	,760	18	,000
TNFA	,229	18	,014	,759	18	,000
NOS3	,167	18	,198	,949	18	,414
RANK	,163	21	,151	,891	21	,024
RANKL	,212	21	,015	,788	21	,000
OPG	,319	21	,000	,551	21	,000

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

7.2 Priloga 2: Preglednica izmerjenih vrednosti izražanja preiskovanih in referenčnih genov v posameznih vzorcih subhondralne kostnine

VZORCI	OPG	iNOS	COX-2	B2M	PTGER4	TGF- β 1	GAPDH
sb21	6,352189	/	0,587198	1,19358	1,6465779	2,313931	0,9387266
sb22	10,52968	/	16,0853	2,146234	2,8293031	5,820758	2,0206962
sb23	12,53379	/	4,161419	2,773493	3,98438	7,170847	1,7783126
sb25	12,39492	/	5,04326	3,450616	6,9532425	11,53813	2,0578004
sb26	15,40604	/	13,03021	5,534421	20,244139	14,39816	2,1439105
sb27	4,30628	/	5,296528	1,758739	3,1342938	4,176689	1,2796298
sb28	0,435551	/	6,23095	3,536042	5,2181523	3,226865	3,3922072
sb30	17,38291	/	7,524884	0,766048	0,9683876	3,035249	1,0449225
sb32	9,806653	/	16,62169	3,336404	2,8811239	7,896134	2,128419
sb33	3,113824	/	35,56168	4,127472	6,4886281	6,723461	2,1159238
sb34	13,06065	/	17,02306	3,406913	9,6606032	14,5154	2,009134
sb35	6,300324	/	7,650977	3,875214	5,1827917	11,8572	1,8702296
sb36	6,911499	/	7,151728	2,964728	2,0046485	9,726845	1,4323559
sb37	9,627684	/	8,350447	3,801094	6,5288426	12,9202	1,6048612
sb38	5,611496	/	2,354504	3,239908	9,6443517	17,4629	1,1274131
sb40	3,483388	/	29,24848	4,736608	6,6356407	7,047632	3,1043063
sb42	4,320475	/	9,963558	5,536736	5,2466916	12,56582	3,2006377
sb44	15,99195	/	5,230288	4,584502	8,1746494	10,93786	1,936955
sb45	13,41592	/	7,941952	3,934767	9,6060526	11,54325	2,1436411
sb47	5,369461	/	2,073411	2,863206	2,8816728	5,312853	2,0714517
sb48	5,695876	/	21,7579	5,583262	9,2374072	10,46241	3,2562873

se nadaljuje

nadaljevanje

VZORCI	IL-6	IFN- γ	IL-1 β	IL-10	TNF- α	NOS3
sb21	1,712065	2,563263	0,511326	0	0	2,202059
sb22	0,686486	3,227758	9,97239	0,263078	2,170369	1,929298
sb23	3,664349	7,576719	1,332443	0,530719	7,865014	3,564358
sb25	2,264278	2,81455	0,371014	0	2,459064	3,668799
sb26	7,490811	17,22588	2,588245	3,591702	9,98653	5,22755
sb27	1,617878	2,964586	4,14	0,210652	0,868523	1,962433
sb28	11,78726	4,591419	27,17857	3,841598	24,4135	1,532494
sb30	0,666308	0,433888	2,28082	0	0,909887	0,679236
sb32	2,709263	7,464275	2,689563	1,588349	2,690459	3,06337
sb33	4,973204	3,620819	32,28038	0,315966	7,609892	1,820004
sb34	5,281656	11,22356	10,10727	0,865627	10,19442	6,555882
sb35	6,382537	31,26774	21,14942	13,54501	45,34109	6,179019
sb36	6,867204	8,216471	80,25029	5,841221	34,31785	5,975821
sb37	6,204769	29,35111	19,61107	11,32929	48,46374	4,817077
sb38	2,131189	13,97814	0,759498	0,386276	12,90106	4,994148
sb40	4,958248	10,71879	25,69615	3,320581	23,08994	2,36839
sb42	9,174093	13,17258	12,24791	13,60108	20,23653	6,378272
sb44	5,291276	2,36199	0,260557	0,906678	0	4,406062
sb45	3,387415	2,831097	0,608228	0,406794	1,061836	3,944302
sb47	6,141682	1,655168	1,197247	1,165069	0,399585	4,929494
sb48	7,744056	27,07585	53,87512	6,929251	94,30589	3,336995

7.3 Priloga 3: Spearmanova korelacijska analiza za preiskovane gene v subhondralni kostnini

		COX-2	PTGER4	TGFB1	IL6	IFNG	IL1B	IL10	TNFA	NOS3	RANK	RANKL	OPG
COX-2	ρ	1,000	-,117	-,073	-,364	,053	,395	-,144	,217	-,387	-,245	-,100	,038
	p	.	,645	,773	,137	,836	,104	,569	,387	,113	,328	,693	,880
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
PTGER4	ρ	-,117	1,000	,344	,100	,071	-,282	-,065	-,123	,193	,366	-,158	,026
	p	,645	.	,163	,693	,779	,257	,797	,627	,443	,135	,531	,919
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
TGFB1	ρ	-,073	,344	1,000	,238	,333	-,061	,266	,148	,752**	,327	,445	,366
	p	,773	,163	.	,341	,176	,810	,286	,559	,000	,185	,064	,135
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
IL6	ρ	-,364	,100	,238	1,000	,587*	,509*	,793**	,662**	,401	,304	-,331	-
	p	,137	,693	,341	.	,010	,031	,000	,003	,099	,219	,179	,036
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
IFNG	ρ	,053	,071	,333	,587*	1,000	,536*	,777**	,723**	,511*	,564*	-,265	-,290
	p	,836	,779	,176	,010	.	,022	,000	,001	,030	,015	,287	,243
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
IL1B	ρ	,395	-,282	-,061	,509*	,536*	1,000	,564*	,851**	-,082	-,034	-,327	-
	p	,104	,257	,810	,031	,022	.	,015	,000	,748	,893	,185	,016
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
IL10	ρ	-,144	-,065	,266	,793**	,777**	,564*	1,000	,800**	,315	,479*	-,214	-
	p	,569	,797	,286	,000	,000	,015	.	,000	,202	,044	,394	,024
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
TNFA	ρ	,217	-,123	,148	,662**	,723**	,851**	,800**	1,000	,057	,301	-,311	-
	p	,387	,627	,559	,003	,001	,000	,000	.	,823	,224	,209	,013
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
NOS3	ρ	-,387	,193	,752**	,401	,511*	-,082	,315	,057	1,000	,467	,294	,331
	p	,113	,443	,000	,099	,030	,748	,202	,823	.	,050	,236	,179
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
RANK	ρ	-,245	,366	,327	,304	,564*	-,034	,479*	,301	,467	1,000	-,083	,012
	p	,328	,135	,185	,219	,015	,893	,044	,224	,050	.	,720	,960
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	21	21	21
RANKL	ρ	-,100	-,158	,445	-,331	-,265	-,327	-,214	-,311	,294	-,083	1,000	,586**
	p	,693	,531	,064	,179	,287	,185	,394	,209	,236	,720	.	,005
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	21	21	21
OPG	ρ	,038	,026	,366	-	-,290	-	-	-	,331	,012	,586**	1,000
	p	,880	,919	,135	,496*	,243	,016	,024	,013	,179	,960	,005	.
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	21	21	21

ρ – Spearmanov korelacijski koeficient

p – Dvo-stranska stopnja značilnosti (2-stransko)

N – število preiskovancev

** Povezanost je značilna pri 0.01 (2-stransko).

* Povezanost je značilna pri 0.05 (2-stransko).