Povezanost polimorfizama osteoprotegerin gena i nastanka osteoporoze kod postmenopauzalnih žena

Kuna, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:713849

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Lucija Kuna

Povezanost polimorfizama osteoprotegerin gena i nastanka osteoporoze kod postmenopauzalnih žena

Diplomski rad

Osijek, 2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski znanstveni studij biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Povezanost polimorfizama osteoprotegerin gena i nastanka osteoporoze kod postmenopauzalnih žena

Lucija Kuna

Rad je izrađen na Zavodu za mineralni metabolizam
Mentor: Prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schon
Komentor: Doc. dr. sc. Martina Smolić

Kratak sažetak diplomskog rada: Osteoporoza je česta bolest uslijed koje dolazi do smanjenja koštane mase. Nedostatak u mikroarhitekturi koštanog tkiva negativno utječe na čvrstoću kostiju te dovodi do povećanog rizika od prijeloma kostiju. Osteoprotegerin gen (OPG) vrlo je bitan u genetičkoj kontroli koštane mase te ima vrlo značajnu ulogu u nastanku osteoporoze. Najčešći tip polimorfizma pripada SNP polimorfizmu. Otkriće receptora aktivatora nuklearnog faktora kb (RANK)/RANK ligand RANKL/OPG pridonio je boljem razumijevanju načina regulacije formacije i resorpcije kosti. RANK-RANKL-OPG sustav mogao bi biti usmjeren kao nova strategija liječenja bolesti.

Broj stranica: 48
Broj slika: 16
Broj tablica: 9
Broj literaturnih navoda: 65
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: osteoporoza, osteoprotegerin gen, postmenopauzalna dob, mineralna gustoća kostiju (BMD), RANK/RANKL/OPG sustav, polimorfizam

Datum obrane: 24.10.2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schon
2. Prof. dr. sc. Marija Heffer-Lauc
3. Doc. dr. sc. Martina Smolić

Rad je pohranjen u : knjižnici odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **MS thesis**
Department of Biology
Graduate Study of Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific field: Biology

Association of osteoprotegerin gene polymorphisms and osteoporosis in postmenopausal women

Lucija Kuna

Thesis performed: Institute of Mineral Metabolism
Supervisor: Prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schon
Co - supervisor: Doc. dr. sc. Martina Smolić

Short abstract: Osteoporosis is a common disease characterized by low bone mass. Reduced microarchitecture of bone tissues affects bone strength leading to an increased risk of bone fractures. Osteoprotegerin gene (OPG) is an important candidate gene of osteoporosis and may have an important role in development of osteoporosis. SNP polymorphism is the most common type of polymorphism. Discovery of the receptor activator of nuclear factor RANK/RANK ligand RANKL/OPG contributed to understanding of bone formation and resorption. Targeting of RANK-RANKL-OPG system may represent a new strategy in the treatment of bone diseases.

Number of pages: 48
Number of figures: 16
Number of tables: 9
Number of references: 65
Original in: Croatian

Key words: osteoporosis, osteoprotegerin gene, postmenopausal age, bone mineral desity (BMD), RANK/RANKL/OPG system, polymorphism

Date of the thesis defense: 24.10.2013.

Reviewers:

1. Prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schon
2. Prof. dr. sc. Marija Heffer-Lauc
3. Doc. dr. sc. Martina Smolić

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Elizabeti Has-Schon na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.
Ovaj rad je izrađen na Medicinskom fakultetu u Osijeku te se ovom prilikom zahvaljujem svim djelatnicima na iskazanoj strpljivosti, razumijevanju i stručnoj pomoći. Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Martini Smolić na izrazito ugodnoj suradnji i pomoći tijekom pisanja diplomskog rada.

Veliko hvala mojim prijateljicama Marijani i Ivani na nesebičnoj pomoći oko grafičkih i tehničkih detalja diplomskog rada.
Aniti i Peri hvala što su bili uz mene i „trpjeli" me kroz sve godine studiranja.

Najveće hvala ide mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje, podržavali me i vjerovali u mene do samog kraja.
Ovaj rad posvećujem tati, zna on zašto.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Koštana biologija 1
1.1.1. Koštana međustanična tvar 1
1.1.2. Osteoblasti 1
1.1.3. Osteoklasti 2
1.1.4. Koštano preoblikovanje 3
1.2. Osteoporoza 4
1.2.1. Epidemiologija osteoporoze 5
1.2.2. Patofiziologija i klinička slika osteoporoze 6
1.3. Biljezi koštane pregradnje i razgradnje u osteoporozi 8
1.3.1. Biljezi pregradnje kostiju 9
1.3.2. Biljezi razgradnje kostiju 10
1.4. Genetska podloga osteoporoze 12
1.4.1. Osteopetroza 13
1.5. OPG-RANK-RANKL 13
1.5.1. OPG-RANKL KOMPLEKS 15
1.6. Genetski polimorfizmi OPG gena 16
1.7. Cilj istraživanja 17

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Ustroj studije i ispitanici 18
2.1.1. Mjerenje mineralne gustoće kostiju-denzitometrija 18
2.2. DNA analiza 19
2.2.1 Izolacija DNA iz krvi ili tjelesnih tekućina 19
2.2.2. Purifikacija DNA 22
2.2.3. PCR metoda (Polimerase chain reaction) 23
2.2.4.RFLP metoda (Restriction fragment length polymorphism) 25
2.2.5. Određivanje OPG A163G , G209A, T245G i G1181C polimorfizama 26
2.2.6. Izrada agaroznog gela 26
2.3. Biokemijska analiza 28
2.3.1. Mjerenje biljega koštane pregradnje 28
2.4. Statistička obrada podatka 28

3. REZULTATI

3.1. Kliničke karakteristike i mineralna gustoća kostiju ispitanica 29
3.2. Distribucija frekvencije genotipova AA, AG i GG A163G OPG polimorfizma 30

postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze
3.3. Distribucija frekvencije genotipova TT, TG I GG T245G OPG polimorfizma postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze 32
3.4. Povezanost mineralne gustoće kostiju (BMD) s A163G i T245G OPG polimorfizmima kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze 33
3.4.1. Mineralna gustoća kostiju AT, AG i GG genotipova OPG A163G polimorfizma 34
3.4.2. Mineralna gustoća kostiju TT, TG i GG genotipova OPG T245G polimorfizma 35
3.5. Razina biokemijskih markera koštane pregradnje postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze 37

4. RASPRAVA 38

5. ZAKLJUČCI 41

6. LITERATURA 42

1. UVOD

1.1. Koštana biologija

Kost je vezivno tkivo koje se sastoji od specifičnih stanica; osteoblasta koji sudjeluju u stvaranju međustanične tvari (odgovorne su za proizvodnju kolagenih vlakana elastične mreže koštane tvari), osteocita (osteoblasti zarobljeni unutar praznina) i osteoklasta koji su značajni u razgradnji međustanične tvari (razgrađuju elastičnu mrežu koštane tvari, uklanjaju dotrajale dijelove koštane tvari i stvaraju prostor osteoblastima za stvaranje nove, Tat i sur., 2009).

1.1.1. Koštana međustanična tvar

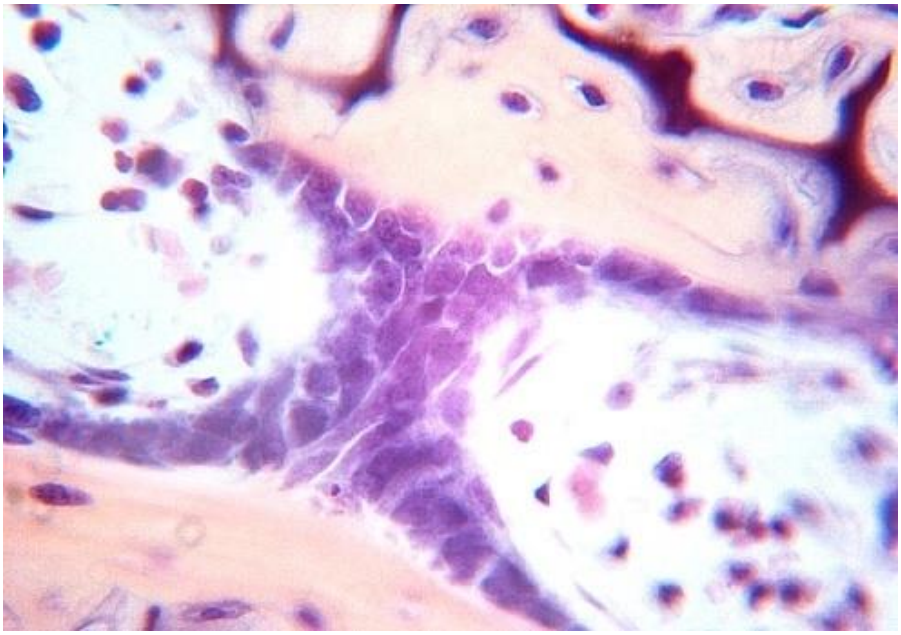
Organski dio međustanične tvari najvećim dijelom čine bjelančevinska vlakna kolagena tipa I, dok je udio ostalih bjelančevina mnogo manji i ne prelazi 10%. Najveći dio anorganske faze (približno 90%) tvore kristali hidroksiapatita - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, koji su uklopljeni u mrežu kolagenskih vlakana. Ostale koštane bjelančevine (proteoglikani, sijaloproteini i glikoproteini) reguliraju umrežavanje kolagenskih vlakana i kristala hidroksiapatita, a važni su i za povezivanje koštanih stanica s međustaničnom tvari (Vigorita VJ., 1998).

1.1.2. Osteoblasti

Glavne zadaće osteoblasta su stvaranje i odlaganje koštane međustanične tvari te regulacija djelovanja osteoklasta (Ducy i sur., 2000). Osteoblasti su kubične stanice okruglaste stanične jezgre, smještene na koštanoj površini u jednom sloju. Budući da im je glavna zadaća stvaranje bjelančevina međustanične tvari, osteoblasti imaju izražena Golgijeva tijela i hrapavu endoplazmatsku mrežicu (Mackie EJ., 2003). Važna biokemijska odlika im je bogati izražaj enzima alkalne fosfataze (ALP; engl. alkaline phosphatase, Aubin i sur., 2000). Proliferaciju i diferencijaciju stanica osteoblastne loze nadziru i vode brojni transkripcijski čimbenici, čimbenici rasta i hormoni; Runx2, LR5, PTH i bjelančevine obitelji BMP (Katagiri i Takahashi., 2002).

Sudbina zrelog osteoblasta je trojaka: može postati obložna stanica ili osteocit, a može i odumrijeti apoptozom (Weinstein i Manolagas., 2000).

Osteoblasti nisu samo stanice odgovorne za stvaranje kosti nego imaju i brojne druge uloge. Prije svega, osteoblasti potpomažu hematopoezu izgrađujući okoliš koji pogoduje krvotvornim matičnim stanicama. Naposlijetku, osteoblasti na svojoj površini izražavaju i molekulu angiopoietina-1 koja održava krvotvorne matične stanice u stanju mirovanja (Arai i sur., 2004). Osteoblasti bi, čini se, mogli biti uključeni i u imunosni odgovor. Nakon susreta s bakterijama osteoblasti izlučuju niz upalnih citokina, čimbenika poticanja kolonija i kemokina koji zajedno mogu djelovati zaštitno, privlačeći makrofage, neutrofile i limfocite T (Marriott I., 2004).



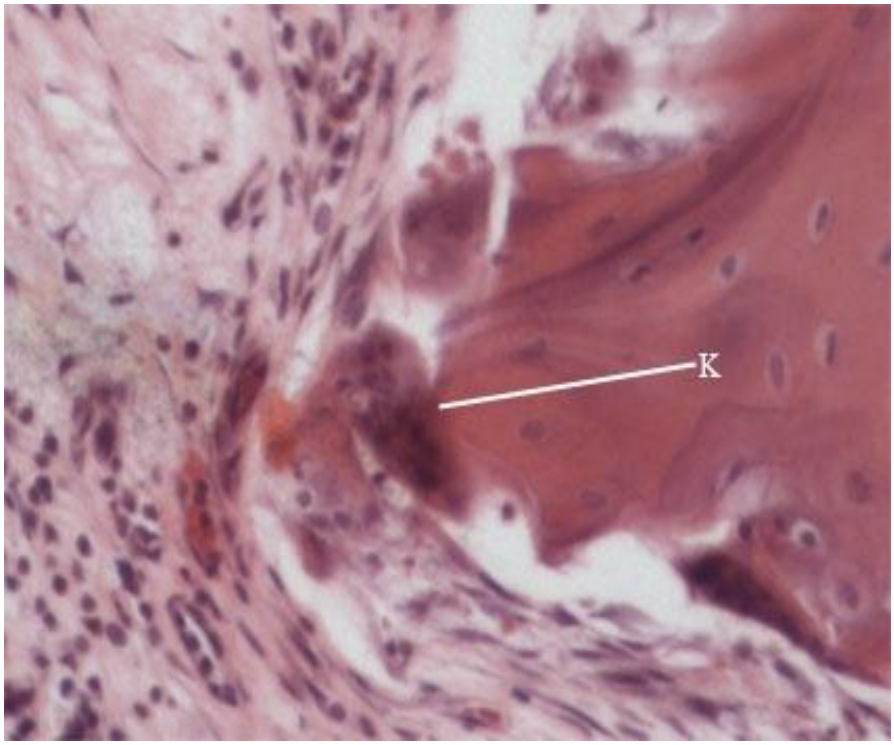
Slika 1. Mikroskopski prikaz osteoblasta. Izvor: Web 1

1.1.3. Osteoklasti

Osteoklasti su stanice s više jezgara, nastale spajanjem prethodničkih stanica koje pripadaju monocitno/makrofagnoj lozi (Teitelbaum., 2000). Smatra ih se glavnim, ako ne i jedinim stanicama koje mogu resorbirati kost, ali je nedavno pokazano da kost mogu razgraditi i neke stanice mezenhimskog podrijetla (Pap i sur., 2003). Morfološki su osteoklasti vrlo osebujne stanice. Prilično su velike, ponekad i toliko da mogu biti vidljivi i golim okom te sadrže velik broj jezgara (čak do stotinu). Stanično tijelo je polarizirano te je stanična membrana uz stranu koja priliježe na kost obilno nabrana (engl. ruffled border). Priljubljivanjem stanične

membrane za kost stvara se dobro zatvoreno područje koje možemo smatrati „vanjskom vakuolom” (Boyle i sur., 2003).

Diferencija osteoklasta odvija se na ili u neposrednoj blizini koštane površine, u bliskom dodiru prethodnika osteoklasta sa stanicama osteoblastne loze koje su izvor ključnih osteoklastnih čimbenika rasta. Prethodničke stanice na koštanu površinu dolaze iz krvi, a mogu se sresti i u slezeni te u peritonealnoj šupljini (Hayashi i sur., 1997). Djelovanjem čimbenika poticanja makrofagnih kolonija (M-CSF; engl. macrophage-colony stimulating factor) te liganda receptora za pobudu jezgrenog čimbenika LB (RANKL; engl. receptor activator of nuclear factor "B ligand) dolazi do aktiviranja gena znakovitih za osteoklastnu lozu te poprimanja fenotipa zrelog osteoklasta (Boyle i sur., 2003).



Slika 2. Mikroskopski prikaz osteoklasta. Izvor: Web 2

1.1.4. Koštano preoblikovanje

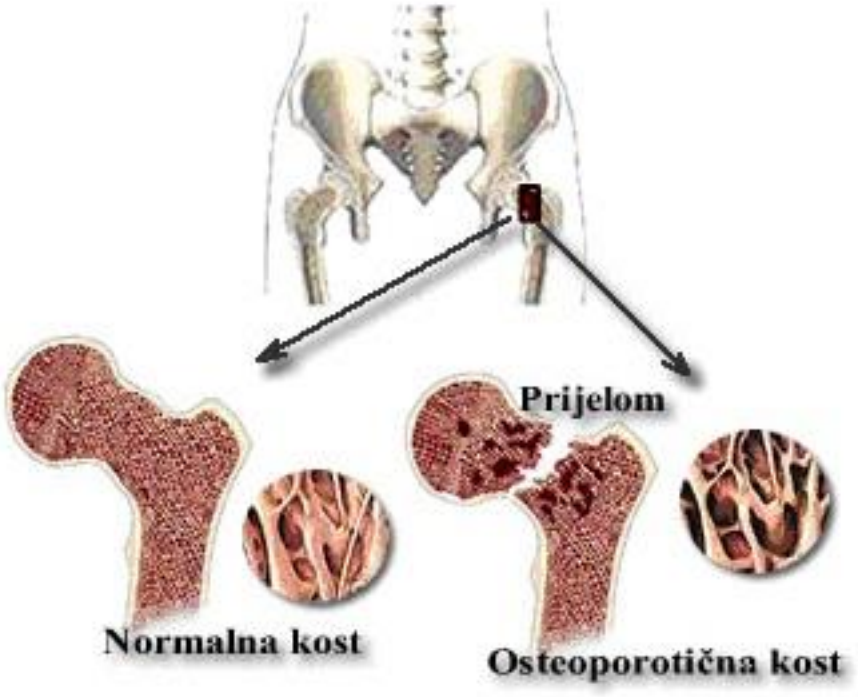
Kost je neprestano aktivno, živo tkivo. Koštano tkivo se neprestano preoblikuje i to na jedan do dva milijuna mjesta u kosturu prosječna odrasla čovjeka. Pri tome, osteoklastima treba približno tri tjedna da razgrade kost, dok će osteoblasti za izgradnju istog volumena kosti „potrošiti” približno četiri mjeseca (Rodan i Martin., 2000).

Koštano preoblikovanje odvija se u mikroskopskim tvorbama sličnim tunelu, nazvanim „odjeljcima koštanog preoblikovanja" (engl. bone remodelling compartment). Na početku ciklusa preoblikovanja, obložne stanice, koje prekrivaju površinu metabolički neaktivne kosti, bivaju odvojene od same koštane površine te od osteocita s kojima su inače u dodiru. Ispod svoda kojeg oblikuju obložne stanice, osteoklasti najprije razgrađuju kost, a za njima slijede osteoblasti i stvaraju neovapnjelu koštanu međustaničnu tvar, osteoid, koji postupno ovapnjuje (Hauge i sur., 2001 ; Compston JE., 2002).

Za održavanje normalne mikroskopske koštane građe, odnosno koštanoga zdravlja, nužno je da razgradnja i stvaranje kosti tijekom preoblikovanja budu pomno usklađeni. Pregradnja kosti odvija se u dvije faze. Prva je razgradnja (resorpcija), za koju su odgovorne specijalizirane koštane stanice osteoklasti koji djeluju na površini koštanih gredica. Druga faza je izgradnja kosti pod utjecajem osteoblasta koji udubine nastale razgradnjom kosti ispunjavaju kolagenom. U mrežu kolagenih vlakana odlažu se minerali, te ciklus koštane pregradnje završava mineralizacijom kosti. Potpuna ravnoteža u procesu koštane pregradnje postoji onda kada se razgrađena kost u potpunosti nadomjesti novim koštanim tkivom. S obzirom da je izgradnja kosti daleko sporiji proces, idealnu ravnotežu teško je ostvariti. Stoga se pri intenzivnoj pregradnji kost neizbježno gubi (Theoleyre i sur., 2004).

1.2. Osteoporoza

Osteoporoza je bolest koju karakterizira smanjenje koštane mase, poremećaj njezine strukture te posljedično nedostatna mineralizacija kosti što konačno rezultira smanjenjem njezine čvrstoće i elastičnosti te povećanom mogućnošću i učestalošću prijeloma. Do bolesti dolazi kada se više kosti razgradi nego što osteoblasti mogu nadoknaditi. Koštana masa se izgrađuje uglavnom do tridesete godine, a zatim, poslije četrdesete godine, postepeno se smanjuje (po 1% godišnje). Osteoporoza može biti primarna i sekundarna (Kanis i sur., 1994).



Slika 3. Smanjenje gustoće kostiju nastaje iz razloga što osteoblasti ne mogu popuniti šupljine koje stvaraju osteoklasti. Izvor: Web 3

Postmenopauzalna osteoporoza u žena daleko je najčešći oblik te bolesti. Nastaje zbog smanjenja lučenja ženskih spolnih hormona, estrogena, iz jajnika, koji s godinama prirodno gube svoje dotadašnje funkcije. Estrogeni svojim djelovanjem potiču izgradnju kosti, a kako se njihovo lučenje nakon menopauze smanjuje, omjer pregradnje kosti pomiče se na stranu razgradnje, što rezultira osteoporozom.

1.2.1. Epidemiologija osteoporoze

Podatci iz epidemioloških istraživanja pokazuju kako je učestalost osteoporoze veća u azijskim zemljama u odnosu na europsko i sjevernoameričko stanovništvo bijele rase, u kojih prevalencija iznosi 10% do 15%.

Osteoporoza je najčešća metabolička bolest kostiju, koja se zbog svoje velike učestalosti a neprimjetne simptomatologije naziva i „tiha epidemija“. Prijelomi kostiju najozbiljnija su komplikacija osteoporoze a najčešći su na kralješcima, kuku i podlaktici. Iako se većina istraživanja o osteoporozi temelji na denzitometrijskim nalazima, u nekima je primjenjivana

metoda dvoenergetske apsorpciometrije x-zraka (DXA) a u drugima samo ultrazvučna denzitometrija (Cvijetić - Avdagić i sur., 2007).

Učestalost osteoportskih prijeloma raste s dobi. Nakon 50. godine života zamjetno je povećanje prijeloma podlaktice, nakon 60. godine vertebralnih prijeloma, a nakon 70. godine prijeloma kuka. Kod svih prijeloma incidencija je veća u žena u odnosu na muškarce. (Williams i Willkins; 1999).

Treba napomenuti kako je u Hrvatskoj prije 30 godina provedena i prva epidemiološka studija u svijetu koja je pokazala značenje unosa kalcija u stvaranju koštane mase. U srednjoj istarskoj regiji je prosječan unos kalcija hranom u stanovništvu bio oko dva puta manji u odnosu na stanovnike podravskih sela. Tako je u istarskom stanovništvu nađena i značajno veća stopa prijeloma kuka u odnosu na podravsko ruralno stanovništvo (Matković i sur., 1979).

Kao kod većine kroničnih nezaraznih bolesti sa prevencijom osteoporoze je najbolje započeti što ranije, čak u dječjoj ili adolescentnoj dobi. Primarna prevencija odnosi se na reguliranje tjelesne težine, prestanak pušenja, primjerenu tjelesnu aktivnost koja je nužna za ostvarivanje prikladne vršne koštane mase te njezino očuvanje i regulacija prehrane (primjereni unos kalcija i vitamina D).

Sekundarna prevencija obuhvaća mjere za smanjenje prevalencije bolesti, kojima se nastoji prepoznati osobe s povećanim rizikom obolijevanja te otkriti bolest u početnom stadiju (denzitometrija skeleta). Tercijarna prevencija odnosi se na smanjenje komplikacije bolesti, edukaciju i zdravstveno prosvjećivanje bolesnika (Cvijetić - Avdagić i sur., 2007).

1.2.2. Patofiziologija i klinička slika osteoporoze

Patofiziologija

U osnovi patofiziologije osteoporoze dolazi do poremećaja između resorpcije i formiranja nove kosti. Kod osteoporoze, resorpcija kosti dominira u odnosu na formiranje što dovodi do gubitka koštane mase i povećava rizik od prijeloma, deformacije i kronične boli.

Poremećaj ravnoteže između formiranja nove i resorpcije stare kosti može nastati kao rezultat jednog ili većeg broja slijedećih faktora:

-Povećanje koštane resorpcije na razini koštane jedinice remodeliranja (nepotpune izgradnje).

-Smanjenje formiranja nove kosti na razini koštane jedinice remodeliranja.

Klinička slika

Što je zapravo problem kod osteoporoze?

Prekomjerna razgradnja kosti tj. njezinog organskog i anorganskog dijela, čini ih i manje stabilnima zbog čega se deformiraju te ujedno gube i na čvrstoći pa su sklone lomovima, to jest nastanku fraktura. Bolest je zapravo podmukla, tiha, jer se očituje tek u obliku prijeloma kosti, a do tada je uglavnom neprepoznata. Traume koje inače ne bi naštetile zdravoj kosti u ovih bolesnika mogu biti razlogom lomova i najvećih kostiju, a u teškim slučajevima oni se mogu i spontano dogoditi. Starije osobe su i iz drugih razloga sklonije prijelomima, a tu uključujemo slabiji vid i općenito otežanu pokretljivost. Najteži je prijelom kuka (vrata bedrene kosti) koji može dugo imobilizirati bolesnika čineći ga nesposobnim za svakodnevni život uz mogućnost razvoja komplikacija koje mogu završiti i smrću kao što je tromboza u dubokim venama nogu. Čak 50% osoba nakon prijeloma kuka ima trajne funkcijske smetnje. Kralješci se pak često posebno u srednjem dijelu kralješnice polako kompresivno lome i dovode do nastanka grbe. Problem je i što osteoporotične kosti puno teže zarastaju.Tjelesna visina se smanjuje zbog skraćenja kralješnice i njezinog savijanja u prsnom dijelu (kifoza).



Slika 4. Razvoj osteoporoze u postmenopauzalnih žena dovodi do smanjenja visine i savijanja kralješnice u njezinom prsnom dijelu. Izvor: Web 4

1.3. Biljezi koštane pregradnje i razgradnje u osteoporozi

Tijekom procesa stvaranja i razgradnje koštanog matriksa mogu se utvrditi promjene biokemijskih biljega kostiju u krvi i serumu. Analiza ponovljena u kratkim intervalima omogućuje serijsku procjenu koštane pregradnje. Danas je u upotrebi niz biokemijskih biljega pregradnje kostiju, uključujući biljege pregradnje i razgradnje kostiju. Biološki biljezi pregradnje kostiju mogu se koristiti za praćenje učinaka terapije kod bolesnika s nekom od bolesti kostiju te za moguće smanjenje potrebe čestog mjerenja gustoće koštane mase (Čepelak i Čvorišćec 2009). Aktivnost osteoblasta odnosi se na mjerenja biljega pregradnje, a aktivnost osteoklasta na biljege razgradnje (Camacho i sur., 2006). Usporedno s povećanim razumijevanjem biokemijskih procesa u kostima te izolacijom i karakterizacijom staničnih sastojaka skeletnog matriksa, povećava se i broj novih, biokemijskih potencijalnih biljega izgradnje i razgradnje kostiju.

Važni kriteriji u kritičkoj prosudbi potrebe mjerenja nekog od biljega izgradnje ili razgradnje kostiju su:

- Biološki čimbenici (kao što su tkivna specifičnost, učinak promjene funkcije jetre ili bubrega na klirens biljega, biološki ritam biljega zbog standardizacije vremena uzimanja fiziološkog uzorka, imobilizacija i dr., Čepelak i Čvorišćec 2009).
- Predanalitički čimbenici (način pohranjivanja uzorka, odnosno vrijeme i temperatura, zamrzavanje i odmrzavanje uzorka, utjecaj antikoagulansa).
- Analitička specifičnost i točnost (mikroheterogenost biljega, kao npr. stupanj glikozilacije alkalne fosfataze, razgradivost biljega na više različitih fragmenata kao u slučaju osteokalcina, i npr. inhibitori enzimskih aktivnosti).
- Dijagnostička valjanost (odnosno postoje li razlike između biljega s obzirom na njihovu dijagnostičku osjetljivost i specifičnost, Seiebel i sur., 1999 ; Withold i sur., 1996).

Biljezi izgradnje kostiju su izravni ili neizravni produkti ili enzimi aktivnih osteoblasta, njihova koncentracija ili aktivnost mjeri se u serumu ili plazmi i općenito imaju umjereno izraženu biološku varijabilnost. Najčešće se mjeri aktivnost ukupne alkalne fosfataze te koncentracija osteokalcina i propeptida prokolagena tipa I (Seiebel MJ, 1999).

1.3.1. Biljezi pregradnje kostiju

Za mjerenje aktivnosti koštane pregradnje postoji nekoliko klinički korisnih biljega : alkalna fosfataza, osteokalcin te propeptidi prokolagena tipa I.

Alkalna fosfataza

Aktivnost alkalne fosfataze (engl. alkaline phosphataze, ALP) potječe iz različitih tkiva kao što su jetra, posteljica, kosti, itd. Izoforme kostiju i jetre su najčešće (90%). Obje su pronađene u zdravog pojedinca u istom omjeru, a razlikuju se prema glikolizaciji uzoraka (Clowes i sur., 2002). Precizna fiziološka funkcija ALP još uvijek je nejasna, ali se pretpostavlja njezina uloga u stvaranju osteoida i mineralizaciji kostiju. Fiziološki oblici kodirani su s 4 genska lokusa, pri čemu tri tkivno specifična a jedan tkivno nespecifičan. Koštani i jetreni oblici ALP, koji su najzastupljeniji u serumu, nastaju posttranslacijskim modifikacijama, točnije različitim stupnjem glikozilacije tkivno nespecifičnog genskog produkta (različiti udio sijalinske kiseline i vezanih šećernih ostataka). Kao ekto-enzim tetramerna ALP je specifično, preko C-terminalnog glikan-fosfatidil sidra vezana na membrane osteoblasta. Vrijednosti ukupne ALP veće su u muškaraca nego u žena, pretpostavlja se zbog suprimirajućeg učinka estrogena na metabolizam kostiju, a povećavaju se linearno s godinama u oba spola (Kasperk i sur., 1998 ; Cundy i sur 2008).

Osteokalcin

Osteokalcin (engl. osteocalcin, OC) ili koštani Gla (engl. glutamic acid, Gla) protein glavni je nekolageni protein koštanog matriksa koji primarno sintetitiziraju osteoblasti te odontoblasti i hipertrofični hondrociti. Bjelančevina osteokalcin pripada skupini bjelančevina koštane međustanične tvari, a zadaća joj je sprječavanje mineralizacije i kočenje djelovanja samih osteoblasta (Ducy i sur., 1996). Neznatna količina OC može se osloboditi tijekom razgradnje kostiju, što se može izmjeriti nekim metodama, stoga bi ga se moglo nazvati i biljegom koštane pregradnje. Sadrži 49 aminokiselina (5,8 kDa) od kojih su tri gama-karboksi-glutaminske kiseline (postranslacijska, o vitaminu K ovisna enzimska karboksilacija) na pozicijama 17, 21 i 24, a odgovorne su za Ca-vezujuća svojstva ovog proteina. Točna uloga ovog proteina još uvijek nije sasvim jasna. Raspravlja se najviše o njegovoj ulozi u procesu mineralizacije kostiju, o ulozi glasnika za kalcitriol u razgradnji kostiju, te ulozi inhibitora leukocitne esteraze i aktivnosti faktora rasta. Klinička su istraživanja pokazala da nedostatak

vitamina K može dovesti do poremećaja karboksilacije OC, što rezultira nerazmjernim povećanjem koncentracije cirkulirajućeg oblika OC u cirkulaciji (Lee i sur., 2000).

Budući da se vrlo brzo izlučuje kroz bubrege, poluživot cirkulirajućeg OC je oko 4-5 minuta (OC i njegovi fragmenti se nakupljaju i povećava im se koncentracija u serumu kada je promijenjena funkcija bubrega, Brown i sur., 2009 ; Cundy i sur., 2008). Zanimljivo je da je OC jedini biljeg izgradnje kostiju čije vrijednosti pokazuju značajno povećanje nakon dužeg boravka u krevetu, što je vjerojatno zbog oslobađanja OC inkorporiranog u kostima iz mjesta razgradnje (Cundy i sur., 2008). Koncentracija imunoreaktivnog OC u biološkim tekućinama mjeri se imunokemijskim postupcima (RIA, ELISA, IRMA, ECLIA).

Propeptidi prokolagena tipa I (PINP, PICP)

Kolagen tipa I je glavni protein koštanog matriksa (>90% sadržaja matriksa) te u manjoj mjeri kože, dentina, tetiva i brojnih drugih tkiva. Sintetizira se u osteoblastima u obliku prethodničke molekule prokolagena I koja sadrži N- i C-terminalnu trimernu produženu domenu sa dva identična polipeptidna lanca (alfa1 I) i jedan (alfa2 I) poznatu kao propeptid (PINP, engl. aminoterminal propeptide of type I procollagen) i (PICP, engl. carboxiterminal propeptide of type I procollagen).

Prokolagen je stoga 50% duža molekula od konačnog proteina, a njegova funkcija je sprječavanje prijevremene agregacije molekule kolagena u fibrile unutar stanice. Prije sazrijevanja kolagenskih fibrila, ovi tzv. C- i N-propeptidi cijepaju se s prokolagena tipa I specifičnim izvanstaničnim tkivnim endopeptidazama. C-terminalni propeptid prokolagena tipa I (PICP) je glikoprotein koji sadrži dva polipeptidna lanca (alfa1 I) od 246 i jedan polipeptidni lanac (alfa2 I) od 247 aminokiselinskih ostataka, s među- i unutarstaničnim disulfidnim vezama (115 kDa, Vergnaud i sur., 1997). Ugljikohidratna komponenta C-terminalnog propeptida sadrži ostatke N-acetilglukozamina i manoze. PICP se metabolizira preko manoza-6-P receptora na endotelnim stanicama jetre (poluživot 6-8 minuta), a PINP pomoću receptora čistača (Čepelak i Čvorišćec 2009).

1.3.2. Biljezi razgradnje kostiju

Telopeptidi kolagena tipa I (CTX)

Kad se kolagen tipa I razgrađuje osteoklastima, N- i C-terminalni telopeptidni fragmenti, još uvijek pričvršćeni poprečnim vezama na helikalni fragment susjedne molekule, otpuštaju se u cirkulaciju i uklanjaju bubrezima (Takahashi i sur., 2002).

Postoji imunokemijski postupak za mjerenje C-terminalnog telopeptida kolagena (engl. C-telopeptide of type I collagen, CTX) u mokraći, točnije razgradnog produkta C-telopeptida koji koristi monoklonska protutijela protiv sintetskog oktapeptida koji sadrži poprečno vezano mjesto (Glu-Lys-Ala-His-beta-Asp-Gly-Gly-Arg), nazvano beta-CTX ili beta-crosslaps.
Biokemijski biljezi koštane pregradnje su doprinijeli boljem razumijevanju fiziologije i patogenezi bolesti kostiju. Trenutno najbolji biljezi pregradnje kostiju su OC i PINP, dok je CTX najučinkovitiji biljeg razgradnje kostiju (Garnero i sur., 2008).

Tablica 1. Predanalitičke i biološke značajke koštanih biljega
Alkalne Fosfataze (ALP), Koštane Alkalne fosfataze (B-ALP), Osteokalcina (OC), Karboksiterminalnog propeptida prokolagena tipa I (PICP), Aminoterminalnog propeptida prokolagena tipa I (PINP), Hidroksiprolina (OHP), Piridinolina (PYD), Deoksipiridinolina (DPD), Poprečno vezanog karboksiterminalnog telopeptida kolagena tipa I (ICTP), Poprečno vezanog karboksiterminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX), Hidroksilizin-glikozidaze (Hyl-Glyc), Koštanog sijaloproteina (BSP), Tartarat-rezistentne fosfataze (TR-ACP), Gama karboksiglutamina (Čepelak i Čvorišćec, 2009).
Izvor: Web 5

Marker	Stabilnost uzorka	Pod utjecajem	Dnevni ritam
ALP	stabilan < -20°C	funkcije jetre	nije značajan
B-ALP	stabilan < -20°C	funkcije jetre	nije značajan
OC	nestabilan < -80°C	funkcije bubrega	značajan
PICP	stabilan < -20°C	funkcije jetre	značajan
PINP	stabilan < -20°C	funkcije jetre	značajan
OHP	stabilan < -20°C	funkcije jetre, ishrane, upale	značajan
PYD	stabilan < -20°C	funkcije jetre, aktivnog artritisa	značajan
DPD	stabilan < -20°C	funkcije jetre	značajan
ICTP	stabilan < -20°C	funkcije jetre, funkcije bubrega	značajan
CTX	stabilan < -20°C	funkcije jetre, funkcije bubrega	značajan
Hyl-Glyc	stabilan < -20°C	funkcije jetre	značajan
BSP	stabilan < -20°C	funkcije jetre, funkcije bubrega	značajan
TR-ACP	nestabilan < -80°C	hemolize	nije značajan
GLA	?	ishrana (K vitamin) koagulacije	nije značajan

1.4. Genetska podloga osteoporoze

Osteoporoza je česta bolest obilježena smanjenjem koštane mase te nedostatkom u mikroarhitekturi koštanog tkiva koji negativno utječe na čvrstoću kostiju te dovodi do povećanog rizika prijeloma kostiju (Kanis i sur., 1994).

Osteoporoza se može definirati kada vrijednosti mineralne gustoće kostiju (BMD) lumbalne kralješnice i kukova padnu najmanje za 2,5 SD (odstupanje od referentnih vrijednosti, SD-standardna devijacija) ispod prosjeka u odnosu na zdravog pojedinca (BMD iznosi -2,5 ili manje). Osteopenija (smanjenje gustoće kostiju, prethodi osteoporozi) se javlja kod ispitanika čiji je BMD između -1,0 i -2,5. Ispitanici čija je BMD vrijednost veća od -1,0 ali manja od +2,5 imaju normalnu gustoću kostiju (Siris i sur., 2001).

Genetska arhitektura osteoporoze je tipična, kompleksna bolest sa udjelom različitih gena. Većina gena ima mali učinak ali postoji i oni koji uzrokuju velike posljedice. U ljudskom genomu postoje različite genetske varijante. U jednostavnim uvjetima mogu se podijeliti na dvije velike skupine i to na temelju nihove učestalosti u općoj populaciji te na temelju njihova funkcionalnog učinka na ciljne gene. Pojam „polimorfizam“ se koristi za opisivanje zajedničke genetske varijante koja se često pojavljuje u >1% populacije. Najčešći tip polimorfizma je SNP (Single Nucleotide Polymorphism) u kojemu je jedan od četiri nukleotida (A, T, C ili G) zamijenjen drugim, te na taj način SNP-ovi uzrokuju promjenu u sekvenciji DNA. Osim zamjene pojedinih nukleotida dolazi i do njihova brisanja te dupliciranja što ima jednak utjecaj na promjenu sekvencije DNA kao i zamjena nukleotida. Delecije i duplikacije segmenata genoma nazivamo CNV (Copy Number Variation) te ukazuju na veći izvor varijabilnosti u genomu i mijenjaju gensku dozu. CNV-s se javljaju kao posljedica strukturnih promjena u genomu a prisutni su u bolesnih ali i zdravih ljudi. Trenutna istraživanja ukazuju na to da u ljudskom genomu ima oko 20 milijuna polimorfizama a samo se za mali dio polimorfizama ne zna kakav funkcionalni učinak ima. Iako su promjene u funkciji i ekspresiji pojedinih gena vrlo male, mislilo se kako se bolesti poput osteoporoze mogu pripisati kombiniranim učincima stotine pa čak i tisuće polimorfizama. Izraz „mutacija“ se koristi za opisivanje rijetke genske varijante (frekvencije puno manje od 1%) a koja ima veliki utjecaj na funkciju gena. Većina mutacija direktno utječe na proteinsku kodirajuću sekvencu ciljnog gena te na taj način uzrokuju promjene u proteinskoj strukturi te funkciji dok neke pak utječu na regulaciju ekspresije gena. Segregacijske analize koje su provođene unutar obitelji su pokazale kako regulacija BMD-a i

ostalih osteoporotskih vezujućih fenotipova su primarno određeni višestrukim genima, svaki sa relativno malim učinkom i to više nego učinkom mutacija u samo nekoliko gena (Gueguen i sur., 1995).

1.4.1. Osteopetroza

Mutacija pojedinih gena kod nekolicine rijetkih bolesti ima značajan utjecaj na koštanu masu, krhkost kostiju te njezinu lomljivost. Takve bolesti su doprinijele važnim molekularnim putevima koji reguliraju koštanu masu, funkciju koštanih stanica te kvalitetu koštanog tkiva. Osteopetroza je naziv za grupu sindroma koja je obilježena nedostatkom osteoklasne koštane resorpcije. Osteopetroza najčešće nastaje kao posljedica propadanja osteoklasne funkcije (osteoklastima bogata osteopetroza) ali može nastati i kao posljedica nedostatka osteoklasta u njihovoj diferencijaciji (osteoklastima siromašna osteopetroza, Villa i sur., 2009). Osteoklastima siromašna osteopetroza je u mnogim slučajevima uzrokovana inaktivacijom mutacije u TNFRSF11A gena koji kodira RANK ili TNFSF11 gena za kodiranje RANKLA (Guerrini i sur., 2009 ; Sobacchi i sur., 2007).

1.5. OPG-RANK-RANKL

Otkriće receptora aktivatora nuklearnog faktora (RANK)/RANK ligand (RANKL)/ osteoprotegerin (OPG) puta pridonio je boljem razumijevanju načina regulacije formiranja i resorpcije kosti. RANKL i OPG su članovi TNF (tumor necrosis factor) i TNF receptor (TNFr) superobitelji, odnosno, vezivanje receptora aktivatora RANK ne samo da regulira osteoklasnu formaciju, aktivaciju i opstanak u normalnom modeliranju koštane pregradnje već i nekoliko drugih patoloških stanja karakterizira povećanje koštane pregradnje. RANK-RANKL-OPG sustav mogao bi biti usmjeren kao nova strategija liječenja u koštanim uvjetima. Otkriće receptor aktivatora nuklearnog faktora (RANK)/ RANKL/osteoprotegerin (OPG) signalnog puta u osteoklasnom formiranju i djelovanju, pokazalo je veliku ulogu tumor necrosis factor (TNF) receptor obitelji u koštanom metabolizmu (Tat i sur., 2009 ; Whyte i sur., 2004).

1997.g. OPG je identificiran kao član TNF (tumor necrosis factor receptor) obitelji. 1998.g. RANKL je postao novi član TNF obitelji koji se može vezati na OPG i RANK (Geusens i sur., 2009). RANK/RANKL/OPG su vrlo usko povezani jedni s drugim.

RANKL se sintetizira u membrani u topljivom obliku osteoblastičnih, imunoloških te nekih zloćudnih tumorskih stanica. Ovaj faktor se veže na površinski receptor osteoklasta RANK i stimulira resorpciju kostiju kroz osteoklastogenezu i aktivaciju zrelih osteoklasta. OPG koji se luči iz osteoblasta djeluje kao receptor mamac za RANKL i tako blokira interakciju između RANKL i RANK, odnosno sprječava osteoklastogenezu (Tat i sur., 2009 ; Caetano-Lopes i sur., 2007). Stoga su geni uključeni u ekspresiju bilo koje komponente OPG-RANK-RANKL sustava mogući su kandidati za pronalaženje gena odgovornog za nastanak osteoporoze.

Osteoprotegerin (OPG) pripada TNF (tumor necrosis factor receptor) obitelji a sprječava biološke učinke RANKL-a. Također, poznat je i kao TNFRS član 11B (TNFRS11B), inhibitor faktor osteoklastogeneze (OCIF) i tropin reduktaza1 (TR1). Proizvodi se u odrasloj dobi u stanicama pluća, srca, bubrega, jetre, timusa, limfnih čvorova, koštane srži, osteoblasta, glatkih mišićnih stanica, B-limfocita te stanica zglobnih hondrocita (Tat i sur., 2009 ; Caetano-Lopes i sur., 2007 ; Boyce i sur., 2007). Kada je ekspresija RANKL-a „gore" regulirana tada je ekspresija OPG-a regulirana prema „dolje" tj. smanjena je ili se ne inducira do istog stupnja kao RANKL. Omjer RANKL/OPG favorizira osteoklastogenezu (Boyce i sur., 2008). Ekspresija OPG-a u osteoblastima se povećava djelovanjem vitamina D3, interleukina (IL)-1α, IL-1β, TNFα, TNFβ, BMP2 preobražavajući faktor rasta β (TGFβ), 17-estradiol i Wnt signalni put. Ta ekspresija se smanjuje djelovanjem prostaglandina E2 (PGE2), paratiroidnog hormona (PTH), glukokortikoida te inzulinu sličan faktor rasta (IGF 1) (Vega i sur., 2007). RANKL/OPG omjer izražen u pre-osteoblasnim stanicama veći je nego li u zrelim osteoblastima, favorizirajući sazrijevanje osteoklasta (Boyce i sur., 2008). RANKL također pripada TNF superobitelji a eksprimira se u kostima, plućima, koštanoj srži i limfnom tkivu. Postoji kao tri izoformna oblika: RANKL 1, 2 i 3. Ove tri izoforme različito mogu regulirati osteoklastogenezu i postoje u topljivom i membranskom obliku. Topivi oblik ima mali kapacitet za generiranje osteoklasta (Nakashima i sur., 2000). RANKL se eksprimira i u tumorskim malignim stanicama čime se regulira proliferacija tumorskih stanica (Tat i sur., 2009 ; Boyce i sur., 2008). Nedavno, prvi izvještaj mutacije u RANKL gena je opisan u Kanadi. Osobe zahvaćene osteopetrozom nisu imale nikakav očiti nedostatak u imunološkom sustavu (Boyce i sur., 2008).

RANK pripada TNF superobitelji, sintetizira se kao tip 1 homotrimeričnog transmembranskog proteina te se eksprimira u različitim tkivima skeletnih mišića, jetre, debelog crijeva, prostate, timusa, žlijezda dojke, gušterače, stanicama monocita/lozi makrofaga (prekurzori i zreli osteoklasti, B i T stanice, dendritičke stanice, fibroblasti te zglobni (artikularni hondrociti).

RANKL koji je izražen na osteoblasnim stanicama, veže se na RANK na površini osteoklasta te potiče TRAF (engl. tumor receptor associated factor) 2, 5 i 6 koji se vežu na RANK citoplazmatsku domenu (samo je TRAF 6 esencijalan u osteoklastima) što dovodi do aktivacije NF-kb i premještanja u jezgru. Najmanje sedam signalnih puteva su aktivirani RANK posredovanom protein kinaza signalizacijom: četiri posreduju osteoklastogenezu (inhibitor NF-kB kinaze/NF-kB, c-Jun amino-terminalna kinaza/aktivator protein-1, c-myc i kalcineurin/NFATc1) i tri posreduju aktivaciju osteoklasta (Rous sarcomaconcogene (src) i mitogenom aktivirana protein kinaza kinaza 6 (MKK6)/p38 microphthalmia povezan transkripcijskim faktorom (MITF) i opstanak (src i izvanstanične signal- regulirajuće kinaze, Caetano-Lopes i sur., 2007 ; Geusens i sur., 2009).

Na temelju studije koja se bavila miševima NFATc1 je opisan kao glavni regulator u osteoklastogenezi. Aktivirao se kalcij ovisnom kalcineurin defosforilacijom. Međutim, neki su pacijenti tretirani ciklosporinom A (NFATc1 inhibicija) što je dovelo do gubitka koštane mase te navodi na drugo objašnjenje: NFATc1 pozitivno regulira ekspresiju osteriksa, bitnog transkripcijskog faktora u funkciji osteoblasta, a rezultat toga učinka je smanjenje koštane formacije i osteoporoze (Boyce i sur., 2007).

1.5.1. OPG-RANKL KOMPLEKS

RANKL se vezuje na svoj receptor, RANK, koji se nalazi na površini preosteoklasta te potiče njegovu diferencijaciju i pobuđivanje. Osim RANKL-a, stanice osteoblastne loze izlučuju i lažni, topljivi receptor za RANK - osteoprotegerin (OPG), koji je funkcionalni antagonist RANKL-a. Možemo reći da broj i aktivnost osteoklasta u kosti ovisi upravo o omjeru lokalno dostupnog RANKL-a i OPG-a (Lacey i sur., 1998 ; Simonet i sur., 1997). Visoki omjer predstavlja koštanu formaciju dok niski omjer favorizira koštanu razgradnju (Tat i sur., 2009 ; Vega i sur., 2007).

Anti-resorpcijki učinak OPG-a može se objasniti po svojim svojstvima kao receptor mamac i kao modulator poluraspada RANKL-a. Kao i RANKL i OPG regulira međusobnu bioraspoloživost. Ravnoteža između RANKL-a i topljivog OPG-a će biti važna za ljekovitu primjenu OPG-a (Tat i sur., 2009).

1.6. Genetski polimorfizmi OPG gena

Osteoprotegerin gen je vrlo značajan gen u osteoporozi. Povezanost OPG polimorfizma i mineralne gustoće kostiju (BMD) proučavana je u nekoliko različitih istraživačkih skupina, međutim, rezultati nisu jednoznačni.

Nekoliko znanstvenika su procijenili povezanost između OPG polimorfizma gena i BMD-a, no dobiveni rezultati nisu bili dosljedni te su ovisili o tipu polimorfizma koji se ispituje te o etničkoj skupini ispitanika (Langadahl i sur., 2002 ; Arko i sur., 2005).

S obzirom na važnost osteoprotegerin gena na koštanu pregradnju, on može biti i kandidatni gen za osjetljivost na osteoporozu. SNP polimorfizmi koji su otkriveni u OPG genima bili su povezani s BMD-om u postmenopauzalnih žena ili sa osteoporotičnim prijelomima u žena i muškaraca (Ohmori i sur., 2002 ; Wynne i sur., 2002).

Nekoliko studija je provedeno kako bi se utvrdio odnos između RANK i RANKL polimorfizama gena, no rezultati su jednako sporni (Choi i sur., 2005 ; Hsu i sur., 2006).

1.7. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je istražiti mogu li dva opisana polimorfizma u OPG genu biti povezana s razlikama u zabilježenim razinama biokemijskih biljega koštane pregradnje, kao i s promjenama u mineralnoj gustoći kostiju kod postmenopauzalnih žena.

Također će se pokušati utvrditi može li opisani fenotipski odnos eventualno pružiti korisna klinička i biološka predviđanja.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Ustroj studije i ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo četrdeset postmenopauzalnih žena. Dvadeset žena s normalnim vrijednostima mineralne gustoće kostiju, te dvadeset s dokazanom osteoporozom. Ispitanice su bile bez spontane menstruacije u trajanju od najmanje godinu dana te su bile podrvgnute kompletnom liječničkom pregledu i sveukupnoj medicinskoj anamnezi. Svaka ispitanica je prošla kroz biokemijske analize te je na taj način utvrđena razina glukoze u krvi te funkcija jetre i bubrega. Žene koje su pretrpjele dvostrano odstranjenje jajnika te one kojima je trenutno utvrđeno bubrežno, jetreno oboljenje i dijabetes su isključene iz istraživanja. Nitko od ispitanica nije dobio lijekove koji su utjecali na metabolizam kostiju prije istraživanja. Sve sudionice su bile o tome prethodno obaviještene. Tijekom istraživanja, sudionice su bile upućene i obavještene o svrsi ovog istraživanja, a ono je odobreno od strane Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske.

2.1.1. Mjerenje mineralne gustoće kostiju - denzitometrija

Mjerenje gustoće kostiju izvršeno je kod svih sudionica koje su sudjelovale u istraživanju. Mjerenje se obavljalo DXA metodom (engl. dual x-ray absorptiometry = apsorpciometrija s pomoću x-zraka dviju različitih energija).

Postupak mjerenja:

- Postupak mjerenja iznosio je 10-15 minuta, doza zračenja bila je vrlo niska (1-3 mRem) a pretraga bezbolna i jednostavna
- Sudionicama su se uklonili svi metalni dijelovi s odjeće
- BMD (engl. bone mineral density) je mjeren u području slabinskog dijela kralješnice (L2-L4), vrata bedrene kosti te cijelog kuka
- Za vrijeme mjerenja sudionice su sjedile i držale podlakticu na ležaju aparata ili su pak ležale na njemu (ovisno o dijelu tijela nad kojim je vršeno mjerenje)



Slika 5. Denzitometar. Foto: L. Kuna

Senzorima su se mjerile one x-zrake koje su prošle kroz kost te su obrađene u elektroničkom obliku. Kao rezultat mjerenja dobivena je razlika energije propuštenih i apsorbiranih x-zraka kojom je bila omogućena procjena gustoće minerala kosti koja je izražena u g/cm^2.

2.2. DNA analiza

2.2.1 Izolacija DNA iz krvi ili tjelesnih tekućina

Izolacija DNA je mjerna metoda kojom se vršila kemijska izolacija iz krvi. Za izolaciju DNA korišten je komercijalno dostupan set za izolaciju iz krvi i tjelesnih tekućina QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputi proizvođača s minimalnim preinakama. Ovaj postupak se koristi za pročišćavanje ukupne (genomske, viralne, mitohondrijske) DNA iz krvi, plazme, limfocita i tjelesnih tekućina koristeći centrifugu.
Prije početka provođenja postupka bitno je bilo sve korake centrifugiranja provoditi na sobnoj temperaturi. (15-25°C). Korišten je nosač DNA jer je uzorak sadržavao <10,000 genomskih ekvivalenata. 200 µl ukupne krvi daje 3-12g DNA.

Postupci koje je bitno napraviti prije samog početka:

-Svi uzorci podešeni su na sobnoj temperaturi

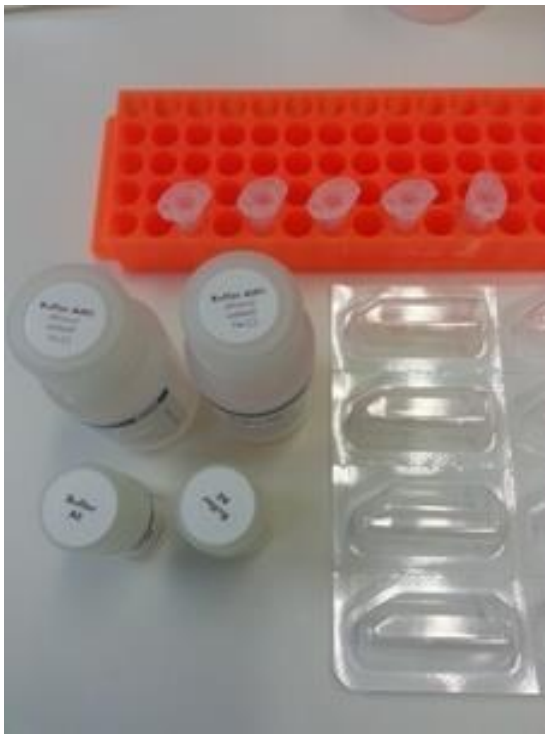
-Vodena kupelj zagrijana je do 56°C

-Destilirana voda je uravnotežena na sobnoj temperaturi za izlučivanje u daljnjim koracima

- AW1 pufer, AW2 pufer i proteaze su pripremljene

-Kad je talog formiran u AL pufer, otopljen je inkubacijom na 56°C





Slika 6. QIAmp DNA Blood Mini Kit

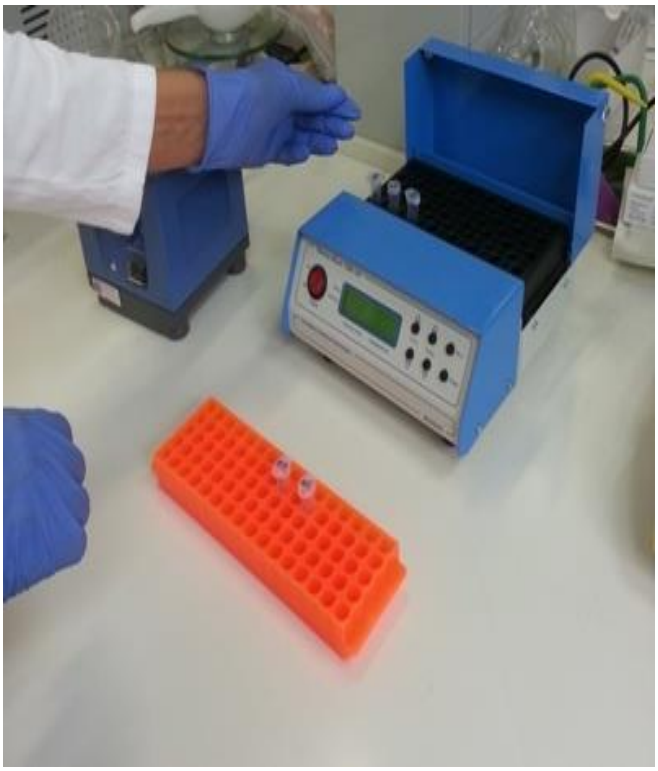
Slika 7. Priprema pufera AW1, AW2, AE

Foto: L. Kuna

Postupak :

Na dno tubice dodano je 20 µl proteaze te 200 µl uzorka. Korišteno je do 200 µl krvi u 200 µl fiziološke otopine. Potom je dodano 200 µl pufera AL u uzorak. Stavljeno je na vorteks 15 sekundi kako bi se osigurala učinkovita razgradnja, odnosno kako bi se pufer i uzorak temeljito izmiješali te kako bi bila dobivena homogena otopina. Otopina je inkubirana na 56°C, 10 minuta. DNA prinos doseže maksimum nakon razgradnje od 10 minuta na 56°C. Duže inkubacije nemaju utjecaja na prinos i kakvoću pročišćene DNA. Nakon inkubacije

dodano je 200 µl etanola (96-100%) u uzorak i ponovo se postavlja na vorteks 15 sekundi. Zatim je postavljeno na centrifugu (8000 okretaja u minuti). Centrifugiranje je postavljeno na višu brzinu sve dok QIAamp mini kolone ne budu prazne. Zatim je dodano 500 µl AW1 pufera u kolonu te je ponovo postavljeno na centrifugiranje (8000 okretaja u minuti), te je poslije toga dodan AW2 pufer i centrifugiranje na 14000 okretaja u 3 minute. QIAamp mini kolone postavljenu su u čistu tubicu. Na kraju postupka, u QIAamp mini kolonu dodano je 200 µl AE pufera. Uslijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi 15-25°C tijekom jedne minute, a zatim centrifugiranje na 8000 okretaja u minuti.



Slika 8. Postavljanje uzoraka na inkubaciju od 56°C, Thermo blok TDB-120. Foto: L. Kuna

2.2.2. Purifikacija DNA

Za purifikaciju DNA korišten je komercijalno dostupan set QIAquick PCR purification kit za purifikaciju iz krvi i tjelesnih tekućina(QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputi proizvođača s minimalnim preinakama. Ovaj postupak je korišten kako bi se DNA fragmenti očistili jedan ili dva puta od PCR-a i drugih enzimskih reakcija. Fragmenti u razini od 100 bp do 10 kb su očišćeni od primera, nukleotida te polimeraza.

Prije početka provođenja postupka bitno je da:

-Žuta boja PBI pufer pokazuje Ph < 7,5

-Dodan etanol (96-100%) PE puferu prije uporabe

-Svi koraci centrifugiranja provođeni su na 13000 okretaja u minuti u konvencionalnim, stolnim mikrocentrifugama na sobnoj temperaturi.

Postupak:

Na 1 volumen PCR uzorka dodano je 5 volumena PBI pufera te se promiješa (npr. na 100 µl PCR uzorka dodano je 500 µl PBI pufera). Zatim se provjerava je li mješavina žute boje (slično PBI puferu bez PCR uzorka). Boja je bila narančasta te je dodano 10 µl 3 M natrij acetata nakon čega je prešla iz narančaste u žutu. Kako bi se povezala DNA, uzorak se nanosi na kolonu i centrifugira 30-60 sekundi. Nakon toga, u kolonuse dodaje 0,75 ml PE pufera i centrifugira 30-60 sekundi. Kako bi eluirali DNA dodano je 50 µl EB pufera (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) te je centrifugirano jednu minutu. Kada je DNA bila pročišćena za analizu na gelu dodan je 1 volumen Loading Dye pufera na pet volumena pročišćene DNA. Na samom kraju otopina je promiješana te je gel učitan.



Slika 9. Uređaj za centrifugu, Sigma. Foto: L. Kuna

2.2.3. PCR metoda (Polimerase chain reaction)

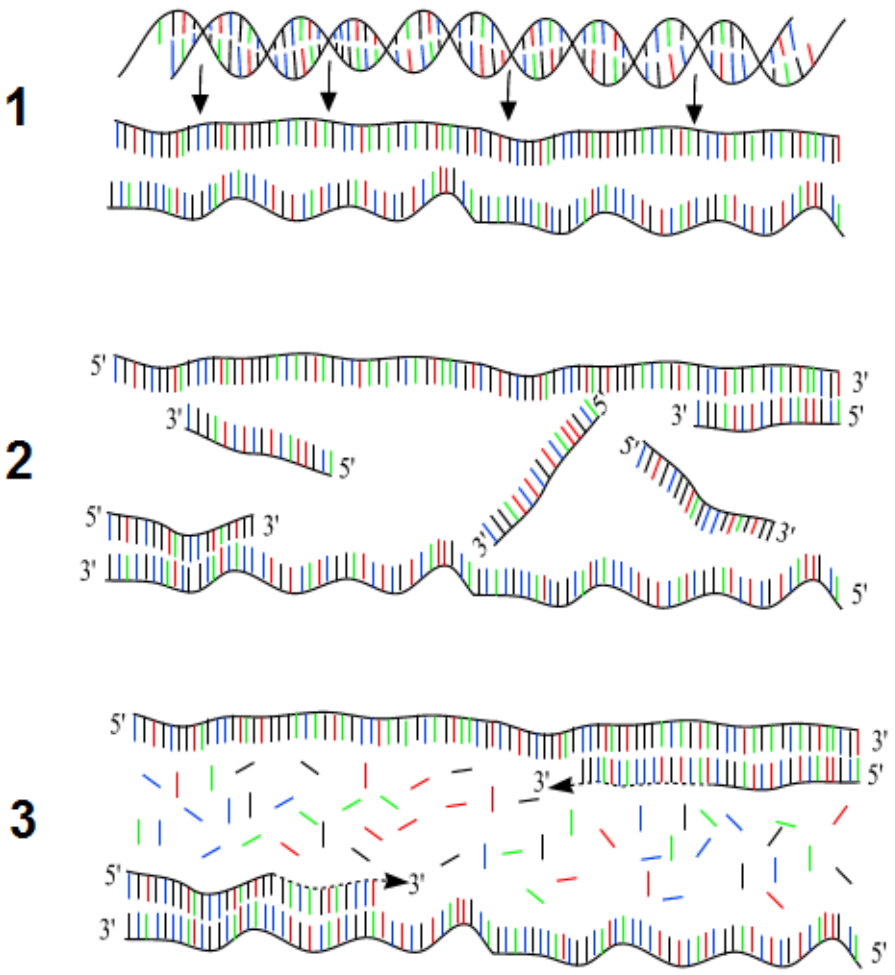
Nakon izolacije genomske DNA krvi leukocita, uslijedilo je umnažanje pojedinih dijelova DNA. PCR je korišten u pojačavanju fragmenata RANK gena, primjenjujući specifične uvjete za svaki par početnice (primera).

Potreban materijal za PCR :

- Termostabilna DNA polimeraza (Taq polimeraza), najuobičajnija polimeraza za PCR
- Uzorak DNA (50 do 100 nanograma u prosjeku) koja je bila kalup za kopiranje komplementarnog DNA lanca-niza;
- Dva odgovarajuća oligonukleotidna primera
- Reakcijski pufer
- Nukleotidi: adenin, timin, citozin i gvanidin (A, T, C i G)

Postupak za PCR :

Dvostruki lanac DNA molekule se razdvajao zagrijavanjem na 94°C kroz 3-5 minuta kako bi se postigla inicijalna denaturacija DNA molekule. Pritom su razdvojeni spareni lanci DNA koji su služili kao kalupi za amplifikaciju. Tijekom hlađenja na 50-60°C oligonukleotidni primeri su vezani na komplementarne razdvojene lance DNA i termostabilna Taq polimeraza na temperaturi od 72°C započinje sintezu komplementarnih lanaca dodavanjem komplementarnih baza. PCR reakcija odvijala se u 30 do 35 ciklusa u 3 koraka.



Slika 10. Prikaz polimerazne lančane reakcije u tri koraka: U prvom dolazi do denaturacije DNA, u drugom se odvija hibridizacija specifičnih oligonukleotidnih primera i DNA, a u trećem koraku dolazi do ekstenzije primera. Izvor: Web 6

2.2.4. RFLP metoda (Restriction fragment length polymorphism)

RFLP metoda (engl. restriction fragment length polymorphism - polimorfizam duljine fragmenata DNA nastalih rezanjem restrikcijskim enzimima) prikazuje varijacije među osobama u duljini DNA fragmenta nakon rezanja specifičnim restrikcijskim enzimima. Restrikcijski enzimi prepoznaju specifične nukleotidne sekvence te režu DNA na tim mjestima. Polimorfizmi se obično pojavljuju kao posljedica mutacija na mjestu rezanja enzima. Dio umnoženih molekula bio je izložen odgovarajućoj restrikcijskoj endonukleazi te su rezultati ovog eksperimenta analizirani elektroforezom u gelu agaroze.

Restrikcijski enzimi:

Asel:

Prepoznavanje: 5'...AT/TAAT...3'

3'...TAAT/TA...5'

Hinfl:

Prepoznavanje:5'…G/ANTC…3'

3'…CTNA/G…5'

Tablica 2. „Tipična“ restrikcijska digestija :

Restrikcijski enzim	1 µl
DNA	1 µg
PuferNE 10X	5 µl (1X)
Totalni reakcijski volumen	50 µl
Vrijeme inkubacije	1 sat
Temperatura inkubacije	ovisno o enzimu

2.2.5. Određivanje OPG A163G , G209A, T245G i G1181C polimorfizama

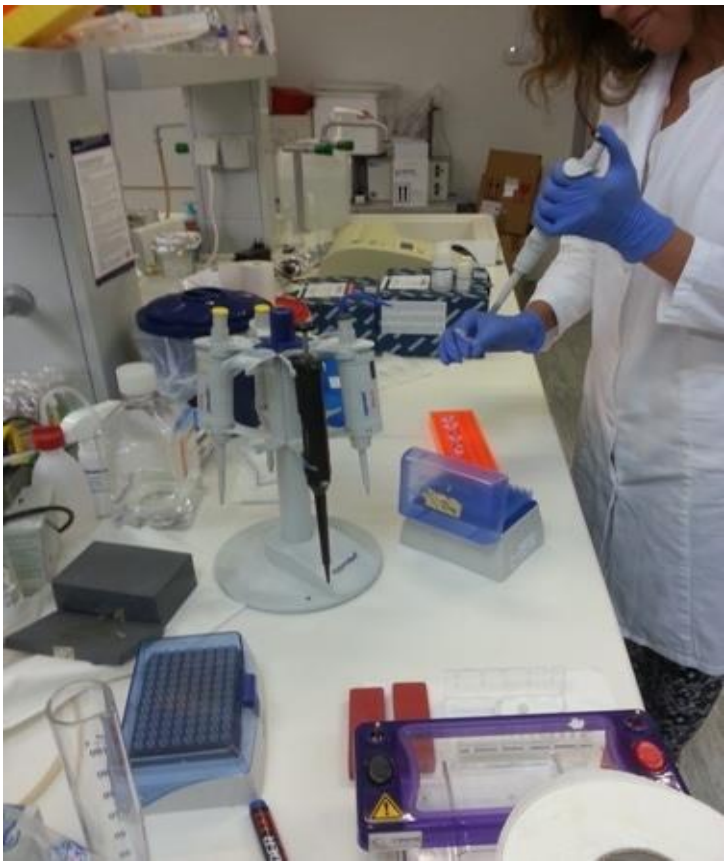
271. baza fragmenta genomske DNA sadržavala je G209A polimorfni dio u OPG promotoru te je pojačan PCR-om kako je opisao Arko i sur. Za analizu A163G, T245G i G1181C, specifični DNA fragmenti su pojačani PCR-om pomoću oligonukleotidnih primera i PCR reakcijskih koraka koje je opisao Langdahl i sur. PCR produkti su rezani s Asel i Hinfl restikcijskim endonukleazama kako bi se odredili A163G, G209A, T245G i G1181C polimorfizmi, odnosno, dobiveni fragmenti razdvojeni su elektroforezom kroz agarozni gel koji je sadržavao etidijev bromid.

2.2.6. Izrada agaroznog gela

Na nosač za gel nalijepi se ljepljiva traka s gornje i donje strane. Zatim se postavi češljići. U Erlenmayerovu tikvicu usipa se prethodno izvagana agaroza. Obično se koristi 1% agaroza (0,5g na 50 ml TBE pufera). Agaroza se zatim zagrije te se ohladi pod vodom dok se ne postigne temperatura od 50-60°C, zatim se doda etidij bromid (3µL) dobro se pomiješa i izlije se na nosač za gel. Nakon što se stvrdne i ohladi (otprilike nakon 30 minuta), izvade se češljići, odlijepi traka i nosač se prenese u kadu za elektroforezu.



Slika 11. Kada za elektroforezu. Foto: L. Kuna



Slika 12. Izrada gelova za elektroforezu. Foto: L. Kuna

Korišten je gel 2% agaroze za VDR PCR, 1% gel za ER PCR te visokorezolucijski gel Spredex 500 COL1AI PCR. Agaroza je topljena i zagrijavana u staklenoj tikvici. Nakon što se ohladila dodana joj se jedna kap etidijevog bromida koji se veže na DNA te je vidljiv u UV svjetlu transiluminatora. Gel se izlije u kadicu za elektroforezu i stave se dva češlja odgovarajuće veličine kako bi se napravile jažice. Nakon što se gel polimerizira, češljići se izvade i skine se traka. Gel se potom uroni u sustav za elektroforezu napunjen puferom TBE. Na parafilm je aplicirano 2 μL loading pufera te se uzme 5 Ml PCR produkta i pomiješa se sa bojom. Zatim se uzorci nanose u jažice. U jažicu se nanese DNA biljeg koji služi za određivanje veličine fragmenta DNA.

Elektroforeza se odvija oko 25 minuta pri konstantnom naponu od 120 V i struji od 90 mA na sobnoj temperaturi. Gelovi su pogledani pod UV lampom te su fotografirani. Odsutstvo Asel i Hinfl restrikcijskih mjesta određeni su kao G i T aleli a prisutstvo kao A i G aleli.

2.3. Biokemijska analiza

2.3.1. Mjerenje biljega koštane pregradnje

Uzorci krvi prikupljeni su od svih sudionica u skladu sa zakonom Ministarstva zdravlja RH. Mjerena su dva biljega koštane pregradnje: beta-crosslaps i osteokalcin. Mjerenja su izvršena na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

2.4. Statistička obrada podataka

Podatci su izraženi kao aritmetička sredina sa širinom disperzije ograničenom standardnom devijacijom te im je značajnost analizirana Mann-Whitney, Kruskal Wallis te Studentovim t-testom. Statistička analiza učinjena je programskim sustavom SPSS (inačica 14, SPSS International Business Machines Corporation, Armonk, NY, SAD), uz odabranu razinu značajnosti od $\alpha=0,05$.

3. REZULTATI

3.1. Kliničke karakteristike i mineralna gustoća kostiju ispitanica

U provedenoj studiji sudjelovalo je četrdeset postmenopauzalnih žena. Kod dvadeset sudionica dokazana je osteoporoza dok su preostalih dvadeset imale normalnu gustoću kostiju (BMD) te su služile kao kontrolna skupina u studiji. Ispitanice s osteoporozom (OP) bile su nešto starije u odnosu na one kod kojih osteoporoza nije utvrđena (noOP). Rezultati koje smo dobili uspoređujući razliku u visini i težini kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez nje su statistički značajni (Tablica 3, $p<0.05$). Žene s osteoporozom su zbog smanjenje mineralne gustoće gubile na koštanoj masi, te je ujedno došlo i do skraćenja kralješnice odnosno gubitka u visini. Kod njih je i menopauza uslijedila ranije s obzirom da dolazi do pada razine estrogena koji bitno utječe na mineralnu gustoću i čvrstoću kostiju. Ispitanice s osteoporozom provele su veći broj godina u menopauzi. Statistički gledano ispitanice se nisu razlikovale obzirom na trajanje menopauze ($p>0.05$), no ipak treba napomenuti kako su vrlo blizu granici koja se označava kao statistički značajna. Jedan od mogućih razloga zašto nismo dobili statistički značajne vrijednosti bi mogao biti mali broj ispitanica (za epidemiološku studiju) te brojni drugi parametri (dob, visina, težina i slično) koje je bilo teško uskladiti s obzirom da se ipak radi o kliničkom istraživanju. Posljedica spomenutoga je velik koeficijent varijabilnosti u obje grupe ispitanica (67.3% u OP, odnosno 88.5% u noOP grupi), što smanjuje mogućnost statističkog dokazivanja razlike. Mineralna gustoća kostiju lumbalne kralješnice, vrata bedrene kosti i kuka bila je u žena s osteoporozom manja u odnosu na žene koje nisu imale osteoporozu ($p<0.05$, Tablica 3).

Tablica 3. Karakteristike ispitanica uključenih u studiju (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

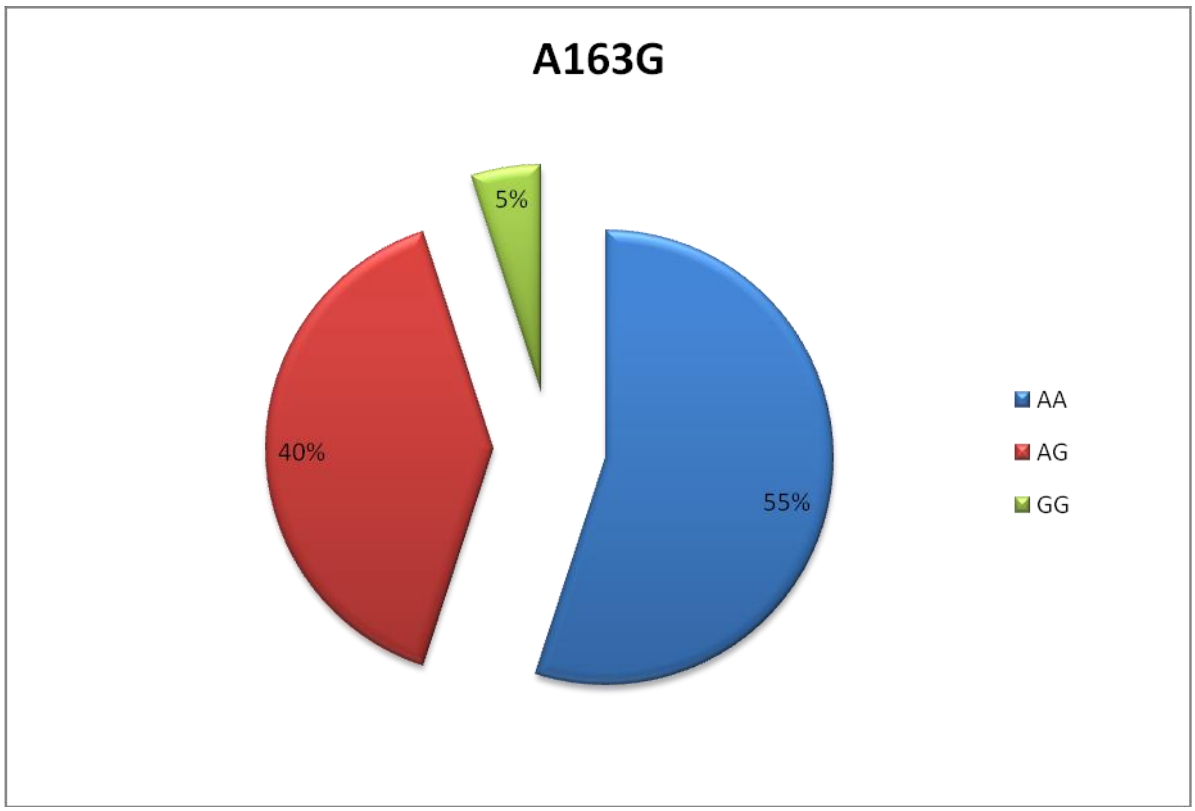
	Žene s osteoporozom	**Žene bez osteoporoze (kontrolna skupina)**	**p***
Broj ispitanika	20	20	
Dob (godine)	65 ± 13.6	60 ± 9.24	< 0.133
Visina(cm)	160 ± 6	165 ± 5.6	***< 0.028***
Težina (kg)	68 ± 8.6	81 ± 10.84	***< 0.001***
Godine u menopauzi	18 ± 12.11	11 ± 9.73	< 0.056
Lumbalna kralješnica BMD (g/cm2)	0.910 ± 0.13	1.183 ± 0.18	***< 0.001***
Vrat bedrene kosti BMD (g/cm2)	0.741 ± 0.08	0.991 ± 0.07	***< 0.001***
Kuk BMD (g/cm2)	0.763 ± 0.07	1.051 ± 0.06	***< 0.001***

*Mann-Whitney test

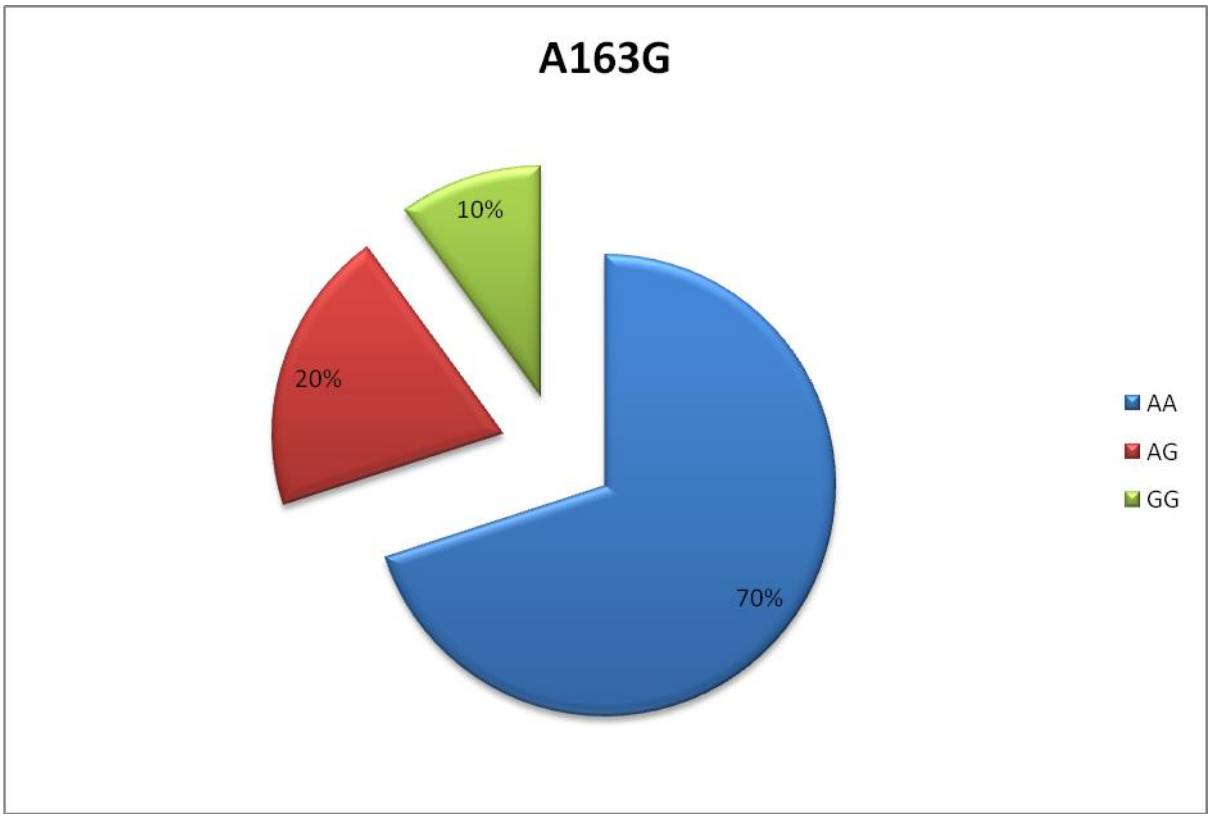
3.2. Distribucija frekvencije genotipova AA, AG i GG A163G OPG polimorfizma postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze

U našoj studiji provedena je analiza A163G i T245G OPG polimorfizama.

Distribucija OPG A163G polimorfizma kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom iznosila je: 55% AA, 40% AG i 5% GG (Slika 13). Kod jedanaest sudionica bio je zastupljen AA genotip, osam sudionica imalo je AG genotip, a samo jedna sudionica studije GG genotip. Kod postmenopauzalnih žena bez osteoporoze njih četrnaest imalo je AA, četiri AG a samo dvije sudionice GG genotip. Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima postmenopauzalnih žena s osteoporozom. Treba naglasiti da iako je distribucija frekvencije zastupljenosti AA, AG i GG genotipova identična, njihov se udio frekvencije distribucije razlikuje te iznosi 70% AA, 20% AG i 10% GG (Slika 14).



Slika 13. Distribucija frekvencije (%) AA, AG i GG genotipova kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom

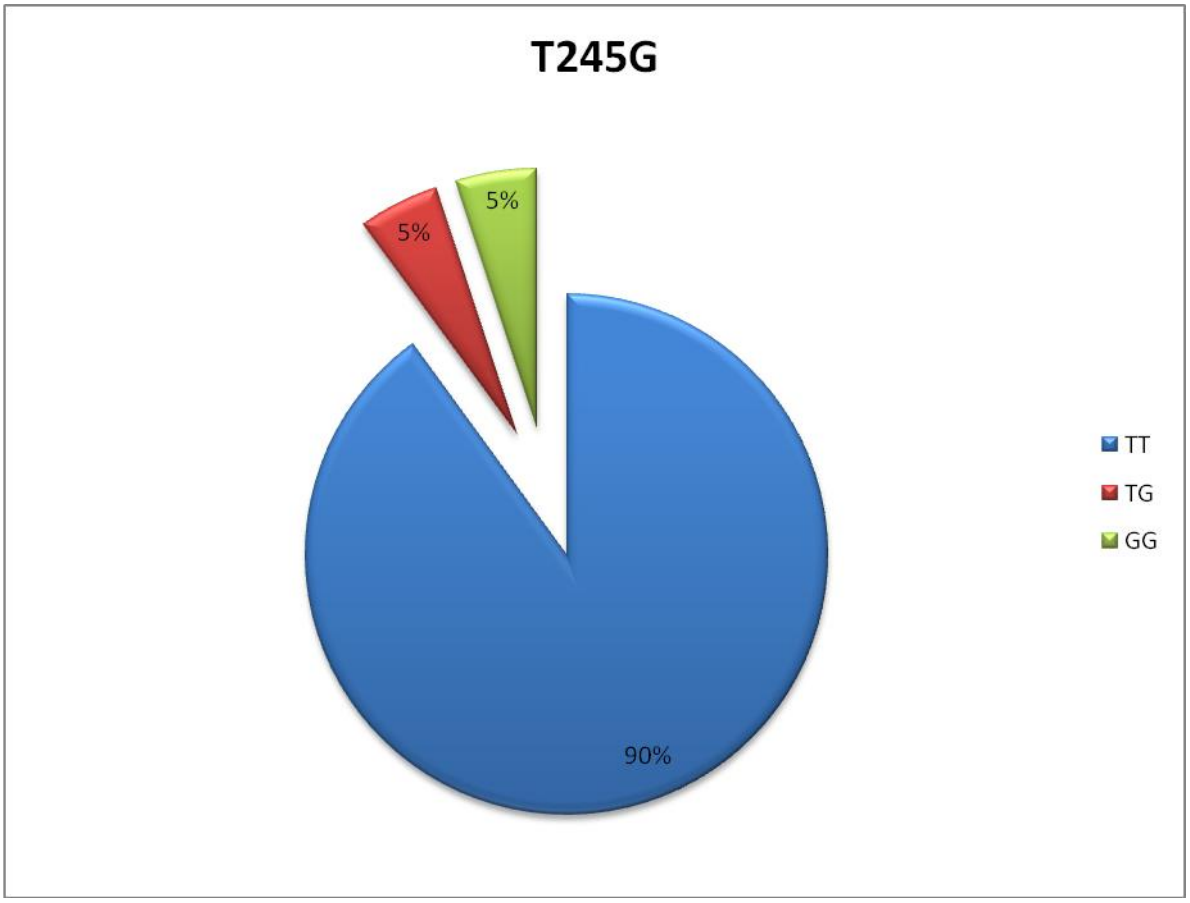


Slika 14. Distribucija frekvencije (%) AA, AG i GG genotipova postmenopauzalnih žena bez osteoporoze

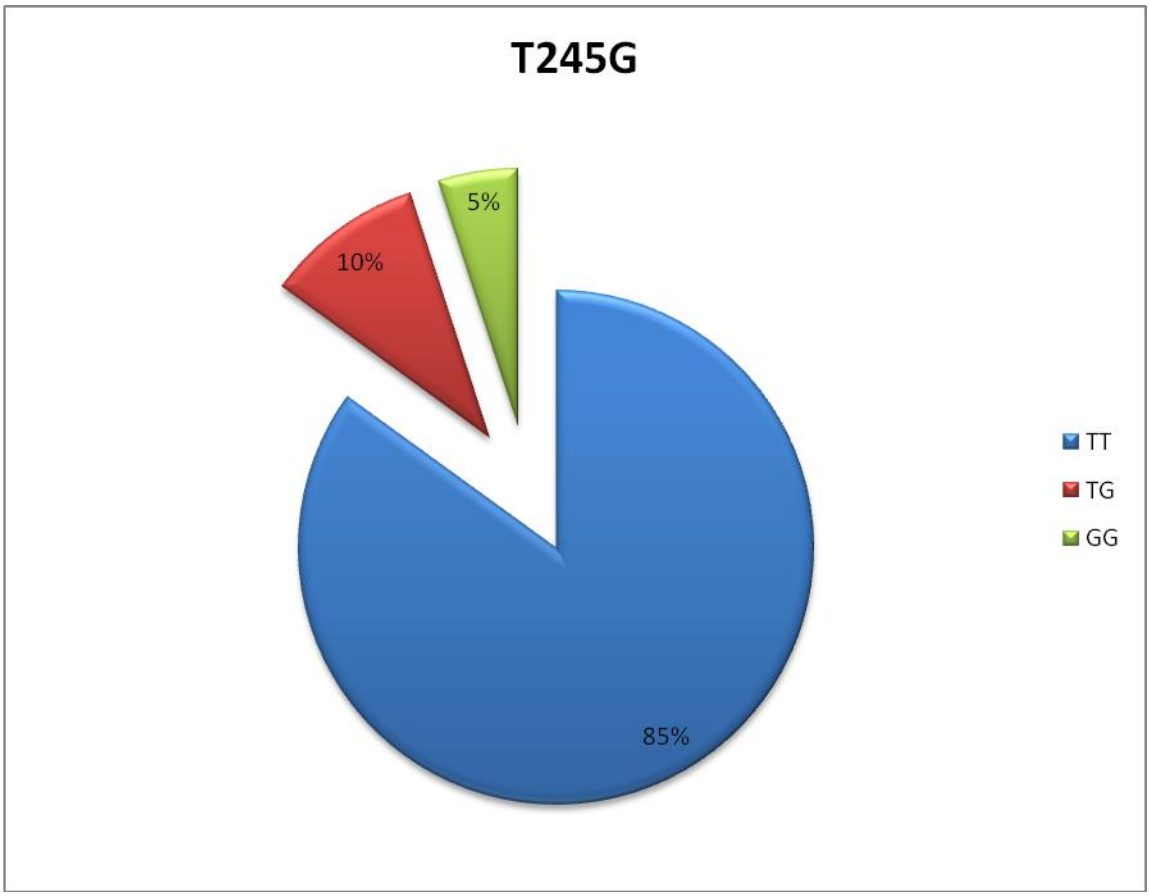
3.3. Distribucija frekvencije genotipova TT, TG I GG T245G OPG polimorfizma postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze

Distribucija OPG T245G polimorfizma kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom iznosila je: 90%TT, 5% TG i 5% GG (Slika 15). Od ukupno dvadeset sudionica studije kod njih čak osamnaest bio je zastupljen genotip TT, te je i frekvencija distribucije iz toga razloga bila puno veća u odnosu na TG i GG genotip koji su bili zastupljeni kod preostale dvije sudionice. Distribucija OPG T245G polimorfizma kod postmenopauzalnih žena bez osteoporoze iznosila je: 85%TT, 10% TG i 5% GG što je vrlo slično rezultatima koje smo dobili kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom (Slika 16).

Udio OPG T245G polimorfizma kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze bio je najveći na TT genotipu, dok je na TG i GG bio neznatan.



Slika 15. Distribucija frekvencije (%) TT, TG i GG genotipova postmenopauzalnih žena s osteoporozom



Slika 16. Distribucija frekvencije (%) TT, TG i GG genotipova postmenopauzalnih žena bez osteoporoze

Ukoliko promatramo frekvenciju distribucije genotipova A163G i T245G OPG polimorfizama možemo zaključiti kako sve frekvencije alela prate Hardy-Weinbergovu ravnotežu.

3.4. Povezanost mineralne gustoće kostiju (BMD) s A163G i T245G OPG polimorfizmima kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze

Analizom čijom nam je cilj bio utvrditi povezanost između mineralne gustoće kostiju i pojedinih genotipova A163G i T245G polimorfizama kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze nismo dobili statistički značajne razlike. U Tablici 4. sadržana je statistička analiza genotipova u genima A163G i T245G χ^2 testom u žena s osteoporozom (OP) i bez osteoporoze (noOP). Najveća je učestalost genotipa AA u A163G , te TT u T245G genima, te se učestalosti pojedinih analiziranih genotipova međusobno razlikuju. Međutim, nema razlike između istovjetnih genotipova u dvije ispitivane skupine (OP i noOP žene).

Tablica 4. Statistička analiza učestalosti genotipova u genima A163G i T245G χ^2 testom u žena s osteoporozom (OP) i bez osteoporoze (noOP)

GEN	GENOTIP	OP	noOP	P <
A163G	AA	11	14	NS
	AG	8	4	NS
	GG	1	2	NS
	P <	0.01	0.001	
T245G	TT	18	17	NS
	TG	1	2	NS
	GG	1	1	NS
	P <	0.001	0.001	

*NS = nije signifikantno

U tablici 4 vidljivo je da se učestalost genotipova u svakom od ispitivanih gena značajno razlikovala ($p<0.001$), ali nije bilo razlike u zastupljenosti istih genotipova između osteoporotičnih i žena bez osteoporoze.

3.4.1. Mineralna gustoća kostiju AT, AG i GG genotipova OPG A163G polimorfizma

Rezultati mjerenja mineralne gustoće kostiju (BMD) kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom i postmenopauzalnih žena bez osteoporoze prikazani su u tablicama 5 i 6. Mineralna gustoća lumbalne kralješnice, vrata bedrene kosti i kuka genotipova A163G polimorfizma kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom bila je manja u odnosu na postmenopauzalne žene bez osteoporoze.

Tablica 5. Vrijednosti BMD-a u A163G genu skupine postmenopauzalnih žena s osteoporozom za pojedine genotipove (ls=lumbalna kralješnica, fn=vrat bedrene kosti, th=kuk)

Gustoćakostiju, BMD (g/cm2)	**A163G**			**p***
	AA	**AG**	**GG**	
ls	0.840 ± 0.08	0.875 ± 0.116	0.8 ± 0.1	0.477
fn	0.720 ± 0.113	0.715 ± 0.025	0.7 ± 0.0	0.385
th	0.754 ± 0.042	0.707 ± 0.044	0.7 ± 0.0	***0.049***

*Kruskal Wallis test

Tablica 6. Vrijednosti BMD-a u A163G genu skupine postmenopauzalnih žena bez osteoporoze za pojedine genotipove (ls=lumbalna kralješnica, fn=vrat bedrene kosti, th=kuk)

Gustoćakostiju, BMD (g/cm2)	**A163G**			**p***
	AA	**AG**	**GG**	
ls	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1	0.355
fn	0.9 ± 0.1	1.1. ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.165
th	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	***0.064***

*Kruskal Wallis test

Genotipovi AA, AG i GG kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom nisu se statistički značajno razlikovali po vrijednostima mineralne gustoće kostiju lumbalne kralješnice te vrata bedrene kosti. Međutim, potvrđena je razlika mineralne gustoće kosti kuka između žena s osteoporozom između različitih genotipova ($p<0.05$), dok je u skupini žena bez osteoporoze uočena jaka sklonost takovoj ovisnosti ($p<0.064$). Stoga možemo zaključiti da postoji mogućnost da se u kuku potiče ekspresija pojednih gena te aktivacija pojedinih faktora koji pridonose mineralnoj gustoći kostiju.

3.4.2. Mineralna gustoća kostiju TT, TG i GG genotipova OPG T245G polimorfizma

Mineralna gustoća lumbalne kralješnice, vrata bedrene kosti i kuka genotipova T245G polimorfizma kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom prikazana je u tablicama 7 i 8. BMD žena s osteoporozom je bila manja u odnosu na postmenopauzalne žene bez osteoporoze, no razlika među vrijendostima BMD-a za pojedine genotipove nije bila statistički značajna niti u jednoj ispitivanoj skupini.

Tablica 7. Vrijednosti BMD-a u T245G genotipu skupina postmenopauzalnih žena s osteoporozom za pojedine genotipove (ls=lumbalna kralješnica, fn=vrat bedrene kosti, th=kuk)

Gustoćakostiju, BMD (g/cm2)	**T245G**			**p***
	TT	**TG**	**GG**	
ls	0.846 ± 0.098	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.435
fn	0.711 ± 0.063	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.104
th	0.737 ± 0.039	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.149

*Kruskal Wallis test

Tablica 8. Vrijednosti BMD-a u T245G genotipu skupina postmenopauzalnih žena bez osteoporoze za pojedine genotipove (ls=lumbalna kralješnica, fn=vrat bedrene kosti, th=kuk)

Gustoćakostiju, BMD (g/cm2)	**T245G**			**p***
	TT	**TG**	**GG**	
ls	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.2	0.202
fn	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.8	0.082
th	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9	0.255

*Kruskal Wallis test

3.5. Razina biokemijskih markera koštane pregradnje postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze

Analizom biokemijskih markera u serumu pokušali smo odgovoriti na pitanje postoji li razlika u razinama osteokalcina i beta-crosslapsa kod sudionica koje su imale osteoporozu i onih bez osteoporoze. Razine biokemijskih markera koštane pregradnje osteokalcina i beta-crosslapsa činile su se veće u postmenopauzalnih žena s osteoporozom u odnosu na žene bez osteoporoze što se moglo očekivati s obzirom da se vrijednosti biokemijskih markera koštane pregradnje povećavaju kod osteoporoze. Međutim, Studentov t-test nije pokazao statistički signifikantnu razliku mjerenih parametara (Tablica 9). Vjerojatni razlog je metodologija analize koja rezultira velikim koeficijentom varijacije (65.4% kod OP, odnosno 55% kod noOP za osteokalcin, te 51.6% kod OP, odnosno 49.5% kod noOP za beta-crosslaps).

Tablica 9. Razine biokemijskih markera koštane pregradnje u postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze

Biokemijski markeri	**Žene s osteoporozom**	**Žene bez osteoporoze**	**p***
Osteokalcin	7.87 ± 5.15 µg/L	6.24 ± 3.43 µg/L	1.06
Beta-crosslaps	0.504 ± 0.26 µg/L	0.424 ± 0.21 µg/L	1.07

*Studentov t-test

4. RASPRAVA

S obzirom na to kako osobitosti ispitanica koje sudjeluju u ispitivanju utječu na rezultate studije bitno je da studijska populacija bude genetički i etnički homogena. Naše istraživanje bazirano je na ženama istog etničkog podrijetla i iste genetičke osnove. U pokušaju identifikacije gena koji su uključeni u regulaciju koštane mase u žena u postmenopauzi ispitani su polimorfizmi OPG gena, A163G i T245G, kod dvije skupine ispitanica: žena s osteoporozom (OP) i žena bez osteoporoze (noOP). Izvršena su i mjerenja biokemijskih markera koštane pregradnje osteokalcina i beta-crosslapsa u obje skupine ispitanica. Postmenopauzalna osteoporoza je poligenetička bolest u kojoj sve veći broj varijacija u genima koji su uključeni u koštani metabolizam ukazuje na to kako su upravo oni regulatori koštane mase. Nekolicina istraživača utvrdila je kako ključnu ulogu u patogenezi postmenopauzalne osteoporoze ima RANK/RANKL/OPG put. RANK kao osteoklasni membranski receptor potreban u osteoklasnom prijenosu signala nakon čega slijedi vezanje RANKL-a (Vega i sur., 2007). Stoga su geni uključeni u ekspresiju bilo koje komponente OPG-RANK-RANKL sustava su mogući kandidati za pronalaženje gena odgovornog za nastanak osteoporoze.

Nekoliko skupina istraživača proučavali su povezanost između polimorfizama u OPG genu i mineralne gustoće kosti (BMD-a) i svi su pri tome koristili metodu izolacije genomske DNA iz leukocita periferne krvi. Stoga smo u našoj studiji koristili istu metodu, jer je dokazana u znanstveno-istraživačkom radu polimorfizma OPG gena i superiorna nad bilo kojom drugom metodom izolacije DNA korištenom u tu svrhu.

U Irskoj, Malti te Japanu je utvrđena potpuna povezanost između A163G, G209A i T245G polimorfizama u OPG genu, te je T245G izabran kao predstavnik za analizu. Zanimljivo je da su rezultati naše studije, za A163G polimorfizam OPG gena u skladu s rezultatima studije u kineskoj populaciji (Hsu i sur., 2006), koja je etnički i rasno u potpunosti različita od naše populacije, ali ne odgovara rezultatima istraživanja Langdahla i sur., 2002, koji nisu pronašli potpunu povezanost između A163G i T245G polimorfizama postmenopauzalnih žena iz Danske. Arko i suradnici izvijestili su kako postoji veza između OPG T245G polimorfizma i BMD-a lumbalne kralješnice i kuka, što je u skladu s prezentiranim nalazom. Isto tako, utvrđeno je kako je OPG T245G polimorfizam povezan s BMD-om lumbalne kralješnice i vratom bedrene kosti kod postmenopauzalnih žena s GG genotipom, te isti predstavlja čimbenik rizika za smanjenje BMD-a (Yamada i sur., 2003). Također je potvrđeno kako je G

alel u OPG T245G polimorfizmu povezan s frakturom kralješaka kod Dankinja (Langdahl i sur., 2002), no zbog malog uzorka našeg istraživanja, nismo bili u mogućnosti proučiti povezanost fraktura kralješaka u naših ispitanica s učestalošću T245G polimorfizma u OPG genu.

U Sloveniji je potvrđena povezanost između G1181C polimorfizma u OPG genu i BMD između žena u postmenopauzi, ali nije pronađena efektivna doza C alela (Arko i sur., 2005). Dok istraživanje koje je provedeno u Danskoj (Langdahl i sur., 2002) ukazuje na to da C aleli smanjuju produkciju OPG-a ili pak dovode do nastanka funkcionalno neispravnog OPG-a.

Nadalje, treba napomenuti kako nisu primjećene nikakve značajne veze između OPG G1181C polimorfizma i BMD u postmenopauzalnih žena u Japanu, Irskoj i na Malti (Ohmori i sur., 2002; Vidal i sur,. 2006). Ovi rezultati ukazuju na to da se učestalost genotipova G1181C polimorfizma u OPG genu i njihov utjecaj na koštanu masu može razlikovati među različitim etničkim grupama, ali i među različitim zemljama istog etniciteta. Međutim mehanizam kojim G1181C polimorfizam u OPG genu utječe na BMD ostaje nerazriješen , iako je dokazano da mijenjanje treće aminokiseline za OPG iz bazičnog lizina u prazni polarni asparagin može utjecati na kinetiku izlučivanja OPG-a (Arnold i sur., 1990).

Razine OPG-a u serumu žena s CC genotipom bile su niže nego u žena s drugim genotipovima, ali razlika nije dostigla statističku značajnost. Stoga su potrebna dodatna funkcionalna istraživanja G1181C polimorfizma u OPG genu kako bi se utvrdilo utječe li polimorfizam na kinetiku izlučivanja OPG-a. Općenito se smatra kako udružena istraživanja haplotipnih analiza predstavljaju bitan čimbenik za određivanje genetičkih značajki uobičajenih bolesti. Međutim, haplotip analiza u kombinaciji na OPG T245G i G1181C polimorfizmu nije pronašla značajnu povezanost s prilagođenim BMD-om bilo kojeg mjerenog skeletnog mjesta. Drugim riječima, analiza haplotipova rezultirala je nestankom značajnog učinka OPG G1181C polimorfizma na koštanu masu. Ravnoteža između OPG-a i RANKL-a može predstavljati značajan čimbenik aktivnosti osteoklasta i resorpcije kosti. U ovom istraživanju nema značajne razlike u koncentraciji OPG-a. Nadalje, slični trendovi u razini serumskih biljega koštane pregradnje utvrđeni su među genotipovima OPG i RANKL polimorfizama (Zhao i sur., 2005) koji su izvijestili kako ne postoji razlika u serumu OST razine između OPG G1181C genotipova.

Opisani su slijedeći polimorfizmi za pojedine nukleotide (od eng. single nucleotide polymorphsm, skraćeno SNP) u OPG genu: 163A->G, 209G->A, 245T->G, 889C->T,

950T->C, 1181G ->C i 6890A->C (Ohmori i sur., 2002; Arko i sur., 2002; Wynne i sur., 2002). 950T->C polimorfizam OPG gena , kao i 223T->C SNP (Ohmori i sur 2002) povezani su s gustoćom koštane mase mjerenom na radijusu postmenopauzalnih Japanki, te genotip TT predstavlja faktor rizika za smanjenje BMD-a. U našoj studiji razine osteokalcina i beta-crosslapsa u (OP) činile su se veće nego li kod (noOP) što se i moglo očekivati s obzirom da se vrijednosti biokemijskih markera koštane pregradnje povećavaju kod osteoporoze. Međutim, Studentov t-test nije pokazao statistički signifikantnu razliku mjerenih parametara ($p>0.5$). Nismo uspjeli pokazati povezanost između proučavanih polimorfizama u OPG genu i njihovog utjecaja na razlike u razinama biokemijskih markera koštane pregradnje. Takav rezultat u korelaciji je s nedavnim istraživanjem u Sloveniji u kojemu se utvrdilo kako razine osteokalcina i beta-crosslapsa nemaju značajnu povezanosti s određenim genotipovima polimorfizma OPG gena (Zupan i sur., 2009).

Česti problem udruženih istraživanja je nedostatak konsenzusa između studija. Takva nedosljednost u rezultatima može nastati zbog veličine studijske grupe, mjesta mjerenja BMD-a, statističke analize, etničke pozadine i slično. Ukoliko se ti čimbenici ne kontroliraju na odgovarajući način pravi rezultati izostaju (Deng i sur., 1999). Ovo istraživanje je sastavljeno od etnički homogenih Hrvatica. Prije izrade ovog rada obavljena je adekvatna statistička analiza nakon prilagodbe za dob, indeks tjelesne mase i godine prije nego li je uslijedila menopauza. Treba napomenuti kako je relativno mali broj žena koje su sudjelovale u istraživanju koje smo provodili. Stoga su potrebna daljnja istraživanja u većim populacijama kako bismo mogli dobiti što kvalitetnije i točnije rezultate koji bi se mogli vjerodostojnije usporediti s rezultatima prethodnih studija.

5. ZAKLJUČCI:

- Provedena analiza A163G i T245G OPG polimorfizama pokazala je da je gen A163G mogući kandidat za predviđanje razvoja osteoporoze u postmenopauzalni žena.
- Postoji mogućnost da se u kuku žena s osteoporozom potiče pojačana ekspresija A163G gena te na taj način aktivacija faktora koji pridonose slabijoj mineralnoj gustoći kostiju.
- Razine biokemijskih markera koštane pregradnje osteokalcina i beta-crosslapsa nisu se razlikovale između postmenopauzalnih žena s osteoporozom i bez osteoporoze, premda dobiveni rezultati ukazuju da takova razlika ipak postoji; trebalo bi primijeniti druge načine obrade dobivenih podataka, kako bi se te razlike eventualno dokazale.
- Iako su dobiveni određeni rezultati, potrebna su dodatna biološka istraživanja kako bi se potvrdio utjecaj OPG polimorfizma na BMD kod postmenopauzalnih žena s osteoporozom.
- Geni uključeni u ekspresiju bilo koje komponente OPG-RANK-RANKL sustava mogući su kandidati za pronalaženje gena odgovornog za nastanak osteoporoze.

6. LITERATURA

Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. 2004. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 118:149-61.

Arko B, Prezelj J, Kocijancic A, Komel R, Marc J. 2005. Association of theosteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density inpostmenopausal women. Maturitas 51: 270-279.

Arnold A, Horst SA, Gardella TJ, Baba H, Levine MA, Kronenberg HM. 1990. Mutations of the signal peptide encoding region of the preproparathyroid hormone gene in familial isolated hypoparathyroidism. J Clin Invest 1084-1087.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. 2003. Osteoclast differentiation and activation. Nature 423:337-442.

Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE 2007. Osteoblastsand bone formation. Acta Reumatológica Portuguesa 32:103-110.

Camacho P, Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover. In: MurrayJ, Favus, editors. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineralmetabolism. 6th ed. Washington: American Society for Bone and Mineral Research, USA. p. 2006. 127-133.

Choi JY, Shin A, Park SK, et al. 2005. Genetic polymorphisms of OPG,RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausalwomen. Calcif Tissue Int 77:152-159.

Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, Blumsohn A, Eastell R. 2002. Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. Bone 30:886-890.

Collins A, Cashman KD, Kiely M. 2006. Phylloquinone (vitamin K_1) intakes and serum undercarboxylated osteocalcin levels in Irish postmenopausal women. Br J Nutr 95:982-988.

Compston JE. 2002. Bone marrow and bone a functional unit. J Endocrinol 173:387-394.

Cundy T, Reid IR, Grey A. Metabolic bone disease. 2008. In: Clinical Biochemistry. Metabolic and Clinical Aspects. Marshall JW, Bangert S. 2nd ed. London, New York, Oxford: Churchill Livingstone, Elsevier Edinburgh pp: 629-659.

Cvijetić S, Grazio S, Kastelan D, Korsić M. 2007. Epidemiology of osteoporosis. Arh Hig Rada Toksikol 58:13-18.

Čepelak I, Čvorišćec D. 2009. Biokemijski biljezi pregradnje kostiju-pregled. Biochemia Medica 19:17-35.

Deng HW, Li J, Li JL, Johnson M, Gong G, Recker RR. 1999. Association ofVDR and estrogen receptor genotypes with bone mass in postmenopausal Caucasian women: different conclusions with different analysisand the implications. Osteoporos Int 9:499-507.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. 1996. Increased bone formation in osteocalcindeficient mice. Nature 382:448-452.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblastunder central surveillance. Science 289:1501-1504.

Francis RM, Aspray TJ, Hide G, Sutcliffe AM, Wilkinson P. 2008. Back pain in osteoporotic vertebral fractures. Osteoporos Int 19:895-903.

Garnero P. 2008. New biochemical markers of bone turnover. IBMS Bonekey 5:84-102.

Geusens P. 2009. Emerging treatments for postmenopausalosteoporosis-focus on denosumab. Clinical intervention in aging 4:241-250.

Gue´guen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G.1995. Segregation analysis and variance componentsanalysis of bone mineral density in healthy families. J Bone Miner Res 12:2017-2022.

Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A, Moratto D, Mazzolari E, Clayton-Smith J,Orchard P, Coxon FP, Helfrich MH, Crockett JC, Mellis D, Vellodi A, Tezcan I, Notarangelo LD, Rogers MJ, Vezzoni P, Villa A, Frattini A. 2008 Human osteoclast-poor osteopetrosiswith hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. Am J Hum Genet 83:64-76.

Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. 2001. Cancellous boneremodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressingosteoblastic markers. J Bone Miner Res 16:1575-1582.

Hayashi S, Miyamoto A, Yamane T, et al. 1997. Osteoclast precursors in bonemarrow and peritoneal cavity. J Cell Physiol 170:241-247.

Hsu YH, Niu T, Terwedow HA, et al. Variation in genes involved in theRANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated withbone mineral density at different skeletal sites in men. Hum Genet 2006; 118:568-577.

Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ 3rd, Khaltaev N. 2008. A reference standard for the description of osteoporosis. Bone 42:467-475.

Kanis JA, Melton 3rd LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. 1994. The diagnosis of osteoporosis. J BoneMiner Res 9:1137-1141.

Kasperk C, Ziegler R. 1998. Bone and mineral metabolism. In: Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. Thomas L. ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 215-230.

Katagiri T, Takahashi N. 2002. Regulatory mechanisms of osteoblast andosteoclast differentiation. Oral Dis 8:147-159.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93:165-176.

Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. 2002. Polymorphismsin the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures.J Bone Miner Res 17:1245-1255.

Lee AJ, Hodges S, Eastell R. 2000. Measurement of osteocalcin. Ann Clin Biochem 37:432-446.

Mackie EJ. Osteoblasts 2003. Novel roles in orchestration of skeletal architecture. Int J Biochem Cell Biol 35:1301-1305.

Marriott I. 2004. Osteoblast responses to bacterial pathogens: a previouslyunappreciated role for bone-forming cells in host defense and diseaseprogression. Immunol Res 30:291-308.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. 2000. Proteinexpression and functional difference of membraneboundand soluble receptor activator of NF-kappaBligand: modulation of the expression by osteotropicfactors and cytokines. Biochem Biophys Res Commun 275:768-775.

Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. 2002. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis, J. Hum. Genet. 47:400-406.

Pap T, Claus A, Ohtsu S, et al. 2003. Osteoclast-independent bone resorption byfibroblast-like cells. Arthritis Res Ther 5:163-173.

Riggs BL, Melton LJ. 1995. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. Bone 17(Suppl):505-511.

Rodan GA, Martin TJ. 2000. Therapeutic approaches to bone diseases. Science 289:1508-1514.

Seibel MJ, Woitge WH. 1999. Biochemical markers of bone metabolism - Part I: Basic principles. Clin Lab 45:237-256.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. 1997. Osteoprotegerin: a novel secretedprotein involved in the regulation of bone density. Cell 89:309-319.

Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, Faulkner KG,Wehren LE, Abbott TA, Berger ML, Santora AC,Sherwood LM.2001. Identification and fracture outcomesof undiagnosed low bone mineral density in postmenopausalwomen: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. JAMA 286:2815-2822.

Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, Abinun M, PangrazioA, Susani L, Bredius R, Mancini G, Cant A, Bishop N,Grabowski P, Del Fattore A, Messina C, Errigo G, Coxon FP, Scott DI, Teti A, Rogers MJ, Vezzoni P, Villa A, HelfrichMH. 2007. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutationsin the gene encoding RANKL. Nat Genet 39:960-962.

Szulc P, Delmas P. 2008. Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. Osteoporos Int. 19:1683-1704.

Takahashi M, Kawana K, Nagano A. 2002. Biological variability of biochemical markers of bone turnover in healthy women. Endocr Res 28:257-264.

Tat ST, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M, Pelletier JM. 2009. New perspective in osteoarthritis: the OPG andRANKL system as a potential therapeutic target? Keio J Med 58:29-40.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts 2000. Science 289:1504-1508.

Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. 2004. Themolecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration ofpathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev 15:457-475.

Vidal C, Brincat M, Anastasi X. 2006. TNFRSF11B gene variants and bonemineral density in postmenopausal women in Malta. Maturitas 53:386-395.

Vigorita VJ. Orthopaedic pathology. 1998. Philadelphia: J.B. Lippincot Co.

Villa A, Guerrini MM, Cassani B, Pangrazio A, SobacchiC. 2009. Infantile malignant, autosomal recessive osteopetrosis:the rich and the poor. Calcif Tissue Int 84:1-12.

Weinstein RS, Manolagas SC. 2000. Apoptosis and osteoporosis. Am J Med 108:153-164.

Whyte MP, Mumm S. 2004. Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway. J Musculoskel Neuron Interact 4:254-267.

Withold W. 1996. Monitoring of bone turnover biological, preanalytical and technical criteria in assessment of biochemical markers. Eur J Clin Chem Clin Biochem 34:785-799.

Wynne F, Drummond F, O_Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA. 2002. Investigation of the genetic influenceof the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms onBMD in the Irish population, Calcif. Tissue Int. 71:26-35.

Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. 2003. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density inJapanese women but not men. Mol Genet Metab 80:344-349.

Zhao HY, Liu JM, Ning G, et al. 2005. The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. Osteoporos Int 16:1519-1524.

WEB :

Web 1: http://medicinapertutti.altervista, 30.7.2013.

Web 2: http://www.solunetti.fi/tiedostot/kuvat_histologia/Luu/klasts.jpg, 30.7.2013.

Web 3: http://www.zzjzpgz.hr/nzl/40/23.jpg, 1.8.2013.

Web 4: http://seniorji.info/slike/dodatno/2004_7004_osteporoza_220.jpg, 1.8.2013.

Web 5: http://www.biochemia-medica.com/system/files/19, 2.8.2013.

Web 6: http://opvk2011.ptacisvet.cz/texty_cz/popis_metod-pcr-prubeh_metod.png, 14.8.2013.

Web 7: www.biochemia-medica.com

Web 8: www.zdravobudi.hr

Web 9: www.plivazdravlje.hr