



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Vladimir Z. Vranić

**Povezanost polimorfizma u genu za receptor
vitamina D sa genskom predispozicijom i
kliničkim parametrima obolelih od osteoartritisa
velikih zglobova**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Vladimir Z. Vranić

**Association of vitamin D receptor gene
polymorphism with genetic predisposition and
clinical parameters in patients with osteoarthritis
of the large joints**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2022.

Autor
Ime i prezime: Vladimir Vranić
Datum i mesto rođenja: 05.03.1977. Podujevo
Sadašnje zaposlenje: Klinika za ortopedsku hirurgiju i traumatologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu
Doktorska disertacija
Naslov: Povezanost polimorfizma u genu za receptor vitamina D sa genskom predispozicijom i kliničkim parametrima obolelih od osteoartritisa velikih zglobova
Broj stranica: 40
Broj slika: 11
Broj bibliografskih podataka: 123
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Vojnomedicinska akademija u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja, laboratorija za molekularnu genetiku
Naučna oblast (UDK):
Mentor: dr Gordana Šupić, vanredni profesor Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije u Beogradu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme:
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije: 01-16503/3-9 25.12.2019.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: 1.Prof.dr. Branko Ristić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Hirurgija, predsednik 2.Doc.dr Mirjana Veselinović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Interna medicina, član 3.Dr.sci.med. Nemanja Rančić, naučni saradnik Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Farmakologija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: 1. 2. 3.
Datum odbrane disertacije:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na Vojnomedicinskoj akademiji, na Institutu za medicinska istraživanja, u Laboratoriji za molekulska genetiku, pod rukovodstvom prof. dr Gordane Šupić, vanrednog profesora Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije, Univerziteta odbrane.

Koristim ovu priliku da se srdačno zahvalim svom mentoru prof. dr Gordani Šupić na svesrdnoj i veoma profesionalnoj podršci u svim fazama izrade ove disertacije. Zahvaljujem se na učešću u eksperimentalnom delu rada i prof dr Katarini Zeljić, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, kao i dipl. biol. Marii Mihailović, koja je iz jednog dela ove studije i odbranila master rad. Takođe se zahvaljujem i članovima komisije na korisnim sugestijama u toku završne faze izrade ovog rada.

Beskrajno se zahvaljujem svojoj porodici, roditeljima i stricu koji su me iskreno i svakodnevno podržavali za sve vreme trajanja ovog, meni vrlo važnog projekta.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Osteoartritis	1
1.1.1. Epidemiologija.....	1
1.1.1.1 Prevalenca i incidenca.....	1
1.1.1.2. Faktori rizika.....	1
1.1.2. Patogeneza.....	3
1.1.2.1. Struktura zglobne hrskavice i promene u sklopu osteoartritisa.....	3
1.1.2.2. Promene na kostima i sinovijalnim membranama.....	4
1.1.3. Dijagnoza.....	5
1.1.4. Terapija.....	8
1.2. Vitamin D.....	11
1.2.1. Uloge vitamina D.....	11
1.2.2. Metabolizam vitamina D.....	11
1.2.3. Receptor za vitamin D.....	12
1.2.4. Gen koji kodira receptor za vitamin D.....	14
1.2.5. Uloga vitamina D u razvoju osteoartritisa.....	16
1.2.5.1. Deficijencija vitamina D i osteoartritis.....	18
2. CILJEVI RADA.....	19
3. HIPOTEZE.....	20
4. MATERIJAL I METODE.....	21
4.1 Učesnici studije.....	21
4.2 Biološki uzorci i izolacija DNK.....	23
4.3 Genotipizacija polimorfizama nukleotidne sekvence FokI(rs2228570), TaqI(rs731236), ApaI (rs7975232) i EcoRV (rs4516035) u VDR genu...24	
4.4 Statistička analiza.....	26
5. REZULTATI.....	27
6. DISKUSIJA.....	34
7. ZAKLJUČCI.....	40
8. REFERENCE.....	41

SAŽETAK

Uvod. Osteoartritis je degenerativna, hronična i ireverzibilna bolest koja pogađa milione ljudi širom sveta. Uzroci i mehanizmi osteoartritisa nisu do kraja razjašnjeni. Vitamin D je bitan faktor u metabolizmu kostiju. Njegovo delovanje posreduje vitamin D receptor, faktor transkripcije koji kontroliše ekspresiju gena, održavajući na taj način homeostazu kalcijuma i fosfata. Hipoteza o vitaminu D je da igra ključnu ulogu u brojnim mišićno-koštanim bolestima, uključujući osteoartritis, a njegov nedostatak preovlađuje među pacijentima s osteoartritisom.

Polimorfizmi gena za receptor vitamina D (VDR) mogli bi da igraju značajnu ulogu u genetskoj predispoziciji i patogenezi osteoartritisa (OA), najčešćeg degenerativnog poremećaja zglobova kod ljudi.

Cilj. Cilj ove doktorske disertacije bilo je utvrđivanje postojanja povezanosti između polimorfizama FokI, TaqI, ApaI i EcoRV u VDR genu s rizikom za nastanak i progresiju osteoartritisa u domaćoj populaciji. Urađen je veliki broj studija u vezi s efektima vitamina D na patogenezu i progresiju osteoartritisa, kao i njegovom upotrebom kao terapijskog sredstva. Do sada su studije dale kontroverzne rezultate i nije postignut konsenzus po tom pitanju. Našim radom želimo da istražimo trenutne podatke o mogućoj ulozi vitamina D i njegovog receptora u patogenezi osteoartritisa, i procenimo efikasnost suplementacije vitamina D kao terapijske strategije.

Materijal i metode. Studijska grupa ispitanika je obuhvatila ukupno 94 pacijenta s OA, a kontrolna grupa 100 zdravih, asimptomatskih osoba odgovarajuće polne i starosne distribucije. Polimorfizmi FokI (rs2228570), TaqI (rs731236), ApaI (rs7975232) i EcoRV (rs4516035) u VDR genu su određivani pomoću metode PCR-a u realnom vremenu (Real-time PCR).

Rezultati. Analiza prilagođenog odnosa šansi (OR) pokazala je da su polimorfizmi VDR TaqI i FokI značajno povezani s predispozicijom za OA (OR = 1,986, $p = 0,001$, odnosno OR = 1,561, $p = 0,017$). Analiza specifična za tip zglobova pokazala je da je polimorfizam VDR TaqI povezan s rizikom nastanka OA kuka (OR = 1,930, $p = 0,005$) i OA kolena (OR = 1,916, $p = 0,028$), dok je polimorfizam VDR FokI povezan s višim rizikom pojave OA kolena (OR = 2,117, $p = 0,012$). Polimorfizmi VDR TaqI i FokI povezani su s pojavom trajnog bola ($p = 0,005$, odnosno $p = 0,027$), dok je ApaI povezan s porodičnom istorijom OA ($p = 0,004$).

Zaključak. Genetske varijante VDR FokI i TaqI bi mogle značajno doprinostiti riziku za nastanak osteoartritisa, pojavi trajnog bola i potencijalno riziku za pojavu OA specifičnog za tip zgloba.

Ključne reči: vitamin D; Receptor za vitamin D; VDR; Genetski polimorfizmi; Osteoartritis.

ABSTRACT

Introduction. Osteoarthritis is a degenerative, chronic and irreversible disease that affects millions of people around the world. The causes and mechanisms of osteoarthritis are not fully understood. Vitamin D is an important factor in bone metabolism. Its action is mediated by the vitamin D receptor, a transcription factor that controls gene expression, thus maintaining the homeostasis of calcium and phosphate. The vitamin D hypothesis is that it plays a key role in a number of musculoskeletal diseases, including osteoarthritis, and its deficiency is prevalent among patients with osteoarthritis.

Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms could play a significant role in the susceptibility and pathogenesis of osteoarthritis (OA), the most common degenerative joint disorder in humans.

Aim. The aim of the doctoral dissertation was to determine the association between polymorphisms FokI, TaqI, ApaI and EcoRV in VDR gene, with risk for the onset and progression of osteoarthritis in the local population. A large number of studies have been done regarding the effects of vitamin D on the pathogenesis and progression of osteoarthritis, as well as its use as a therapeutic agent. So far, studies have yielded controversial results and no consensus has been reached on the issue. Our work aims to investigate current data on the possible role of vitamin D and its receptor in the pathogenesis of osteoarthritis and to evaluate the efficacy of vitamin D supplementation as a therapeutic strategy.

Material and methods. The current study involved 94 OA patients, and 100 healthy, asymptomatic controls. *VDR* variants FokI (rs2228570), TaqI (rs731236), ApaI (rs7975232) and EcoRV (rs4516035) were genotyped using the TaqMan based Real-Time PCR.

Results. Adjusted Odds Ratio (OR) analysis showed that *VDR* TaqI and FokI polymorphisms are significantly associated with the susceptibility to OA (OR=1.986, $p=0.001$, and OR=1.561, $p=0.017$, respectively). The joint-specific analysis showed that *VDR* TaqI polymorphism was associated with a risk of hip OA (OR=1.930, $p=0.005$) and the knee OA (OR=1.916, $p=0.028$), while *VDR* FokI polymorphism was associated with the higher risk of knee OA (OR=2.117, $p=0.012$). *VDR* TaqI and FokI polymorphisms are associated with the occurrence of persistent pain ($p=0.005$, and $p=0.027$, respectively), while ApaI was associated with a family history of OA ($p=0.004$).

Conclusion. The *VDR* FokI and TaqI genetic variants significantly contribute to osteoarthritis susceptibility, the occurrence of persistent pain, and potentially to joint-specific OA risk.

Key words: Vitamin D; Vitamin D Receptor; *VDR*; Genetic polymorphisms; Osteoarthritis.

1. UVOD

1.1. Osteoartritis

Osteoartritis (OA) je degenerativna, progresivna bolest zglobova i najčešći uzrok invaliditeta kod starijih osoba. Procesom može biti zahvaćen jedan ili više zglobova, a najčešće su pogođeni sinovijalni noseći zglobovi (kuk, koleno), ali često i mali zglobovi šaka.

1.1.1. Epidemiologija

1.1.1.1. Prevalenca i incidenca

Osteoartritisom je pogođeno oko 15 % stanovništva i kao takav predstavlja najučestalije oboljenje zglobova (1). Osteoartritis uzrokuje invaliditet u oko 3,3 % globalne populacije (2). U osnovi procesa je neadekvatna sposobnost kvalitativno izmenjenog articularnog hrskavičavog tkiva, u smislu povećanog sadržaja vode, smanjene koncentracije proteoglikana i poremećaja organizacije kolagenih vlakana, da apsorbira mehanički stres, s posledičnom progresivnom dezintegracijom hrskavičavog tkiva, subhondralnom sklerozom koštanog tkiva, te koštanom proliferacijom, koja se manifestuje formiranjem osteofita, zatim cističnim formacijama i reaktivnim sinovitisom (3, 4).

Više studija bavilo se incidencom OA, pa je tako u jednoj koja trajala dvanaest godina i obuhvatila 258 osoba starijih od 45 godina, pokazano da 25 % žena i 10 % muškaraca pokazuje znake OA kolena na radiografijama (5). Incidenca OA promena na malim zglobovima šaka je iznosila je 13,6 %, a OA kolena 4,5 % u petogodišnjem praćenju osoba od 75 do 79 godina (6). U studijama evropske populacije iz devedesetih godina prošlog veka, francuskih autora, srednja starosna dob za pojavu OA kod žena je bila 56,6 godina (± 12), uz promene na lateralnom femoropatelnom kompartmanu, te 62,7 godina (± 12) s promenama u medijalnim femorotibijalnom, odnosno 69,2 godina (± 10) uz prateće lateralne femorotibijalne promene (7). Na drugoj strani, podaci iz SAD pokazuju ukupnu incidencu simptomatski manifestnog OA kolena i kukova od oko 200/100.000 osoba godišnje, uz izraženo učestaliju pojavu OA kuka kod žena, ali uz podjednaku raspodelu učestalosti OA kolena među polovima (8). U više različitih studija pojavljuju se podaci o učestalijoj pojavi OA šaka kod žena nego kod muškaraca, i taj odnos varira od 1,5-4:1 u zavisnosti od autora.

1.1.1.2. Faktori rizika

Poznati su brojni faktori rizika koje možemo podeliti na sistemske (sociodemografski faktori, ishrana i uzimanje vitamina, gojaznost, genetička predispozicija) i lokalne (fizička aktivnost i veliko opterećenje zgloba, povrede zgloba, oblik i orijentacija zgloba, snaga mišića), a koji u kombinaciji uzrokuju oštećenje hrskavice i naknadnu pregradnju kostiju.

Starosna dob

Iako verovatnoća za nastanak OA raste sa starošću pacijenta, postoji jasna distinkcija između promene hrskavice kod OA od onih koje vezujemo za involutivne promene u sklopu normalnog procesa starenja. Biohemijske i ćelijske karakteristike hrskavičavog tkiva, u ta dva različita stanja, ogledaju se u povećanom sadržaju vode i izmenjenoj organizaciji

kolagena kod OA, za razliku od sniženog sadržaja vode, hipertrofije hondrocita uz smanjen broj istih u okviru normalnog procesa starenja, kao i smanjene količine proteoglikana u oba stanja.

Osteoartritis može biti primarni (idiopatski) ili sekundarni (9). Idiopatski se javlja u dve forme: lokalizovanoj i generalizovanoj. Ovu poslednju opisali su Kellgren i Moore kao OA tri ili više zglobova. Ako su nastanak i progresija bolesti indukovani nekom povredom, stanjem, deformitetom ili sistemskim oboljenjem, govorimo o sekundarnoj formi osteoartritisa, a obe forme imaju isti klinički epilog. Nezahvalno je procenjivati incidencu primarne u odnosu na sekundarnu formu osteoartritisa, s obzirom na preovlađujući stav da većinu slučajeva koje smatramo idiopatskim ipak uzrokuje neko stanje koje samo nije dijagnostikivano pre pojave manifestnog OA (10).

Pol

Pol je značajan faktor rizika, pri čemu je OA češći kod žena u postmenopauzi. Skoro 10 % muškaraca i oko 20 % žena starijih od 60 godina pati od neke forme osteoartritisa (11). Izostanak protektivne uloge estrogena nakon menopauze najverovatniji je uzrok veće incidence osteoartritisa kod žena (12).

Telesna težina

Zemlje s višim životnim standardom, u kojima je viši prosečan ljudski vek, kao i učestalija pojava dijabetesa i gojaznosti u populaciji, trpe ogromne ekonomske posledice invaliditeta uzrokovanog osteoartritisom, za koji se procenjuje da će biti u velikom porastu u godinama pred nama (11). S obzirom na to da OA najčešće pogađa velike zglobove koji nose težinu, kao što su kolena i kukovi, gojaznost je logičan i očigledan faktor rizika za progresiju osteoartritisa. Dokazano je da rizik od nastanka osteoartritisa kolena raste čak 33 % za svakih pet jedinica povećanja indeksa telesne mase (BMI - Body Mass Index), pri čemu se rizik za nastanak i progresiju osteoartritisa redukuje 50 % za svako smanjenje telesne težine od 5 kg (1).

Etničke i geografske specifičnosti

Dodatna diskrepanca između visoke učestalosti osteoartritisa kukova među stanovništvom Evrope i SAD, u odnosu na retku pojavu oboljenja u Jugoistočnoj Aziji, objašnjava se i anatomskim razlikama u obliku karlice, što čini geografsku, odnosno etničku razliku (13).

Genetička predispozicija

Osteoartritis pokazuje osobine nasledne predispozicije, dokazane studijama blizanaca i studijama porodice u kojima je demonstrirana heritabilnost od 50-65 % (14). Identifikovano je više od 20 genskih lokusa, koji se dovode u vezu s nastankom osteoartritisa (15).

Ishrana i uzimanje vitamina

Ishrana deficitarna vitaminom D₃, vitaminom C, kalcijumom i/ili dijetetskim vlaknima, povećava rizik od nastanka i progresije osteoartritisa. Dokazano je da ishrana koju nazivamo mediteranskom nosi niži rizik za pojavu osteoartritisa (16).

Lokalni faktori rizika

Fizička aktivnost, upotreba i povrede zglobova

Intenzivnija eksploatacija i povrede zglobova udružene su s povećanom incidencom osteoartritisa (1).

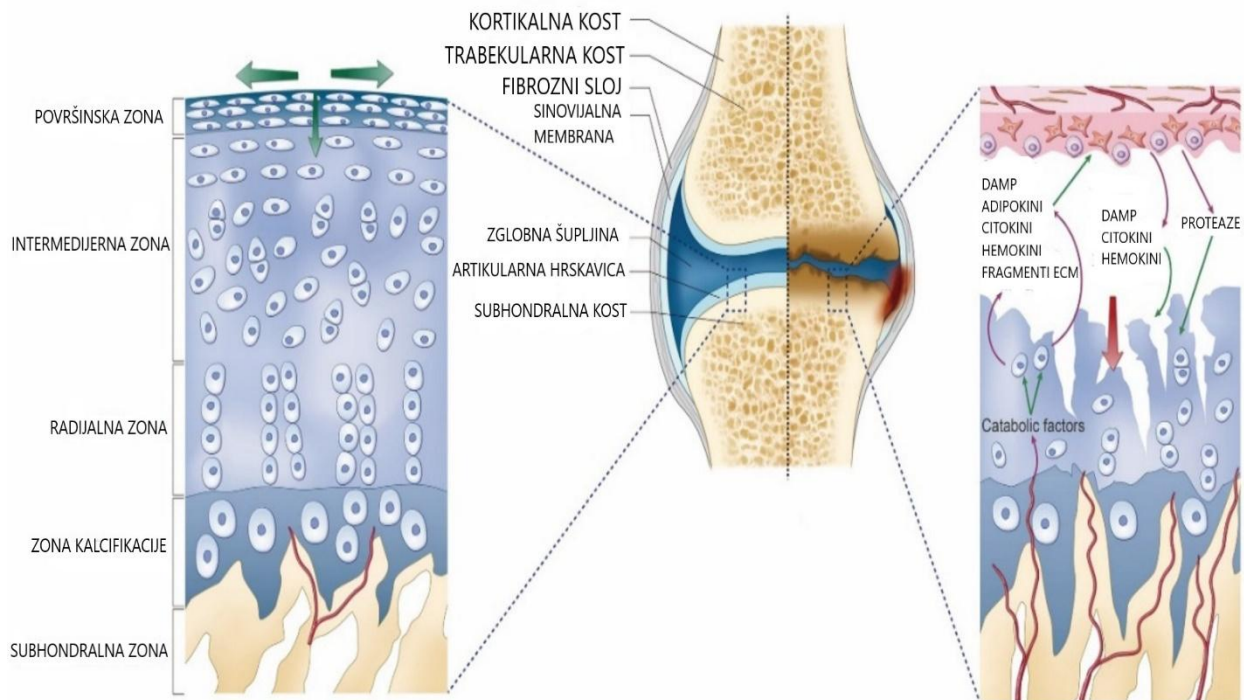
1.1.2. Patogeneza

Primarne pretpostavke su polazile od teze da je centralni događaj u pojavi OA propadanje intraartikularne hrskavice, ali danas znamo da su procesom zahvaćena i ostala tkiva koja ulaze u sastav zgloba. Ipak, gubitak preventivne uloge hrskavice jeste inicijalni proces, usled koga subhondralna kost biva izložena povećanom mehaničkom pritisku, koji dovodi do njene hipertrofije, remodelacije i degeneracije, što se manifestuje pojavom skleroze kosti i osteofitičnih izraštaja. Degenerativnim promenama podležu i okolni mišići i ligamenti, a sinovijalne membrane pokazuju znake inflamacije. Zglob vremenom potpuno gubi svoju morfološki strukturu i funkciju (17).

1.1.2.1. Struktura zglobne hrskavice i promene u sklopu osteoartritisa

Zglobna hrskavica se sastoji iz proteina – kolagena tipa II i proteoglikana, koji su odgovorni za elastičnost hrskavičavog tkiva, ćelija – hondrocita, koji proizvode komponente matriksa, kao i tkivne tečnosti odgovorne za difuziju hranljivih materija, s obzirom na to da je ovo tkivo avaskularno. Hondrociti su jedine ćelije tkiva zglobne hrskavice, a u zdravoj hrskavici se nalaze u prehipertrofičkom stadijumu diferencijacije. Ove ćelije stalno održavaju ravnotežu između produkcije novog matriksa i njegove razgradnje, koju obezbeđuju produkcijom enzima metaloproteinaza.

Usled povećane eksploatacije zgloba ili sekundarnih opterećenja, kao što su povrede, dolazi do inicijalne aktivacije imunskog sistema i produkcije proinflamatornih medijatora, kao što su citokini (interleukin – 1 (IL-1), interleukin – 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora – alfa (TNF- α)), od strane ćelija sinovijalnih membrana, kao i aktivacije proteolitičkih enzima, u prvom redu matriksnih metaloproteinaza - MMPs (stromelizina, plazmina i agrekanaze – 1), kao posledice disbalansa između tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza – TIMPs i matriksnih metaloproteinaza - MMPs. Aktivirani proteolitički enzimi direktnim dejstvom oštećuju strukturu zglobne hrskavice, a pod dejstvom citokina dolazi do aktivacije hondrocita, koji menjaju strukturu ekstracelularnog matriksa. Primarno hondrociti reaguju hipertrofijom i hiperprodukcijom kvalitativno izmenjenog matriksa, što narušava integritet hrskavičavog tkiva, te hondrociti vremenom podležu apoptozi, procesu programirane ćelijske smrti, s posledičnim gubitkom hrskavičavog tkiva i daljim oštećenjima subhondralne kosti (Slika 1) (18, 19, 20).



Slika 1. Mehanizmi nastanka osteoartritisa kolena

Zdrava artikularna hrskavica (prikazana levo) – Hondrociti žive u hipoksičnom okruženju jer u hrskavičavom tkivu ne postoje krvni sudovi. Glavna uloga hrskavičavog tkiva je sposobnost da apsorbiruje mehanički stres. U osteoartritično izmenjenom zglobo kolena (prikazano desno) – dolazi do razvoja krvnih sudova u hrskavičavom tkivu, pod uticajem brojnih citokina i hemokina, koji dovode do nastanka „začaranog kruga“ degradacije hrskavice.

(Preuzeto s <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33807695>, modifikovano)

1.1.2.2. Promene na kostima i sinovijalnim membranama

Subhondralna kost, koja trpi najveće opterećenje, reaguje indukcijom procesa enhondralne osifikacije, pokušavajući ovim procesom da reparira nastala oštećenja, što dovodi do formiranja osteofita i subhondračnih cisti.

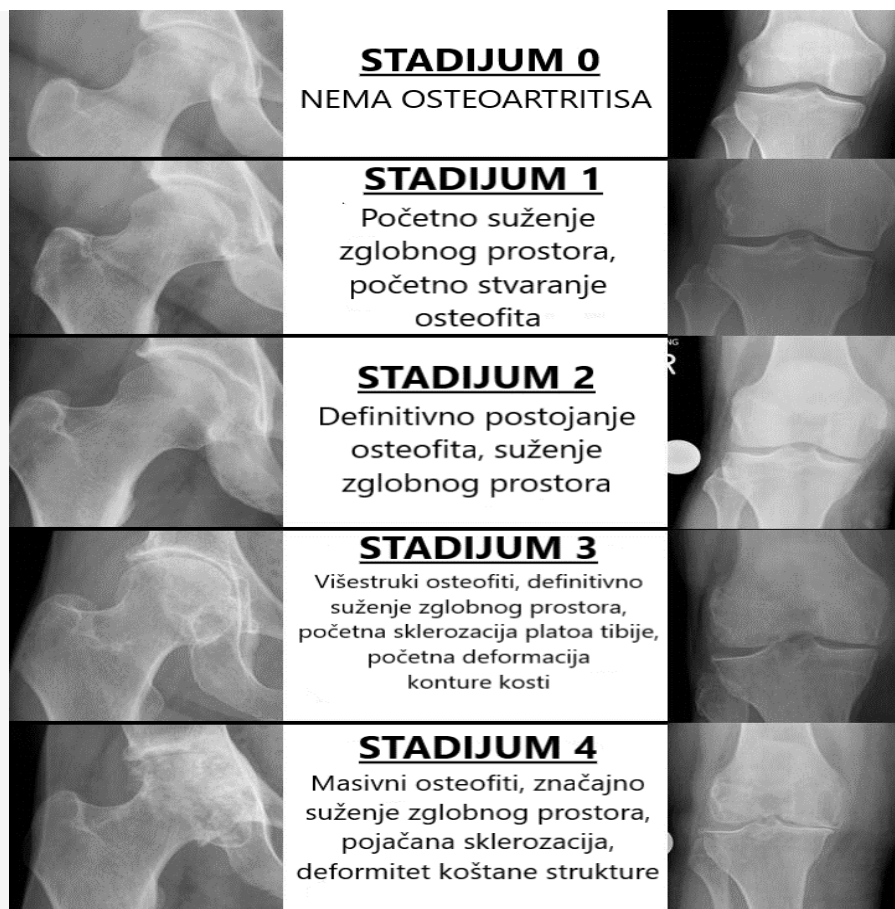
U kompleksnoj kliničkoj slici sinovitisa, paralelno s promenama hrskavice i kostiju, na nivou sinovije odigrava se inflamatorna reakcija i oslobađanje proinflamatornih medijatora i enzima, koje su praćene proliferacijom sinovicita, hipertrofijom tkiva i daljim oštećenjem zgloba (19).

1.1.3. Dijagnoza

U zavisnosti od toga da li promene na zglobovima možemo dijagnostikovati samo nekom od radiografskih metoda (RTG, MRI) ili postoje i simptomi koji ukazuju na prisustvo bolesti zgloba, osteoartritis delimo na strukturni i simptomatski. Radiografska potvrda prisustva promena u sklopu OA prisutna je kod preko 50 % starijih od 65 godina i u oko 80 % starijih od 75 godina (21). Obdukcijiske studije, izvedene na uzorku od 1000 obdukcija, koreliraju s prethodnim podacima, te pokazuju prisustvo oštećenja zglobne hrskavice kod većine starijih od 65 godina (22, 23). Promene u vidu erozije hrskavice, subhondralnih reakcija i prisustva osteofita, potvrđene su kod 60 % muškaraca i kod 70 % žena starosti od 70 do 90 godina, u studiji Stankovića i saradnika, rađene na zglobu kolena (23). Radiografski je moguće verifikovati tek uznapredovale promene, te je prevalenca u obdukcijiskim i drugim studijama koje analiziraju makroskopske i patohistološke promene veća. Ipak, kada se radiografskim studijama obuhvati širi generacijski opseg u cilju skrininga, pokaže se da uprkos dominantno pogođenoj starijoj populaciji, čak i kod ljudi u četvrtoj deceniji života, njih 10-20 % pokazuje radiografske znake teške OA šaka i stopala (23,24). Na radiografiji se ozbiljnost oštećenja zgloba može oceniti vrednovanjem tipičnih radioloških promena: subhondralna koštana skleroza, sužavanje zgloba, formiranje osteofita, stvaranje subhondralnih cisti i gubitak konture kosti. Simptomi uključuju bolove u zglobovima, ukočenost i oticanje, koji se pre svega javljaju sporadično ujutro, tokom godina napreduju, uzrokujući gubitak pokretljivosti, na kraju značajno onesposobljavajući pacijenta za svakodnevne životne aktivnosti (4).

Još uvek nisu poznati svi aspekti progresije OA. Napredovanje oboljenja je sporo i bolest godinama može perzistirati u klinički i radiografski stabilnoj formi (25, 26). U pojedinim slučajevima bolest poprima rapidno progresivni tok, pri čemu se nalaz drastično pogoršava za nekoliko nedelja ili meseci, praćen kolapsom subhondralne kosti i nestabilnošću zgloba kolena.

Sve definicije OA uzimaju u obzir i patološke i radiografske i kliničke promene. Destrukcija zglobne hrskavice uz promene subhondralne kosti predstavljaju ključnu patološku promenu. Razgradnja hrskavice povećava mehanički stres na pripadajuću subhondralnu kost, što dovodi do stvaranja mikrofraktura i cističnih formacija u područjima povišenog intraartikularnog pritiska. Klasifikacija OA prema Kelgrenu i Lorensu (Slika 2), iako nesavršena, široko je rasprostranjena i već četiri decenije predstavlja "zlatni standard", a zasniva se na radiološkoj progresiji promena u stadijumima od sniženja zglobnog prostora i početnog stvaranja osteofita, do masivnih osteofitičnih formacija, obliteracije zglobnog prostora i deformacije kostiju (27, 28, 29). Radiološke promene su podeljene u stadijume od 0 do 4, gde 0 označava uredan nalaz, a 4 izražene znakove OA sa značajnim suženjem zglobnog prostora i sklerozom subhondralne kosti.



Slika 2. Kelgren-Lorensova klasifikacija, graduirana na osnovu promena u radiografskim nalazima pacijenata s osteoartritisom kuka, odnosno kolena.

Stadijum 0 označava normalan nalaz bez radiografskih promena, tj. bez znakova OA;

Stadijum 1: označava postojanje sumnje na OA proces, a manifestuje se suspektnim ili minimalno prisutnim osteofitima.

Stadijum 2 označava blagu formu OA, s definitivno prisutnim osteofitima i suženjem zglobnog prostora.

Stadijum 3 označava umereni OA, s prisustvom višestrukih osteofita i veoma suženim zglobnim prostorom, uz početak sklerozacije i deformacije kosti.

Stadijum 4 označava težak oblik OA s masivnim osteofitima, obliteracijom zglobnog prostora, kao i izraženom sklerozom i deformitetom koštanih struktura.

(Preuzeto s <https://epos.myesr.org/poster/esr/essr2015/P-0053>, modifikovano)

S druge strane, Altman i saradnici (ACR - American College of Rheumatology) dali su kriterijume za postavljanje dijagnoze OA, koji uzimaju u obzir kliničke, radiološke i laboratorijske parametare (Tabele 1 i 2) (30, 31).

Tabela 1. ACR (American College of Rheumatology) kriterijumi za postavljanje dijagnoze osteoartritisa zgloba kuka (Altman i sar.)

Kombinovani klinički i radiografski kriterijumi	Klinički kriterijumi
Bol u kuku uz najmanje dva dodatna kriterijuma od sledećih: - SE (brzina sedimentacije eritrocita) <20mm/h - Prisustvo femoralnih ili acetabularnih osteofita - Suženje zglobnog prostora na radiografiji	Bol u kuku i unutrašnja rotacija <15° i SE (brzina sedimentacije eritrocita) <45 mm/h (ukoliko laboratorijski parametri SE nisu dostupni, koristi se fleksija u zglobu kuka do 115° kao kriterijum) ili Unutrašnja rotacija >15° uz bol u kuku, jutarnju ukočenost do 60 minuta, kod starijih od 50 godina
Senzitivnost: 89 % Specifičnost: 91 %	Senzitivnost: 86 % Specifičnost: 75 %

Tabela 2. ACR (American College of Rheumatology) kriterijumi za postavljanje dijagnoze osteoartritisa zgloba kolena (Altman i sar.)

Klinički i laboratorijski	Klinički i radiografski	Klinički
Bol u kolenu prisutna veći deo dana, mesec dana, uz najmanje pet od sledećih kriterijuma: Starost >50 godina, ukočenost do 30 minuta, krepitacije pri aktivnim pokretima, osetljivost koštanih prominencija, bez povišene lokalne temperature, SE (brzina sedimentacije eritrocita) <40mm/h, vrednosti RF (reuma faktor) <1:40, sinovijalna tečnost tipična za OA (2 od 3: bistra, viskozna, broj leukocita manji od 2000 u ml)	Bol u kolenu u kolenu prisutna veći deo dana, mesec dana, uz najmanje jedan od sledećih kriterijuma: Starost >50 godina, ukočenost <30 minuta, krepitacije pri aktivnim pokretima uz prisustvo osteofita na zglobnim rubovima	Bol u kolenu prisutna veći deo dana, mesec dana, uz najmanje tri od sledećih kriterijuma: Starost >50 godina, jutarnja ukočenost <30 minuta, krepitacije pri aktivnim pokretima, osetljivost koštanih prominencija, koštano zadebljanje kolena pri pregledu, bez povišene lokalne temperature
Senzitivnost: 92 % Specifičnost: 75 %	Senzitivnost: 91 % Specifičnost: 86 %	Senzitivnost: 95 % Specifičnost: 69 %

1.1.4. Terapija

Adekvatna terapija za osteoartritis treba da kombinuje preventivne postupke, čiji cilj je prevencija nastanka, odnosno sprečavanje progresije bolesti, i lekove, koji su neophodni za smanjenje intenziteta simptoma. Ipak, terapija osteoartritisa danas teži da obuhvati sve terapijske mere, koje mogu unaprediti funkcionalnost zahvaćenog zgloba i kvalitet života pacijenta u celini, a ne samo tretiranje bola kao glavnog simptoma bolesti. Za sada nema terapije koja može da spreči nastanak osteoartritisa.

Prevenција

U cilju prevencije najefikasnije je delovati na gojaznost, kombinovanjem promena u životnim navikama vezanim za ishranu i fizički trening. Nefarmakološki tretman obuhvata individualni program treninga, s naglaskom na aerobne vežbe, vežbe istezanja, ali i trening snage, u granicama mogućnosti pacijenta, s obzirom na prisutne komorbiditete, ali i otežano kretanje, s mogućnošću ostvarivanja punog potencijala treninga u vodenoj sredini. Pored uticaja na smanjenje bola kao glavnog simptoma, fizikalni tretman ima za cilj i održavanje, a potencijalno i povećanje obima pokreta zahvaćenog zgloba. U ovu grupu mera spada i primena pomagala za kretanje, kao što je korišćenje fiziološkog štapa u suprotnoj ruci od oboljenjem zahvaćenog zgloba, ali i nošenje ortoza, pre svega za zglobove kolena, skočni zglob i stopala, koja takođe doprinose redukciji bolnih manifestacija bolesti. Higijensko-dijetetski režim, čiji cilj je redukcija telesne mase 10 %, u tempu od oko 5 % u rasponu od 20 nedelja, za posledicu ima nesumnjive i dokazane benefite (32, 34, 35, 36).

Terapija bola

Terapija bola pacijenata s osteoartritisom ima za cilj da svojim dejstvom obuhvati sve mehanizme nastanka ovog dominantnog simptoma bolesti, koji i dovodi pacijenta lekaru. Onesposobljavajući bol kod osteoartritisa je kompleksna senzacija, koja u svom nastajanju uključuje senzacije koje potiču od nocioceptivnih receptora, ali inflamatornim procesom indukovani bolni nadražaj, kao i neuropatski bol. Zato je potrebna kompleksnija terapija u tretiranju ovog stanja, koja podrazumeva štiti spektar lekova od paracetamola, nesteroidnih antiinflamatornih lekova i opioda (32, 33).

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIDs) smatraju se prvom linijom u terapiji. Ipak, uvek treba imati u vidu njihove poznate i dokazane neželjene efekte, posebno na gastrointestinalni, ali i bubrežni i kardiovaskularni sistem. Selektivni inhibitori ciklooksigenaze COX-2 pokazuju nešto bezbedniji profil, pre svega u vidu umereno smanjenog rizika od dispepsije. Zbog ovih karakteristika, opšte je prihvaćena preporuka da se s ovim lekovima udruženo primenjuju inhibitori protonske pumpe, posebno kod pacijenata s udruženim komorbiditetima. Zbog neželjenih efekata nesteroidnih antiinflamatornih lekova, primena paracetamola u dozi do 4 g dnevno je uobičajena alternativa za osobe s izraženim komorbiditetima, iako novije studije dovode njegovu efikasnost u pitanje (32, 37, 38, 39).

Opioidni analgetici, primenjeni oralno ili transdermalno u vidu flastera, predstavljaju alternativu za pacijente koji ne tolerišu neželjene efekte lekova iz prve terapijske linije, pa ipak i sami sobom nose niz potencijalnih neželjenih dejstava, posebno u domenu kardiovaskularnog sistema. U toku su pokušaji da se razviju selektivni opioidni analgetici za pacijente s osteoartritisom, koji bi agonistički delovali samo na κ podgrupu opioidnih

receptora, izbegavajući na taj način sve neželjene efekte vezane za stimulaciju μ podgrupe opioidnih receptora (32, 43).

Tanezumab je monoklonsko antitelo za neuropeptid NGF – factor rasta nerava, koji u okviru degenerativnog i zapaljenskog procesa propadanja zgloba luče različite ćelije (osteoklasti, osteociti, hondrociti, sinovijalni fibroblasti i makrofagi), a predviđen je za potkožnu aplikaciju, za sada s promenljivim rezultatima kliničkih ispitivanja (32, 33).

Selektivni inhibitori preuzimanja serotonina i noradrenalina, kao centralno delujući lekovi, nalaze svoje mesto u terapiji bolnih stanja vezanih za osteoartritis, jer je danas jasno da sveukupno bolno iskustvo pacijenata s osteoartritisom sadrži i komponente neuropatskog bola i depresivnog sindroma. Duloksetin, kao prominentni predstavnik ove grupe lekova, primenjuje se uz lekove iz prve terapijske linije, a njegovi uobičajeni neželjeni efekti mogu biti vrtoglavica, opstipacija, zamor, suva usta i gubitak apetita (32).

Topikalna primena preparata koji sadrže nesteroidne antiinflamatorne lekove i kapsaicin, 3-4 puta na dan, predstavlja pogodnu i bezbednu terapijsku alternativu. Više studija je uspešno dokazalo pozitivne efekte primene topikalnih preparata, koji kao aktivnu supstancu sadrže ketoprofen ili diklofenak natrijum, izolovano ili u kombinaciji s kapsaicinom (32, 40).

Glukozamin se najčešće primenjuje kao alternativna terapija osteoartritisa. Iako su kliničke studije uspele da dokažu efekat glukozamin/hondroitin preparata na smanjenje bola za 20 %, to nije značajno bolje od efekta placeba, a kontroverzni su i podaci koji pokušavaju da dokažu potencijalan pozitivan efekat na strukturu intraartikularne hrskavice (32, 44).

Preparati ribljeg ulja danas su popularni kao jedna od alternativa u terapiji osteoartritisa. Eikosapentaenoična (EPA) i doksaheksaenoična (DHA) kiselina, kao aktivne supstance ribljeg ulja, ispoljavaju antiinflamatorne efekte u laboratorijskim uslovima, ali in vivo studije za sada ne uspevaju da dokažu pozitivne efekte na strukturu hrskavičavog tkiva patološkim procesom zahvaćenog zgloba (32, 45).

Intraartikularna aplikacija kortikosteroida obezbeđuje kratkotrajno obezbojavanje u trajanju od 7 do 14 dana i indikovana je u akutnim egzacerbacijama oboljenja, koje se manifestuju globalnim efuzijama i lokalnim znakovima inflamacije. Prečesta primena intraartikularnih injekcija kortikosteroida, više od jedne u četiri meseca, ima negativan uticaj na strukturu artikularne hrskavice, ubrzavajući njenu degeneraciju. Za sada su neizvesni efekti primene intraartikularnih injekcija hijaluronske kiseline, koje bi trebalo da daju dugotrajnije benefite, uz bezbedniju primenu od kortikosteroida (32, 41, 42).

Operativno lečenje

Operativno lečenje treba rezervisati za slučajeve kod kojih primenom ostalih mera nije dobijen zadovoljavajući napredak, pri čemu artroskopske procedure ne pokazuju superiorniji efekat od kombinacije fizikalne terapije i lekova, a artroplastiku zgloba treba razmatrati isključivo kao opciju za najteže forme bolesti. Artroplastika zglobova zahvaćenih procesom osteoartritisa u uzapredovaloj fazi i dalje se nameće kao najefikasnija mera koja drastično poboljšava kvalitet života pacijenta, eliminišući bol, a čuvajući pokretljivost zgloba kao njegovu osnovnu funkciju (32).

Novi terapijski pristupi

Noviji terapijski pristupi, koji su većinom u fazi kliničkih ispitivanja, imaju za cilj da utiču na stanje zglobne hrskavice, sinovijalne membrane i subhondralne kosti u ranijim fazama bolesti, kada je inflamatorni proces otpočeo, ali još nije došlo do definitivnih, nepovratnih promena na ovim strukturama. Terapiju kojom se utiče na strukturu artikularne hrskavice, na jednoj strani predstavljaju lekovi koji modifikuju patološki proces osteoartritisa (DMOADs – Disease-modifying osteoarthritis drug), čiji su predstavnici anabolički lek sprifermin (oblik humanog fibroblastnog faktora rasta – FGF 18, još u fazi kliničkih ispitivanja faze II), anabolički lek BMP-7 (bone morphogenetic protein 7, takođe u fazi I i II kliničkih istraživanja), TMMP inhibitori (Inhibitori tkivnih metaloproteinaza, čiji cilj je smanjenje delovanja proteaza koje su odgovorne za destrukciju zglobne hrskavice), a na drugoj strani regenerativna terapija, bazirana na stem ćelijama i njihovim derivatima. Stem ćelije se ekstrahuju iz koštane srži (BMSCs – Bone marrow stromal cells), ili iz masnog tkiva (ASCs - Adipose-derived stromal cells), a istraživanja su pokazala da svoj dugotrajni hondroprotektivni i imonomodulatorni regenerativni efekat ostvaruju parakrinim putem, a ne direktnom inkorporacijom, budući da same ćelije nakon aplikacije brzo nestaju iz ciljanog tkiva (33, 46, 47).

Primene u strukturi subhondralne kosti mogu da prethode degenerativnim promenama artikularne hrskavice. U grupu lekova koji utiču na strukturu subhondralne kosti ubrajamo bifosfonate (ostavaruju svoje dejstvo inhibicijom osteoklastne aktivnosti), denosumab (monoklonsko antitelo koji direktnim dejstvom na RANKL - receptorski aktivator za nuklearni faktor κ B ligand, usporava proces resorpcije kostiju), blokatore transformišućeg faktora rasta – TGF (preveniraju degenerativne promene hrskavice i koštanog tkiva), sintetičke oblike paratiroidnog hormona (umanjuje stepen apoptoze hondrocita) i suplementaciju vitaminom D3 (održavanje koštane strukture, koja ima ulogu u absorpciji mehaničkog stresa, mogla bi da ima ključnu ulogu u prevenciji progresije patološkog procesa) (33, 48, 49).

Terapiju koja utiče na medijatore zapaljenja i inflamatorni proces u celini čine lekovi razvijeni da utiču na inflamatorne citokine IL-1 (interleukin -1), IL-6 (interleukin -6), kao i TNF- α (faktor nekroze tumora alfa), ali i antitela za faktor koji stimuliše koloniju granulocita i makrofaga (GM-CSF). Ovi lekovi su razvijani kao specifična terapija za reumatoidni artritis (RA), ali potencijalno, mada limitirano, delovanje mogu imati i u okviru procesa osteoartritisa, koji se može smatrati nesistemskim zapaljenskim procesom niskog intenziteta (low-grade) (33).

Genska terapija je još u početnoj fazi kliničkih testiranja, a uključuje intraartikulanu aplikaciju virusnog vektora adeno grupe koji kodira antagonistički efekat na receptor interleukina 1 (IL-1) (33, 50, 51).

1.2. Vitamin D

1.2.1. Uloge vitamina D

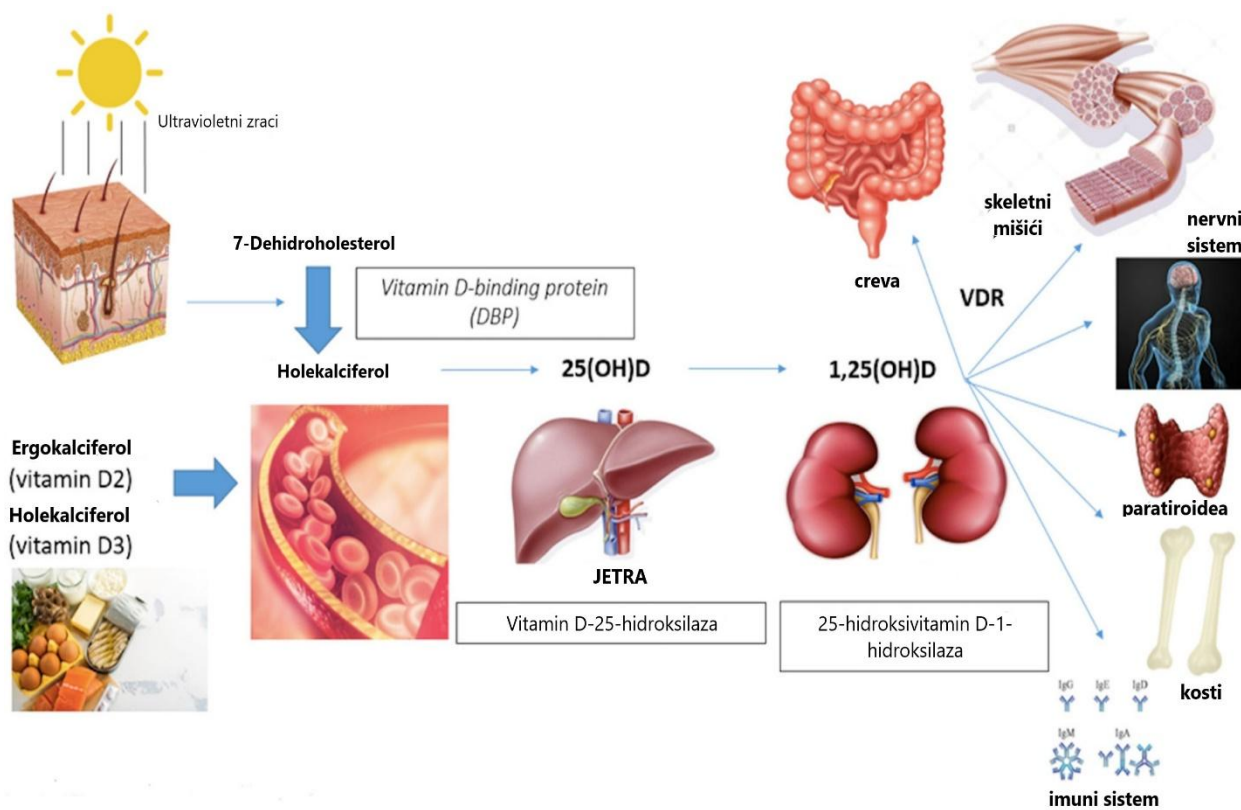
Vitamin D je steroidni hormon koji prevashodno učestvuje u homeostazi kalcijuma i metabolizmu kostiju, ali i u nizu drugih fizioloških procesa, uključujući regulaciju imunskog odgovora. Vezujući se za receptor vitamina D (VDR), vitamin D reguliše apsorpciju kalcijuma i fosfata iz bubrega i gastrointestinalnog sistema, održavajući tako nivo kalcijuma u krvi. Uporedo s paratiroidnim hormonom (PTH) i kalcitoninom, vitamin D igra osnovnu ulogu u mineralizaciji i resorpciji kostiju (52). U slučaju nedovoljnog unosa vitamina D, kod dece se javlja rahitis, a kod odraslih dolazi do demineralizacije kostiju. Međutim, receptori za vitamin D (*Vitamin D Receptor* – VDR) postoje u skoro svim ćelijama i tkivima, te shodno tome vitamin D ima širok spektar dejstva na različite ćelijske tipove, i ima potencijalno ključnu ulogu u velikom broju uobičajenih bolesti, uključujući OA, razne vrste malignih bolesti, neurološke disfunkcije, kardiovaskularne bolesti (svojim uticajem na renin-angiotenzin sistem) i autoimunske i metaboličke bolesti (dijabetes tipa I i II) (4, 53, 54, 55). Vitamin D stimuliše urođeni, a suprimira stečeni imunski odgovor, što ga čini imunomodulatorom koji ima pozitivan uticaj na smanjenje rizika od autoimunskih bolesti.

1.2.2. Metabolizam vitamina D

Vitamin D ili kalciferol ima dva oblika, D₂ ili ergokalciferol kao oblik koji se unosi putem hrane, i D₃ ili holokalciferol u endogenoj formi, kada se pod dejstvom sunčevih zraka stvara u koži. Zbog svoje steroidne strukture, smatra se da aktivna forma vitamina D ima odlike hormona (4).

Holokalciferol se sintetiše pod dejstvom ultravioletnog B zračenja (UVB), koje procesom fotoizomerizacije pretvara 7-dehidroholesterol u previtamin D. Nakon toga, previtamin D podvrgava se termički zavisnoj izomerizaciji da bi se stvorio vitamin D₃. Bilo da je nastao izomerizacijom previtamina D₃ u bazalnom epidermalnom sloju kože ili da je unet ishranom, iz hrane bogate vitaminom D ili iz suplemenata putem apsorpcije u crevima, neaktivna forma vitamina D koja je na ovaj način stvorena transportuje se do jetre proteinom koji vezuje vitamin D (engl. *Vitamin D Binding Protein* - DBP). U jetri se dešava prva hidrosilacija na poziciji dvadesetpetog ugljenika (C-25), pod dejstvom enzima 25-hidroksylaze (25-OHase), stvarajući aktivan oblik vitamina D kalcidiol (25-hidroksivitamin D₃, 25(OH)D₃), koji se može meriti u serumu. Dodatna hidrosilacija se dešava u tubulama bubrega, dejstvom enzima 1 α -hidrosilaze (1 α -OHase), koji dodaje hidrosilnu grupu na poziciji prvog ugljenikovog atoma, stvarajući najaktivniji oblik dihidrosivitamina D₃ kalcitriol (1,25(OH)₂D₃). Sinteza 1 α ,25(OH)₂D₃ iz 25(OH)D₃ stimulirana je parathormonom (PTH), a suprimirana je kalcijumom Ca²⁺, fosforom P i samim 1 α ,25(OH)₂D₃. Inaktivacija i dezintegracija aktivne forme vitamina D odvija se kroz hidrosilaciju na 24. atomu ugljenika pod dejstvom D 24-hidroksilaze (24-OHase), čime nastaju inaktivni metaboliti 24,25(OH)₂D₃, odnosno 1 α ,24,25(OH)₂D₃ (4, 56, 57, 58).

Većina ljudi konzumira hranu koja ne sadrži dovoljno vitamina D, a široko rasprostranjena primena krema sa zaštitnim faktorom protiv UVB zračenja smanjuje endogenu sintezu previtamina D iz 7-dehidroholesterolola, uz to izloženost UVB zračenju, kao i raspoloživost namirnica koje sadrže dovoljne količine vitamina D, zavisi od geografske širine. Glavni prehrambeni izvor vitamina D₂ je masna riba, poput lososa i tunjevine, žumance, sir, kao i hrana obogaćena vitaminom D (Slika 3) (4, 57, 58, 59, 60).



Slika 3. Ciklus vitamina D i efekat na ciljne organe i tkiva

Preuzeto s <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/12/2861/html>, modifikovano

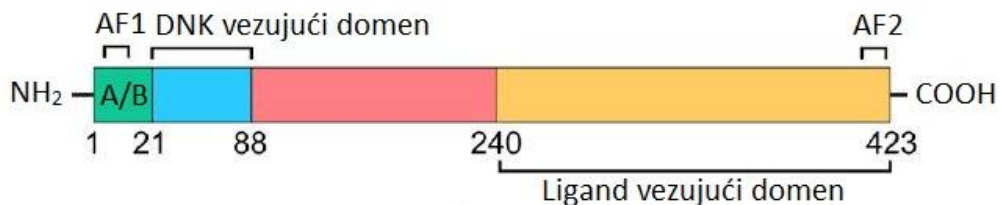
1.2.3. Receptor za vitamin D

Receptor vitamina D (VDR) pripada steroidnim receptorima i predstavlja transkripcioni faktor koji je široko eksprimiran u različitim organima i tkivima, uključujući kosti, mozak, srce, kožu, gonade, prostatu i dojku. Vezivanje vitamina D na VDR omogućava brzo vezivanje VDR-a za regulatorne regione ciljnih gena, uključujući transportne proteine koji učestvuju u apsorpciji kalcijuma u crevima (4). VDR takođe reguliše metabolizam žučnih kiselina u debelom crevu, diferencijaciju keratinocita u koži, razvoju i ciklusu dermalnih folikula dlake, kao i funkciju ključnih tipova ćelija koji su uključeni u urođeni i adaptivni imunitet (61). Hondrociti, osteoblasti i osteociti eksprimiraju VDR, što ukazuje na to da bi ove ćelije mogle biti potencijalne mete za signalizaciju i suplementaciju vitamina D u OA.

Aktivacija VDR u osteoblastima dovodi do sinteze nekolagenih proteina, osteokalcina i osteopontina, koji čine koštani organski matriks. Vezivanje aktivnog oblika 1,25(OH)₂D₃ stimuliše osteoblaste i osteocite da proizvode faktor rasta fibroblasta 23 (FGF23) (61).

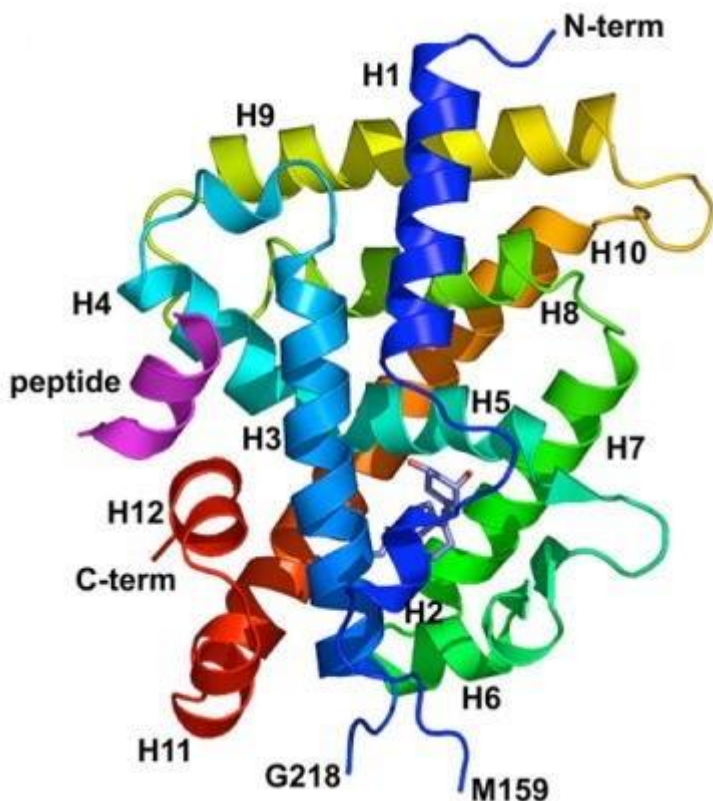
FGF23, PTH iz štitne žlezde i vitamin D zajedno regulišu crevnu apsorpciju i bubrežnu ekskreciju kalcijuma i fosfata, kao i skladištenje i uklanjanje ovih ključnih minerala iz skeleta (62). FGF23 proizveden u osteocitima ima sistemske i lokalne efekte koji utiču na mineralizaciju. Osteociti direktno utiču na remodeliranje kostiju inhibiranjem ili stimulacijom osteoblasta i aktivnosti osteoklasta u cilju održavanja homeostaze kostiju, stoga na sve ove funkcije delom utiče i $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (4). FGF23 snižava nivo fosfata smanjivanjem kotransportera fosfata u bubregu, smanjujući tako reapsorpciju fosfata. Smanjuje i hidroksilazu, enzim u bubregu, koji pretvara prekursor 25-hidroksivitamina D_3 u njegov aktivni oblik $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. FGF23 takođe indukuje ekspresiju 24-hidroksilaze, enzima koji katabolizuje $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i smanjuje njegovo delovanje. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ je glavni faktor povećanja proizvodnje FGF23 i FGF23 samoreguliše proizvodnju tim negativnim povratnim informacijama. Drugi faktori, kao što su PTH i fosfat u serumu, mogu da stimulišu FGF23, ali vitamin D_3 je njegov najznačajniji regulator (61, 63).

VDR protein se sastoji od DNK vezujućeg domena, velikog ligand vezujućeg domena i regiona koji spaja dva pomenuta funkcionalna domena. Na svom N-terminalnom kraju VDR poseduje A/B domen koji sadrži ligand zavisni transkripcioni faktor funkcije 1 (AF1), koji obavlja funkciju tkivno specifičnog receptora, a na ovaj region se nastavlja DNK vezujući domen. Ligand vezujući domen VDR proteina je kompleksne 3D strukture i sastoji se iz 12 α -heliks lanaca (H1–H12). Na suprotnom, C-terminalnom kraju VDR nalazi se domen koji sadrži ligand zavisni faktor funkcije 2 (AF2), preko koga se aktivira transkripcija (Slike 4. i 5.) (64).



Slika 4. VDR protein na prikazanoj shemi sadrži DNK-vezujući domen i ligand-vezujući domen, s regionom koji spaja ova dva funkcionalna domena. Na poziciji 1 je amidni, a na poziciji 423 karboksilni aminokiselinski ostatak. AF1 i AF2 su ligand-zavisni transkripcioni faktor, odnosno ligand-zavisni faktor funkcije.

(Preuzeto s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448919/>, modifikovano)

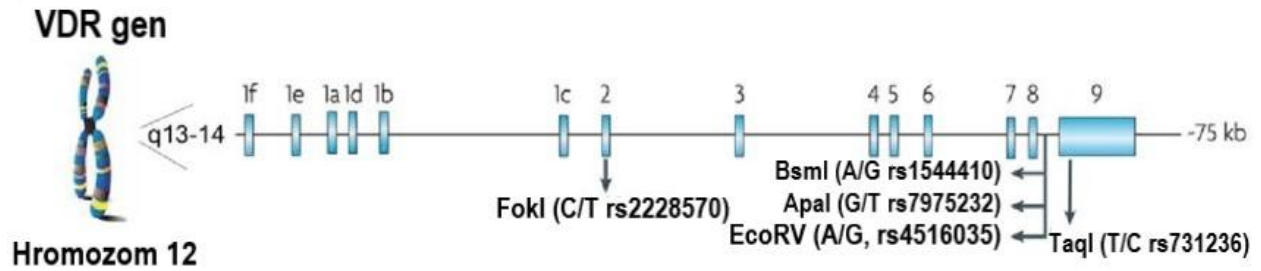


Slika 5. 3D model kristalne strukture ligand-vezujućeg domena vitamin D receptora, koji je sastoji iz 12 α -heliks lanaca (H1–H12), s obeleženim N terminalnim i C terminalnim krajevima.

(Preuzeto s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448919>, modifikovano)

1.2.4. Gen koji kodira receptor za vitamin D

Gen koji kodira receptor za vitamin D veličine je oko 100 kb i nalazi se na dugom kraku hromozoma 12, lokus 12q13.1 (65). Zbog svoje ključne uloge u regulaciji ekspresije preko 1000 gena, gen VDR i odgovarajući protein su ispitivani kod mnogih kompleksnih bolesti, uključujući i OA (Slika 6) (66).



Slika 6. Egzon-intron struktura VDR gena i pozicije polimorfizama. Ljudski VDR gen lociran je na hromozomu 12q, a sastoji se iz egzona 1-9, koji kodiraju šest domena (A-F) celokupnog VDR proteina i intronskih regiona.

(Preuzeto s https://www.researchgate.net/figure/Chromosomic-and-protein-domains-of-the-Vitamin-D-receptor-The-human-VDR-gene-located-on_fig6_242753835 modifikovano)

Polimorfizmi u genu koji kodira receptor za vitamin D

Najčešći tip varijacija u humanim populacijama je izmena jednog nukleotida u DNK sekvenci, što se označava kao polimorfizam nukleotidne sekvence (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) (67). Genetička promena se označava kao polimorfizam u slučaju da je učestalost najređeg alela (Minor Allele Frequency, MAF) u zdravoj populaciji manja od 1 % ili 5 %.

Nekoliko polimorfizama gena VDR ispoljava funkcionalni imunomodulatorni efekat (68) i utiče na povećani rizik za nastanak reumatoidnog artritisa i degeneraciju intervertebralnog diska (69) u različitim populacijama, pa bi stoga mogli igrati značajnu ulogu i u patogenezi OA. Oko 500 polimorfizama nukleotidne sekvence (SNPs) u humanom VDR genu do sada je opisano, a najopsežnije proučene varijante su FokI, TaqI, ApaI i EcoRV (65). Nihova imena su inicijalno izvedena od naziva enzima restrikcionih endonukleaza korišćenih u RFLP metodi (eng. Restriction Fragments Length Polymorphism), koja je omogućila diskriminacije genskih sekvenci. Danas se genetički polimorfizmi u literaturi i bazama podataka označavaju identifikacionim brojevima (rs, eng. *Reference SNP ID*).

Jedini dokazano funkcionalni polimorfizam je FokI (rs2228570) koji se nalazi u drugom egzonu VDR gena. Karakteriše se izmenjenom aminokiselinskom strukturom usled supstitucije timina u citozin (ATG-ACG). Rezultat ove promene je nastanak dve varijante VDR proteina, od kojih je jedna za tri aminokiseline duža od druge. U literaturi se T alel FokI polimorfizma obeležava sa f, a C alel sa F. Duža varijanta VDR-a sintetiše se u prisustvu T alela, u suprotnom C alel sintetiše kraći protein. Dokazano je da CC genotip pokazuje skoro dva puta (1.7x) veću translacionu aktivnost (4, 68).

Polimorfizmi BsmI (rs1544410) i ApaI (rs7975232) locirani su u osmom intronu i nemaju direktan uticaj na aktivnost VDR-a, dok je TaqI (rs731236) lociran u devetom egzonu i rezultat je sinonimne supstitucije kodona 352 (izoleucin), povezan s regulacijom stabilnosti VDR mRNA i nivoa 25-hidroksivitamina D u serumu (65). I dosadašnje studije su ukazivale da TaqI polimorfizam s genotipom CC pokazuje tri puta manji rizik za razvoj osteoartritisa od osoba koje nose TT ili TC genotip (102).

Polimorfizam EcoRV (A>G, rs4516035) nalazi se u regionu promotora VDR gena, a A alel supstitucije sadrži mesto vezivanja za faktor transkripcije GATA-3 (65).

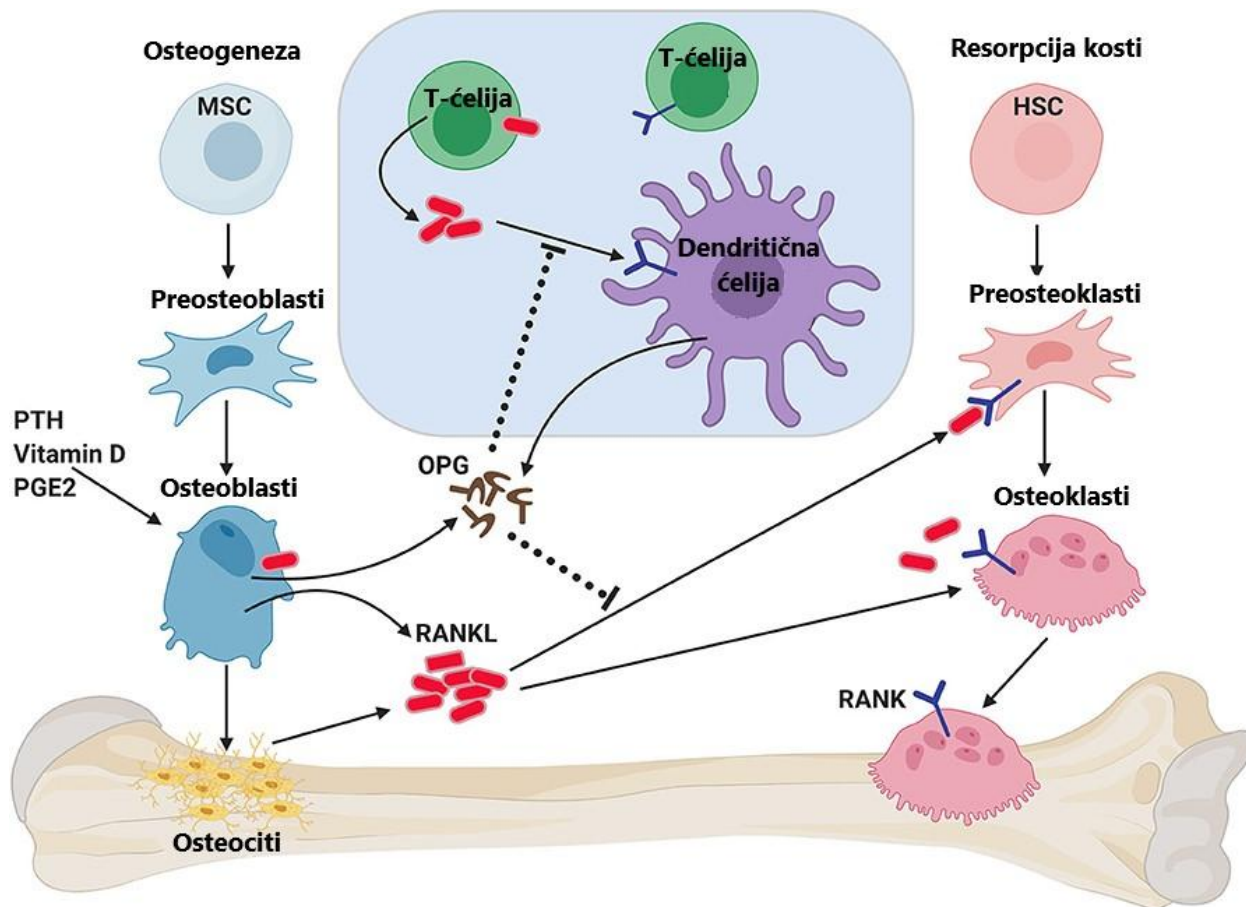
1.2.5. Uloga vitamina D u razvoju osteoartritisa

Tkivne promene u OA, poput aberantnih remodelacija kosti, skleroze i stvaranja osteofita, uzrokuju tri glavna ćelijska tipa: osteoblasti, osteoklasti i hondrociti. Vitamin D ima niz efekata na ove ćelije pri osteoartritisu zahvaćenim zglobovima.

Vitamin D, tačnije $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, stimuliše osteoblastičnu mineralizaciju kostiju aktiviranjem VDR. Studija s ćelijskom kulturom OA osteoblasta pokazala je povećanu proliferaciju ćelija posle tretmana vitaminom D u poređenju sa zdravim osteoblastima. Nakon tretmana vitaminom D, proizvodnje osteokalcina i alkalne fosfataze, dva proteina ključna za mineralizaciju kostiju takođe su bila značajno veća u OA osteoblastima u poređenju sa zdravim i osteoporotskim (70). Druga studija je otkrila da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ indukuje značajno veću proizvodnju osteokalcina u ćelijama sličnim OA osteoblastima u poređenju s kontrolama (71). Ovi nalazi sugerišu da osteoblasti obolelih od OA, povećavaju formiranje kostiju, kada ih indukuje vitamin D. To bi moglo dovesti do objašnjenja subhondralne skleroze i stvaranja osteofita u naprednoj OA.

Tokom patogeneze OA razvija se opsežna vaskularna mreža u sinovijumu, meniskusima, panusu, osteofitima i osteohondralnom čvoru unutar zahvaćenih zglobova. Vaskularni rast povezan je s gubitkom strukturnog integriteta hrskavice i napredovanjem bola kroz širenje senzornih nerava (72). Nivo vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), glavni angiogeni citokin, povezan je s težinom OA. Ekspresija VEGF delimično je regulisana $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, čime se vitamin D povezuje s napredovanjem bolesti (73).

Osteoklasti su specijalizovani makrofagi, uključeni u resorpciju kostiju. Međutim, iako oni ne ekspimiraju VDR, smatra se da vitamin D indirektno utiče na njih putem osteoblastičke aktivnosti (74). Osteoklastna aktivnost regulisana je preko osteoblasta i receptorskog sistema RANK-RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ -B Ligand) i osteoprotegrina (OPG), koji su kod osoba koje boluju od OA znatno niže ekspimirane (Slika 7) (4, 77). RANKL stvaraju osteoblasti i osteociti stimulisani paratireoidnim hormonom (PTH), vitaminom D, i/ili prostaglandinom 2 (PGE₂). RANKL se vezuje za RANK, receptore na membrani preosteoklasta, osteoklastnih prekursora, što za posledicu ima resorpciju koštanog tkiva od strane zrelih osteoklasta. Osteoprotegerin (OPG) vezuje se za RANKL, dovodeći do inhibicije RANK signala i resorpcije kostiju. RANK/RANKL kompleks takođe ima ulogu u regulaciji imunskog odgovora. Naime, T limfociti ekspimiraju RANKL, koji može delovati kako na preosteoklaste, tako i na dendritične ćelije - dendrocite (DCs), stimulišući njihovo preživljavanje. S druge strane, dendrociti (DCs) pokazuju sposobnost da sekrecijom osteoprotegrina (OPG) moduliraju efekat RANK-om uslovljene osteoklastogeneze. HSC, hematopoetska matična (stem) ćelija; MSC, mesenhimalna matična (stem) ćelija (Slika 7) (4, 77).



Slika 7. Uloga RANKL/RANK/OPG osovine na homeostazu koštanog tkiva i imunog sistema. RANKL, kojeg proizvode osteoblasti i osteociti stimulirani paratireoidnim hormonom (PTH), vitaminom D i/ili prostaglandinom 2 (PGE2), veže se za RANK receptor na membrani preosteoklasta, što dovodi do resorpcije koštanog i modulacije imunskog odgovora. T limfociti također eksprimiraju RANKL, koji može delovati kako na preosteoklaste i na dendritične ćelije koje sekrecijom osteoprotegrina (OPG), moduliraju efekat RANK-om uslovljenu osteoklastogenezu. HSC, hematopoetska matična (stem) ćelija; MSC, mesenhimalna matična (stem) ćelija.

(Preuzeto s <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01283/full> modifikovano)

Hondrociti su odgovorni za proizvodnju i održavanje vanćelijskog matriksa u hrskavici. U OA postoji neravnoteža između anaboličkih i kataboličkih procesa, što dovodi do uništenja i gubitka zglobnih hrskavica. Osteoartritični hondrociti imaju veću ekspresiju VDR u odnosu na zdrave ćelije. Ekspresija VDR povezana je s ekspresijom matriksnih metaloproteinaza, konkretno MMP-1, MMP-3 i MMP-9, enzima koji razgrađuju kosti i hrskavice, što pogoršava OA (75). 1,25(OH)₂D₃ i anorganski fosfat uključeni su u hipertrofiju i poremećenu mineralizaciju osteoartritičnih hondrocita putem signalizacije FGF-23 (76), što sugeriše da vitamin D ima negativan uticaj na hrskavicu u OA.

1.2.5.1. Deficijencija vitamina D i osteoartritis

Hipovitaminoza vitamina D definisana je kao nivo serumskog 25(OH)D₃ u koncentraciji ispod 20ng/mL. Hipovitaminoza prevladava među starijom populacijom, budući da sposobnost kože da proizvodi vitamin D opada sa starošću. Često postoji kod osoba s osteoartritisom, a velikom procentu pacijenata s reumatologijom nedostaje vitamin D (78, 79). Međutim, efekat hipovitaminoze D na razvoj i progresiju OA još uvek nije jasan. Do danas postoji mnogo studija s oprečnim rezultatima, gde u nekima nije pokazana povezanost s OA povezanost između niskog nivoa 25(OH)D₃ u serumu i povećanog rizika od razvoja OA kuka ili kolena tokom deset godina (26, 82). S druge strane, više studija je ukazalo na povezanost između niskih 25(OH)D₃ nivoa i OA (83, 85, 86), kao i da nizak prehrambeni unos vitamina D povećava rizik od napredovanja OA kolena (84).

2. CILJEVI RADA

Nekoliko studija istraživalo je povezanost nivoa vitamina D i polimorfizama u receptoru za vitamin D s predispozicijom za pojavu osteoartritisa, ali je rezultiralo nedoslednim nalazima. Koliko nam je poznato, polimorfizam EcoRV nije prethodno ispitivan kod OA, dok polimorfizmi VDR ispitivani kod pacijenata s OA u domaćoj populaciji nisu imali brojnost uzorka kao u našem istraživanju. Cilj ovog istraživanja bio je da analizira povezanost polimorfizama gena receptora za vitamin D s predispozicijom i kliničkopatološkim karakteristikama pacijenata s osteoartritisom u srpskoj populaciji.

1. Utvrđivanje učestalosti alela i genotipova polimorfizama FokI (rs2228570), ApaI (rs7975232) i TaqI (rs731236) VDR gena, u grupi pacijenata s osteoartritisom velikih zglobova i kod ispitanika kontrolne grupe
2. Utvrđivanje povezanosti ispitivanih polimorfizama VDR gena s rizikom za nastanak osteoartritisa velikih zlobova
3. Ispitivanje povezanosti polimorfizama FokI (rs2228570), TaqI (rs731236) i ApaI (rs7975232), VDR gena s demografskim, etiološkim i relevantnim kliničkopatološkim parametrima pacijenata s OA: BMI, pojava bola u drugim zglobovima, pojava otoka, rana pojava bolesti, rana menopauza, povrede i porodična anamneza)
4. Utvrđivanje eventualnih razlika u povezanosti ispitivanih polimorfizama s rizikom i kliničkopatološkim parametrima između pacijenata s osteoartritisom kuka i pacijenata s osteoartritisom kolena
5. Ispitivanje postojanja gametske neravnoteže vezanosti između FokI, ApaI i TaqI polimorfizama VDR gena, kao i utvrđivanje distribucije identifikovanih haplotipova u grupi pacijenata s osteoartritisom i u kontrolnoj grupi.

3. HIPOTEZE

- Razlike u učestalostima genotipova polimorfizama VDR gena između grupe pacijenata s osteoartritisom i kontrolne grupe zdravih osoba ukazale bi na potencijalnu povezanost polimorfizama ovog gena s rizikom za pojavu OA kod pacijenata u našoj populaciji
- Polimorfizmi FokI, TaqI i ApaI u VDR genu mogli bi biti povezani s demografskim, etiološkim i/ili kliničkopatološkim parametrima kod pacijenata s osteoartritisom
- Postojanje gametske neravnoteže vezanosti između istraživanih polimorfizama VDR gena i značajne razlike u distribuciji haplotipova FokI/TaqI/ApaI VDR gena između grupe pacijenata s osteoartritisom i kontrolne grupe ukazalo bi na postojanje haplotipova VDR gena koji nose povišeni rizik za nastanak osteoartritisa.

4. MATERIJAL I METODE

Informisana saglasnost dobijena je od svih ispitanika, pojedinačni podaci zaštićeni tokom istraživanja, a studiju je odobrio Etički komitet VMA, Beograd, odobrenja br. 09/07/2014. i 56/2019. Svi postupci bili su u skladu s Helsinškom deklaracijom iz 1964. i njenim kasnijim izmenama ili uporedivim etičkim standardima.

4.1 Učesnici studije

U našoj bolničkoj studiji, koja je kontrolisala slučajeve, učestvovala su 94 pacijenta s osteoartritisom koji su podvrgnuti totalnoj zameni zgloba kuka ili kolena, kao i kontrolna grupa od 100 zdravih osoba. Osnovne karakteristike su predstavljene u tabeli 3. Od ukupno 94 pacijenta s radiografski potvrđenim primarnim osteoartritisom, 60 pacijenata (64 %) podvrgnuto je totalnoj zameni kuka, dok su 34 pacijenta (36 %) ukupno imala zamenu kolena na Klinici za ortopedsku hirurgiju i Traumatologiji naše ustanove, u periodu 2015-2018. Kriterijumi za izuzeće u grupi bolesnika s OA bili su sekundarni osteoartritis od traume ili hirurgije, urođeni sindromi, urođena displazija kuka i razvojni poremećaji, infekcija, giht, reumatoidni artritis i hormonski ili metabolički poremećaji. U kontrolnoj grupi od 100 zdravih osoba kriterijumi za izuzeće bili su pojava kliničkih manifestacija OA ili drugih sistemskih inflamatornih ili autoimunskih bolesti, i istorija maligniteta. Svi učesnici su bili belci iste nacionalnosti.

U grupi pacijenata s osteoartritisom, bilo je __ pacijenata muškog, a __ ženskog pola. Kontrolnu grupu činilo je __ muškaraca i __ žena. U grupi pacijenata, medijana godina bila je 55. U kontrolnoj grupi medijana je bila 53 godine.

Prilikom pregleda pacijenata s dijagnostikovanim osteoartritisom, od strane nadležnog lekara, pored podataka o polu i godinama, dobijeni su podaci i o indeksu telesne mase, dugotrajnom sedenju i stajanju, sportskim aktivnostima ispitanika, uključujući i stratifikaciju intenziteta (pešačenje, rekreativni ili aktivni sport), kao i registrovanim povredama zglobova, ali i podaci o bolnim stanjima kičmenog stuba i ostalim zglobovima, porodično opterećenje, pušenje, široko povijanje u prvih šest meseci života, vreme početka tegoba, reumatoidni artritis, psorijatični artritis, Behterova bolest, početak i prestanak menstrualnog ciklusa i korišćenje pomagala (štap, štike, invalidska kolica).

Tabela 3. Osnovne karakteristike pacijenata obolelih od osteoartritisa koji su uključeni u ispitivanje.

Varijable		Ukupno OA (N = 94)	%	OA kuka (N = 60)	%	OA kolena (N = 34)	%
Pol	muškarci	35	37.23	26	43.33	9	26.47
	žene	59	62.77	34	56.67	25	73.53
Starost* (godine)	<70	45	47.87	26	43.33	19	55.88
	>70	49	52.13	34	56.67	15	44.12
Pušenje	Da	17	18.09	49	81.67	28	82.35
	Ne	77	81.91	11	18.33	6	17.65
Visoka fizička aktivnost	Da	20	21.28	47	78.33	27	79.41
	Ne	74	78.72	13	21.67	7	20.59
Povrede	Da	33	35.11	38	63.33	23	67.65
	Ne	61	64.89	22	36.67	11	32.35
Porodična anamneza	Da	38	40.43	34	56.67	21	61.76
	Ne	55	58.51	25	41.67	13	38.24
Rani početak OA	<55	52	55.32	33	55.00	19	55.88
	>55	42	44.68	27	45.00	15	44.12
BMI (kg/m ²)	≤25	32	34.04	24	40.00	8	23.53
	25-30	40	42.55	23	38.33	17	50.00
	>30	22	23.40	13	21.67	9	26.47
Menopauza	Da	55	58.51	32	53.33	23	67.65
	Ne	4	4.26	2	3.33	2	5.88
Rana menopauza# (<45. godine)	Da	15	15.96	9	15.00	6	17.65
	Ne	40	42.55	23	38.33	17	50.00

OA – osteoartritis;

BMI – Body Mass Index (indeks telesne mase);

*Srednja vrednost godina

#Broj žena s ranim početkom menopauze

4.2 Biološki uzorci i izolacija DNK

Za genetske analize od ispitanika je uzimano je po 5 ml krvi, gde je kao antikoagulans korišćen natrijum-citrat. Uzorci krvi su do izolacije DNK čuvani na -20°C. Genomska DNK je izolovana upotrebom PureLink Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies, SAD). Prema uputstvu proizvođača, izolacija genomske DNK obuhvata liziranje eritrocita puferom, gde je u 200 µl periferne krvi dodato 700 µl pufera za lizu ćelija s proteinazom K. Digestija proteina vršena je enzimskom denaturacijom proteina s proteinazom K na 55°C u optimizovanom puferu koji omogućava povećanu aktivnost proteinaze K. Nakon dobijanja lizata, DNK se brzo prečišćava iz lizata postupkom centrifugiranja zasnovanog na kolonicama (2-3 min/14 000 rpm). Lizat se pomeša s etanolom i PureLink® puferom koji omogućava vezivanje DNK za PureLink® Spin Column, membranu na bazi silicijum dioksida u koloni, a proteini, nečistoće i inhibitori PCR reakcija uklanjaju se višestrukim ispiranjem s puferima za ispiranje uz centrifugiranje. Genomska DNK zatim se eluira s membrane kolona puferom za eluciju PureLink® Genomic Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1 mM EDTA). Prinos iz 200 µl pune krvi bio je oko 5 µg ukupne DNK.

Kvalitet i koncentracija izolovane DNK proveravani su spektrofotometrom. Talasna dužina na kojoj DNK apsorbuju maksimum svetlosti je 260 nm, pa količina apsorbovane svetlosti na toj talasnoj dužini odgovara koncentraciji DNK u ispitivanom uzorku. Čistoća uzorka DNK na spektrofotometru proveravana je merenjem apsorbance na 230, 280 i 340 nm. Izolovana DNK je čuvana na -20°C.

4.3 Genotipizacija polimorfizama nukleotidne sekvence FokI (rs2228570) i TaqI (rs731236) Apal (rs7975232) i EcoRV (rs4516035) u VDR genu

Ovo istraživanje bavilo se određivanjem varijanti gena koji kodiraju VDR, i to FokI (rs2228570) kao za sada jedini opisani polimorfizam koji menja funkciju VDR, ali i TaqI (rs731236), Apal (rs7975232) i EcoRV (rs4516035) zbog učestvovanja u strukturi halotipskog bloka u blizini 3'UTR kraja VDR gena. Metodom lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu na Real Time PCR uređaju 7300 Applied Biosystems izvedena je genotipizacija polimorfizama, a uz pomoć TaqMan eseja (TaqMan® SNPs Genotyping Assay), čiji su identifikacioni brojevi navedeni u tabeli 4.

Tabela 4. Polimorfizmi VDR gena analizirani TaqMan® tehnologijom

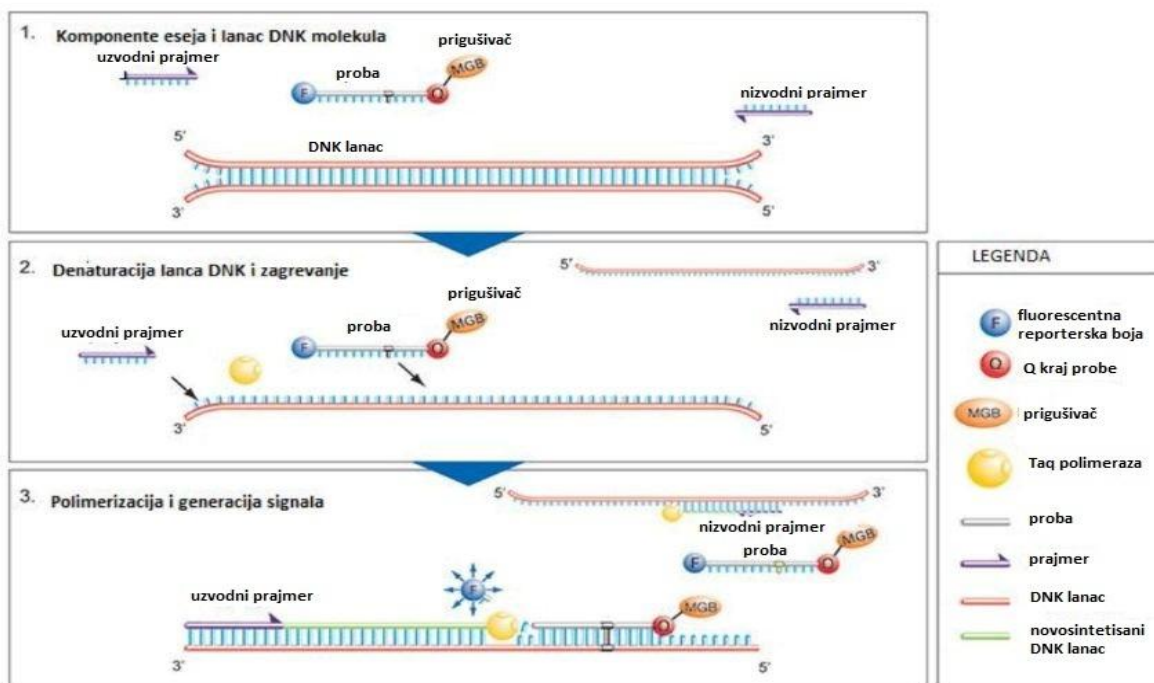
Gen	Polimorfizam	rs broj	ID TaqMan esej
VDR gen	FokI	rs2228570	C_12060045_20
	TaqI	rs731236	C_2404008_10
	Apal	(rs7975232)	C_28977635_10
	EcoRV	(rs4516035)	C_2880805_10

Za genotipizaciju je korišćeno 2µl genomske DNK, kao i master miks koji je sadržao 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (2x koncentrovan), 0.5 µl TaqMan SNP Genotyping Assay (40X) i sterilnu, redestilovanu vodu (7,5 µl). PCR smeša (master mix) osim sva četiri nukleotida sadrži i jone Mg²⁺, koji je kofaktor aktivacije Taq polimeraze. Finalna zapremina reakcione smeše iznosila je 20µL, a nakon inicijalne denaturacije na 95°C, reakcije denaturacije i elongacije lančano su se odvijale u 40 ciklusa. Negativna kontrola PCR reakcije sadržala je sve komponente korišćene PCR smeše, osim genomske DNK, i time je služila za proveru potencijalne kontaminacije hemikalija. Temperaturni profil Real Time PCR reakcije prikazan je u tabeli 5.

Tabela 5. Temperaturni profil Real Time PCR reakcije

Faze Real Time PCR reakcije	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95°C	10 minuta	1
Denaturacija	95°C	15 sekundi	40
Hibridizacija probe i elongacija	60°C	1 minut	

Komercijalno dostupni eseji za genotipizaciju TaqMan tehnologijom sadrže dva para prajmera, uzvodnog (engl. *Forward* - F) i nizvodnog (engl. *Reverse* - R), kao i dve TaqMan probe, jednu koja je specifična za izvorni wt oblik gena, a drugu specifičnu za mutirani alel. TaqMan probe su jednolančane oligonukleotidne sekvence komplementarne ciljnoj sekvenci. Na 5' kraju ili R kraju probe nalazi se reporterska fluorescentna boja (FAM ili VIC), a na 3' ili Q kraju nalazi se prigušivač (engl. *Quencher*), koji sprečava fluorescenciju reporterske boje kada se one nalaze na bliskoj udaljenosti, odnosno pre početka reakcije i aktivnosti Taq polimeraze. Usled toga, pre reakcije elongacije proba ne fluorescira. Prigušivač inhibira fluorescenciju reporterske boje kada se one nalaze na maloj udaljenosti preko transfera energije fluorescentnom rezonancijom (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer* - FRET). Tokom Real-time PCR reakcije, za uzvodni prajmer vezuje se enzim Taq polimeraza, koja osim sposobnosti katalizovanja polimerizacije nukleotida ima i egzonukleaznu sposobnost, kojom seče hibridizovanu probu kada do nje dođe. Proba specifična s wt alel obeležena je jednom reporterskom bojom (npr. VIC), a proba specifična za mutirani alel obeležena je s drugom reporterskom bojom (npr. FAM), koje fluoresciraju na različitim talasnim dužinama. U zavisnosti koja se proba specifično vezala, proba komplementarna s wt ili mutiranim alelom, doći će do isecanja probe, čime će se razdvojiti reporterska boja i prigušivač. Reporterska boja će fluorescirati, što će u realnom vremenu aparat registrovati pomoću specifičnog lasera. Tako će se kod osoba koje imaju oba wt alela registrovati samo jedan signal (npr. VIC), kod osoba koja imaju oba mutirana alela jedan signal, ali druge reporterske boje (npr. FAM), dok će kod heterozigora biti registrovana oba alela, odnosno fluorescenca obe reporterske boje (Slika 8).



Slika 8. Princip alelske diskriminacije polimorfizama nukleotidne sekvence TaqMan tehnologijom (preuzeto, brošura: "TaqMan Assays for genetic variation research", Thermo Fisher Scientific, modifikovano). Objašnjenje slike dato je u tekstu.

Intenzitet fluorescence odgovara količini DNK prisutne u reakciji nakon svakog ciklusa elongacije i u teoriji dolazi do udvajanja DNK u svakom ciklusu PCR reakcije, dvostrukog uvećanja i eksponencijalnog rasta fluorescence. Kada se komponente smeše potroše reakcija se usporava i fluorescencija poprima sigmoidalan oblik krive. Genotipovi su detektovani i analizirani pomoću SDS softvera, v. 2.3 (Applied Biosystems, SAD).

4.4 Statistička analiza

Statistička analiza izvršena je korišćenjem SPSS verzije 20.00.

Utvrđivanje razlika učestalosti alela i genotipova kod obolelih i u kontrolnoj grupi ili povezanost polimorfizama gena FokI, TaqI i ApaI VDR s demografskim i etiološkim podacima, izračunati su pomoću neparametarskog hi-kvadrata (χ^2) ili Fisher Exact testa. Kada su dobijene učestalosti bile manje od 5 %, korišćen je Fišerov egzaktni test.

Povezanost polimorfizama FokI, TaqI, ApaI i EcoRV VDR s rastućom genetskom predispozicijom na osteoartritis procenjena je s prilagođenim odnosima šansi (Odds Ratio – OR). Odnosi šansi (OR) i intervali poverenja od 95 % (95 % CI - Confidence Interval) izračunati su korišćenjem bezuslovne logističke regresione analize, prilagođene starosti i polu, koji se smatraju potencijalnim zbunjujućim faktorima. Recesivni genetski model (genotip divljeg tipa nasuprot kombinovanom heterozigotnom i mutiranom genotipu), kao i dominantni (kombinovani genotip divljeg tipa i heterozigotni nasuprot mutiranom genotipu) i aditivni modeli analiziranih varijanti gena VDR uključeni su u proračun rizika od OA.

Vrednosti p manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

5. REZULTATI

Za raspoloživu veličinu uzorka od 94 slučaja i 100 kontrola, prema učestalosti malih alela pojedinih VDR SNP-ova u slučajevima i kontrolama u našoj kohorti, prosečna snaga naše studije bila je 0,83, s nivoom značajnosti 0,05.

Učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizama VDR gena kod pacijenata s OA i kontrolne grupe prikazani su u tabeli 6. Naši rezultati su ukazali na značajnu razliku u TaqI distribuciji genotipa VDR između ukupne grupe pacijenata s OA i zdravih kontrola ($p = 0,003$), dok smo primetili tendencija ka različitoj učestalosti genotipa u polimorfizmu FokI VDR ($p = 0,053$) (Tabela 6). Analiza specifična za zglobove otkrila je značajne razlike u distribuciji genotipa TaqI VDR kod pacijenata s OA kuka ($p = 0,009$) i osteoartritisom kolena ($p = 0,030$), u poređenju s kontrolama (Tabela 6). Nismo primetili razlike u distribuciji genotipa za ApaI i EcoRV VDR polimorfizme, (Tabela 6).

Tabela 6. Učestalost genotipova ispitivanih varijanti VDR gena u kontrolnoj i grupi s osteoartritisom

Varijante VDR gena	Genotip	Kontrola (N=100)	Pacijenti s OA					
			Ukupno OA (N=94)	p^*	OA kuka (N=60)	p^*	OA kolena (N=34)	p^*
TaqI (rs731236)	TT	46	22	0.003	15	0.009	7	0.030
	TC	40	48		27		21	
	CC	14	24		18		6	
FokI (rs2228570)	TT	28	13	0.053	9	0.091	4	0.067
	TC	41	47		34		13	
	CC	31	34		17		17	
ApaI (rs7975232)	CC	25	35	0.120	24	0.110	11	0.526
	CA	56	48		29		19	
	AA	19	11		7		4	
EcoRV (rs4516035)	AA	30	27	0.702	18	0.435	9	0.908
	AG	38	41		28		13	
	GG	32	26		14		12	

OA – osteoartritis*: Parametri istaknuti zlatnim brojevima pokazuju statistički značajne p-vrednosti ($p < 0.05$)

Procenjena je logistička regresija za procenu rizika od OA. Starost i pol su uključeni kao zbunjujuće varijable, jer su oni dobro poznati faktori rizika za primarni osteoartritis. Rezultati prilagođene analize odnosa šansi pokazali su da je polimorfizam VDR TaqI značajno povezan s povećanim rizikom od OA u recesivnom modelu (TC + CC genotipovi naspram TT (OR = 1.678, p = 0.001)), kao i u aditivnom modelu (OR = 1,986, p = 0,001), dok nije utvrđena povezanost u dominantnom genetskom modelu (Tabela 7). Poređenje pacijenata s OA s kontrolnim subjektima ukazalo je da osobe s TC i CC genotipom VDR TaqI polimorfizma imaju veći rizik od OA (OR = 2,539, p = 0,006 i OR = 3,662, p = 0,003, respektivno).

VDR FokI polimorfizam značajno je povećao rizik od OA u recesivnom modelu (OR = 1,561, p = 0,017), ali ne i u dominantnom ili aditivnom genetičkom modelu (Tabela 7). U poređenju s divljim tipom TT genotipa, TC i CC genotipovi VDR FokI polimorfizma imaju povišen rizik od OA (OR = 2.507, p = 0.022, odnosno OR = 2.347, p = 0.042 (Tabela 7).

Tabela 7. Povezanost varijanti TaqI i FokI VDR gena s rizikom za pojavu osteoartritisa (OA)

Varijante VDR gena	Model	Genotip	OA pacijenti		OA kuka		OA kolena	
			OR prilagođeno s [95 % CI]‡	p*	OR prilagođeno s [95 % CI]‡	p*	OR prilagođeno s [95 % CI]‡	p*
TaqI (rs731236)	Genotip	TT	1.000	Ref.	1.000	Ref.	1.000	Ref.
		TC	2.539 [1.299-4.962]	0.006	1.935 [0.885-4.229]	0.098	3.921 [1.474-10.431]	0.006
		CC	3.662 [1.561-8.592]	0.003	3.724 [1.472-9.423]	0.006	3.056 [0.848-11.022]	0.088
	Recesivno	TT vs. TC+CC	1.678 [1.222-2.303]	0.001	2.396 [1.159-4.955]	0.018	1.923 [1.199-3.084]	0.007
	Aditivno	-	1.986 [1.302-3.030]	0.001	1.930 [1.216-3.063]	0.005	1.916 [1.071-3.427]	0.028
FokI (rs2228570)	Genotip	TT	1.000	Ref.	1.000	Ref.	1.000	Ref.
		TC	2.507 [1.144-5.494]	0.022	2.792 [1.140-6.839]	0.025	2.215 [0.648-7.568]	0.205
		CC	2.347 [1.031-5.341]	0.042	1.592 [0.605-0.190]	0.346	4.556 [1.325-15.672]	0.016
	Recesivno	TT vs. TC+CC	1.561 [1.082-2.252]	0.017	2.231 [0.964-5.162]	0.061	3.097 [0.995-9.686]	0.052
	Aditivno	-	1.443 [0.972-2.145]	0.069	1.181 [0.754-1.848]	0.468	2.117 [1.182-3.793]	0.012

‡ - Prilagođeno po polu i starosti; parametri istaknuti zatamnjenim brojevima pokazuju statistički značajne p-vrednosti (p < 0.05); Ref – referentni genotip

U analizi specifičnoj za zglobove, u aditivnom modelu, polimorfizam VDR TaqI povezan je sa značajno povećanim rizikom za OA kuka (OR = 1,930, p = 0,005) i OA kolena (OR = 1,916, p = 0,028), dok je polimorfizam VDR FokI je povezan sa značajno povećanim rizikom od OA kolena (OR = 2,117, p = 0,012), ali ne i OA kuka (OR = 1,181, p = 0,468). Zajednički stratifikovana analiza pokazuje da je CC genotip VDR TaqI povezan s povećanom prevalencijom OA kuka (OR = 3,724, p = 0,006), dok je TC genotip povezan s povećanim rizikom za OA kolena (OR = 3,921, p = 0,006) (Tabela 7). TC genotip VDR FokI povezan je s povećanim rizikom od OA kuka (OR = 2,792, p = 0,025), dok je homozigotni CC mutirani genotip povezan s povećanim rizikom od OA kolena (OR = 4,5556, p = 0,016) (Tabela 7).

Tabela 8. Povezanost varijanti ApaI i EcoRV VDR gena s rizikom za pojavu osteoartritisa (OA)

Varijante VDR gena	Model	Genotip	OA pacijenti		OA kuka		OA kolena	
			OR prilagođeno s [95 % CI]‡	p*	OR prilagođeno s [95 % CI]‡	p*	OR prilagođeno s [95 % CI]‡	p*
ApaI (rs7975232)	Genotip	CC	1.000	Ref.	1.000	Ref.	1.000	Ref.
		CA	0.618 [0.324-1.176]	0.142	0.542 [0.263-1.117]	0.097	0.774 [0.316-1.899]	0.576
		AA	0.424 [0.171-1.049]	0.063	0.408 [0.144-1.153]	0.091	0.470 [0.128-1.728]	0.256
	Recesivno	CC vs. CA+AA	0.754 [0.554-1.028]	0.074	0.509 [0.255-1.017]	0.056	0.833 [0.541-1.284]	0.409
	Aditivno	-	0.644 [0.416-0.997]	0.049	0.613 [0.372-1.013]	0.056	0.704 [0.382-1.297]	0.260
EcoRV (rs4516035)	Genotip	AA	1.000	Ref.	1.000	Ref.	1.000	Ref.
		AG	1.236 [0.622-2.456]	0.546	1.284 [0.594-2.774]	0.525	1.164 [0.435-3.113]	0.763
		GG	0.881 [0.422-1.843]	0.737	0.725 [0.305-1.727]	0.468	1.238 [0.452-3.389]	0.677
	Recesivno	AA vs. AG+GG	1.035 [0.759-1.411]	0.830	1.012 [0.712-1.439]	0.947	1.095 [0.704-1.701]	0.688
	Aditivno	-	0.939 [0.650-1.356]	0.738	0.863 [0.566-1.317]	0.494	1.111 [0.674-1.831]	0.681

‡ - Prilagođeno po polu i starosti; parametri istaknuti zatamnjenim brojevima pokazuju statistički značajne p-vrednosti (p < 0.05); Ref – referentni genotip

Naša studija nije pokazala povezanost polimorfizma EcoRV s predispozicijom za osteoartritis ili kliničkim karakteristikama pacijenata s OA (Tabela 8).

U aditivnom modelu, polimorfizam VDR ApaI povezan je sa smanjenim rizikom za OA (OR = 0,644, p = 0,049). Primetili smo tendenciju ka nižoj prevalenciji OA u genotipu AA u poređenju s CC genotipom (OR = 0,424, p = 0,063) (Tabela 8).

Analiza povezanosti između varijanti gena VDR i demografskih faktora i faktora rizika za OA ukazala je da polimorfizam EcoRV pokazuje tendenciju ($p=0,050$) veće učestalosti mutiranog genotipa kod starijih pacijenata (Tabela 9).

Tabela 9. Povezanost varijanti VDR gena s demografskim karakteristikama i faktorima rizika za nastanak osteoartritisa (OA)

Demografski faktori i faktori rizika		Ukupno N	TaqI (rs731236)			FokI (rs2228570)			ApaI (rs7975232)			EcoRV (rs4516035)		
			TT	TC	CC	TT	TC	CC	CC	CA	AA	AA	AG	GG
Pol	Muškarci	35	7	15	13	6	18	11	14	17	4	7	18	10
	Žene	59	15	33	11	7	29	23	21	31	7	20	23	16
	<i>p</i>		0.138			0.666			0.911			0.321		
Godine (medijana)	<70	45	13	23	9	5	24	16	17	21	7	12	25	8
	>70	49	9	25	15	8	23	18	18	27	4	15	16	18
	<i>p</i>		0.342			0.718			0.489			0.050		
Pušenje	Da	17	5	8	4	1	10	6	7	9	1	20	36	21
	Ne	77	17	40	20	12	37	28	28	39	10	7	5	5
	<i>p</i>		0.811			0.529			0.704			0.349		
Visok nivo fizičke aktivnosti	Da	20	3	9	8	4	7	9	8	10	2	20	33	21
	Ne	74	19	39	16	9	40	25	27	38	9	7	8	5
	<i>p</i>		0.220			0.303			0.941			0.783		
Prethodne povrede	Da	33	7	13	13	3	19	11	11	16	6	18	24	19
	Ne	61	15	35	11	10	28	23	24	32	5	9	17	7
	<i>p</i>		0.071			0.467			0.350			0.466		

BMI – Body Mass Index (Indeks telesne mase);

parametri istaknuti zatamnjenim brojevima pokazuju statistički značajne p-vrednosti ($p<0.05$)

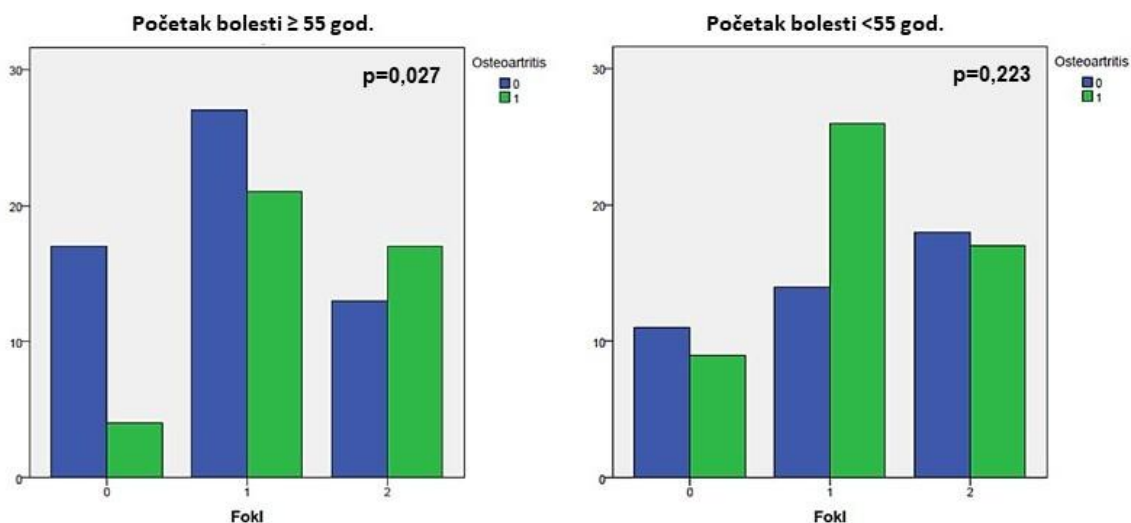
#Broj žena s podatkom o ranom početku menopauze

Polimorfizmi VDR TaqI i FokI značajno povezani s pojavom trajnog hroničnog bola ($p = 0,005$, odnosno $p = 0,027$) (Tabela 10). ApaI VDR polimorfizam je povezan s porodičnom istorijom OA ($p = 0,004$) (Tabela 10).

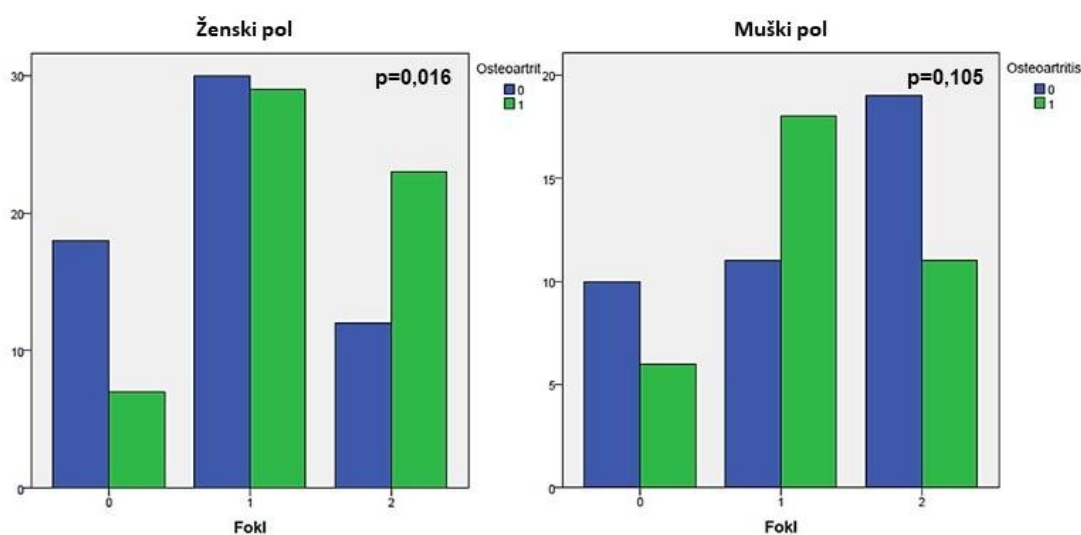
Tabela 10. Povezanost varijanti VDR gena s demografskim karakteristikama i faktorima rizika za nastanak osteoartritisa (OA)

Demografski faktori i faktori rizika		Ukupno N	TaqI (rs731236)			FokI (rs228570)			ApaI (rs7975232)			EcoRV (rs4516035)		
			TT	TC	CC	TT	TC	CC	CC	CA	AA	AA	AG	GG
Pozitivna porodična anamneza	Da	38	10	19	9	3	22	13	22	13	3	14	28	13
	Ne	55	12	28	15	9	25	21	13	35	7	13	12	13
	p		<i>0.857</i>			<i>0.362</i>			0.004			<i>0.179</i>		
Rani početak	<55	52	9	27	16	9	26	17	23	25	4	17	22	13
	>55	42	13	21	8	4	21	17	12	23	7	10	19	13
	p		<i>0.211</i>			<i>0.495</i>			<i>0.189</i>			<i>0.612</i>		
BMI (kg/m ²)	≤25	32	11	17	4	2	16	14	12	17	3	7	16	9
	25-30	40	8	20	12	8	20	12	14	22	4	13	15	12
	>30	22	3	11	8	3	11	8	9	9	4	7	10	5
	p		<i>0.182</i>			<i>0.499</i>			<i>0.779</i>			<i>0.785</i>		
Menopauza	Da	55	14	30	11	7	26	22	20	29	6	19	21	15
	Ne	4	1	3	0	0	3	1	1	2	1	1	2	1
	p		<i>0.583</i>			<i>0.520</i>			<i>0.682</i>			<i>0.887</i>		
Rana menopauza# (<45 godina)	Da	15	4	8	3	4	8	3	6	6	3	7	6	2
	Ne	40	10	20	8	3	18	19	14	23	3	12	15	13
	p		<i>0.991</i>			<i>0.068</i>			<i>0.321</i>			<i>0.307</i>		
Perzistirajući bol	Da	56	17	31	8	3	30	23	23	26	7	9	19	9
	Ne	37	5	16	16	9	17	11	12	21	4	17	22	17
	p		0.005			0.027			<i>0.617</i>			<i>0.518</i>		

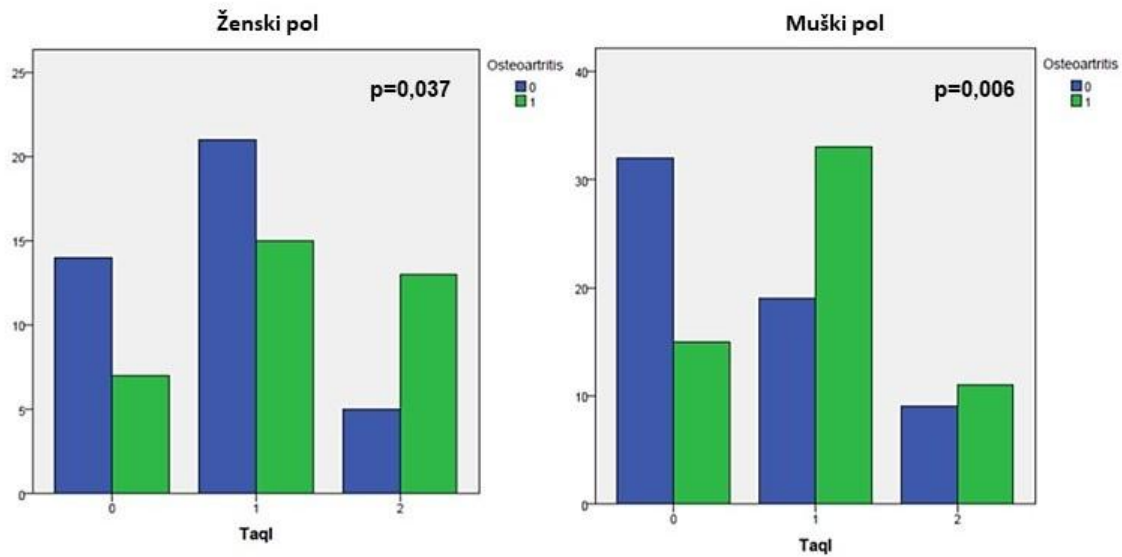
Postoji tendencija povezanosti između polimorfizma FokI i kasnijeg početka bolesti (<55), u odnosu na kontrolnu grupu, $p = 0.050$. U stratifikovanoj analizi kod osoba starijih od 55 godina postoji značajna razlika u učestalosti genotipova za FokI polimorfizam između obolelih od OA i kontrolne grupe, $p=0,027$, sa značajno većom učestalošću mutiranog genotipa ovog polimorfizma kod obolelih, Slika 9.a). Kod osoba mlađih od 55 godina nije uočena razlika u učestalostima između genotipova FokI polimorfizma u odnosu na kontrolnu grupu, $p = 0,223$, Slika 9.b).



Takođe, u stratifikovanoj analizi u odnosu na pol uočili smo povezanost FokI polimorfizma s rizikom za nastanak OA kod ženskog pola u odnosu na kontrolnu grupu, $p=0,016$, Slika 10.a). Kod muškog pola razlika nije bila značajna, $p=0,105$, Slika 10.b).



Značajnu razliku u učestalostima genotipova u odnosu na pol uočili smo i za TaqI polimorfizam, $p = 0,003$. U stratifikovanoj analizi kod muškog pola smo uočili manju učestalost wt i heterozigota, a veću učestalost mutiranog genotipa TaqI polimorfizma kod obolelih od OA u odnosu na kontrolnu grupu, $p = 0,037$, Slika 11.a). Kod ženskog pola uočena nešto drugačija distribucija genotipova i veća učestalost heterozigota i mutiranih homozigota u odnosu na kontrolnu grupu, $p = 0,006$, Slika 11.b).



6. DISKUSIJA

Osteoarthritis (OA) najčešći je degenerativni i multifaktorski poremećaj zglobova kod ljudi. Iako molekularni mehanizmi osteoartritisa nisu u potpunosti razjašnjeni, u više od polovine slučajeva u populaciji se može dovesti u vezu s genetskim faktorima koji predisponiraju nastanak i progresiju bolesti (101). Zbog svoje uloge u raznim metaboličkim procesima, kao i zbog uticaja na inflamatorne procese u koštanim tkivu, vitamin D i njegov receptor (VDR), kao i gen koji kodira VDR, mogu igrati presudnu ulogu u predispoziciji za osteoarthritis. U našoj studiji analizirali smo četiri polimorfizma gena VDR, FokI, TaqITaqI, ApaI i EcoRV za koje literaturni podaci ukazuju da mogu menjati funkciju VDR, modulirati imunski odgovor i inflamaciju (65, 68).

Naši podaci ukazuju da polimorfizmi VDR TaqI (rs731236) i FokI (rs2228570) VDR gena značajno povećavaju rizik od osteoartritisa. Osobe s TC / CC genotipovima VDR TaqI polimorfizma imaju 2,5 / 3,6 puta značajno povećan rizik od osteoartritisa u poređenju s kontrolnom grupom. Grupa pacijenata s osteoartritisom pokazuje značajne razlike u distribuciji genotipova TaqI polimorfizma u poređenju s kontrolnom grupom. Zastupljenost C alela TaqI polimorfizma VDR gena kod pacijenata koji boluju od osteoartritisa, u poređenju s kontrolnom grupom, ukazuje na njegov potencijalni značaj kao faktora rizika za nastanak ovog oboljenja.

Iako je gen za receptor vitamina D jedan od gena za koji se pretpostavilo da dovode do predispozicije za nastanak osteoartritisa, rezultati velikog broja studija i metaanaliza i dalje su nekonzistentni. Naši nalazi su u skladu s ranijim studijama koje ukazuju na potencijalnu ulogu varijanti gena VDR u predispoziciji za pojavu osteoartritisa (102, 103, 104). Studija iz 1997. pokazuje udruženost TaqI polimorfizma VDR gena s rizikom od nastanka i razvoja osteoartritisa u grupi žena u menopauzi, što odgovara nalazima naše studije (102). Finska studija iz 2005, koja je uključivala žene obbolele od osteoartritisa ruku, takođe ukazuje na snažnu korelaciju s učestalošću TaqI polimorfizma (103). Drugo istraživanje je pokazalo da je polimorfizam TaqI VDR povezan s povećanim rizikom od primarnog osteoartritisa kolena u meksičkoj populaciji (105) i sa simetričnim osteoartritičnim promjenama na rukama kod žena u Finskoj, koja je mogla da se modifikuje unosom kalcijuma (103). Osim toga, polimorfizmi VDR BsmI i TaqI bili su povezani s predispozicijom za pojavu osteoartritisa kičme (106). Međutim, druge studije i metaanalize nisu pokazale povezanost varijanti VDR gena s podložnošću na osteoarthritis (106, 108–111). U jednoj metaanalizi, koja je obuhvatila evropsku i azijsku populaciju, pokazana je značajna povezanost između ApaI polimorfizma i incidence osteoartritisa kod Azijata (107), ali postoje i novija istraživanja koja ne potvrđuju ovu povezanost (106). Nedostatak povezanosti s polimorfizmima ApaI i TaqI VDR takođe je primećen kod turskih pacijenata s osteoartritisom temporo-mandibularnog zgloba (112).

Polimorfizmi gena za receptor vitamina D dali su nekonzistentne rezultate u različitim populacijama. Koliko nam je poznato, polimorfizam gena za VDR EcoRV nije prethodno ispitivan kod osoba s osteoartritisom, dok studije polimorfizama gena za VDR nisu rađene na pacijentima s osteoartritisom u srpskoj populaciji.

Odstupanja između različitih studija povezanosti slučaja i kontrole VDR i osteoartritisa, kao i drugih degenerativnih i inflamatornih bolesti zglobova, mogu se objasniti genetskom

heterogenošću među različitim populacijama, jer aleli rizika često pokazuju etničku stratifikaciju, kao što je pokazano kod azijskih pacijenata s osteoartritisom, ali ne i kod Evropljana (107). S druge strane, polimorfizam VDR FokI pokazao je povezanost s degenerativnim promjenama intervertebralnog diska među Evropljanima, ali ne i među Azijatima (69). Štaviše, različiti polimorfizmi VDR vršili su suprotne efekte na predispoziciju za reumatoidni artritis u različitim populacijama (113). Nedosledni nalazi među studijama takođe mogu biti rezultat kriterijuma koji su primenjivani za uključivanje pacijenata s OA u analizu, kliničke heterogenosti, starosnih ili rodnih razlika među slučajevima i kontrolama i razlikama u pogođenim vrstama zglobova, u zavisnosti da li se radi o zglobovima koji nose težinu, kao što su kolena i kukovi, ili ostalim zglobovima (14, 114). Štaviše, promenljivi efekti rizičnih alela gena za VDR mogu se modulirati ishranom i zavisiti od nedostataka vitamina D specifičnih za pojedinu državu. Stoga, povezanost polimorfizama gena za VDR s rizikom od osteoartritisa treba da bude bazirana na određenoj homogenoj populaciji, sa zdravim kontrolama usklađenim s uzrastom, i stratifikovana vrstom pogođenog zgloba.

Polimorfizmi VDR gena mogu uticati na aktivnost proteina VDR i dovesti do promene u mestu vezivanja kalcitriola. Na taj način mogu uticati na mineralizaciju kostiju i protivinflamatorne funkcije vitamina D, a time mogu ostvarivati svoj uticaj na genetsku podložnost za oboljevanje od osteoartritisa. Polimorfizam TaqI polimorfizam ne ostvaruje svoje dejstvo direktno, promenom aktivnosti proteina, već indirektno. Naši rezultati o povezanosti TaqI polimorfizma s OA mogu biti rezultat razlika u ekspresiji gena, što je prethodno pokazano poređenjem stanja intraartikularne hrskavice kolena i kukova zdravih i osteoartritisom pogođenih osoba (115, 116). Sveobuhvatna analiza ekspresije gena otkriva različitu ekspresiju gena na individualnom genskom nivou, između pacijenata koji pate od osteoartritisa kuka u odnosu na one koji imaju osteoartrične promene zgloba kolena (95). Ova otkrića ukazuju na to da bi aleli povezani s povišenim rizikom za nastanak i progresiju osteoartritisa mogli češće da pokazuju efekte specifične za zglobove, a da retko imaju sistemske efekte. Osim toga, indirektni efekat TaqI polimorfizma može se objasniti i postojanjem neravnoteže vezanosti s nekim drugim funkcionalnim polimorfizmom u istom ili blisko lociranom genu, s kojim se TaqI nasleđuje u vidu istog haplotipskog bloka, što se manifestuje povišenim rizikom za razvoj osteoartritisa.

Naši nalazi korelacije polimorfizma VDR TaqI i FokI s prevalencijom upornog bola u skladu su s prethodnim nalazima koji ukazuju na povezanost FokI varijante i niskog nivoa vitamina D3 s hroničnim bolom u osteoartritisom izmenjenom zglobu kolena (111). Nedostatak vitamina D povezan je s bolom kod pacijenata s osteoartritisom (117, 118). U ranim fazama osteoartritisa, bol je povezan sa stepenom fizičke aktivnosti preko nociceptivnih receptora, dok se kod uznapredovalih formi osteoartritisa hronični bol širi i modulira ne samo preko neurobioloških mehanizama nego i na druge načine u kojima i vitamin D može imati potencijalnu ulogu u optimizaciji neurološkog funkcionisanja i smanjenju upalnog procesa (119).

Razlike u rezultatima ovih studija mogu biti povezane s različitim efektima vitamina D u serumu na metabolizam kostiju i hrskavice. Vitamin D utiče na mineralizaciju koštanog matriksa, a moguće je da nizak nivo vitamina D u serumu dovede do loše mineralizovane

kosti koja može izmeniti sile u zglobu i smanjiti propadanje zgloba (83). Međutim, nizak nivo vitamina D takođe može izmeniti metabolizam hondrocita i povećati degeneraciju (87). Dodatne studije neophodne su da bi se utvrdila uloga vitamina D u nastanku i progresiji OA.

Veći broj kliničkih i eksperimentalnih studija daje oprečne nalaze o povezanosti vitamina D i osteoartritisa (88). Felson i dr. objavili su nalaze dve različite longitudinalne studije pacijenata s OA kolena, u cilju analize povezanosti nivoa 25(OH)D₃ s pojavom i napredovanjem OA kolena. U jednoj studiji pokazala se povezanost nivoa 25(OH)D s gubitkom prostora u zglobu tokom vremena, ispitana u odabranoj kohorti bez obzira na prisustvo OA kolena. Druga studija obuhvatila je grupu pacijenata koji su imali simptomatsku OA kolena. Oni su procenili povezanost 25(OH)D nivoa s gubitkom zglobnog prostora koji se vidi na radiografima i gubitkom hrskavice dijagnostikovanom na snimku magnetnom rezonancom (MRI). Ispitivanjem OA kolena nije pronađena povezanost između nivoa vitamina D i pogoršanja strukturne bolesti, koja je definisana kao gubitak zajedničkog prostora na radiografiji ili gubitak hrskavice na MRI (80). Ovim nalazima pomogla je velika kohortna studija o 5.274 učesnika bez OA u Finskoj. Studija nije utvrdila povezanost između niskog nivoa 25(OH)D₃ u serumu i povećanog rizika od razvoja OA kuka ili kolena tokom deset godina (26). Nijedna od ovih studija ne podržava hipotezu da visoki nivoi 25(OH)D₃ štite od OA kolena i kuka (82). Suprotno ovim nalazima, više studija ukazalo je na povezanost između niskih 25(OH)D₃ nivoa i OA. Prospektivna kohortna studija na 5,995 muškaraca u SAD-u otkrila je visoku prevalenciju insuficijencije ili nedostatka vitamina D kod pacijenata s OA kuka, kao i da je dvostruko verovatnije da ti pacijenti imaju radiografski OA kuka od muškaraca s normalnim nivoom 25(OH)D₃ (83). Bergink i sar. sprovedli su prospektivnu kohortnu studiju s 1248 pacijenata s OA kolena. Zaključili su da nizak prehrambeni unos vitamina D povećava rizik od napredovanja OA kolena. Poboljšanje statusa vitamina D kod starijih osoba moglo bi zaštititi od razvoja i pogoršanja OA kolena, posebno kod osoba s niskim mineralnom gustinom kostiju (84). U Egiptu, istraživanje na ženama u postmenopauzi otkriva da je niži serumski 25(OH)D₃ povezan s OA kolena, u poređenju sa zdravim muškarcima (85). Metaanaliza 15 studija, koju su izvršili Cao i saradnici, pokazala je značajnu povezanost između 25(OH)D₃ i gubitka hrskavice u zglobovima kolena. Autori su takođe primetili pozitivnu vezu između niskog nivoa vitamina D i radiografske OA kolena (86).

Među istraživanjima koja ispituju povezanost vitamina D i zglobnih hrskavica u različitim modelima OA najviše implicira na odnos između vitamina D i integriteta hrskavice. Dok se vitamin D u nekim slučajevima može smatrati korisnim, u drugima se može pokazati da olakšava eroziju hrskavice (89). Bez univerzalnog eksperimentalnog modela ili pristupa studije, posmatrani ishodi mogu zavisiti od korišćene eksperimentalne podloge, metoda merenja i trajanja izlaganja. Životinjskim modelima osteoartritisa takođe može nedostajati validnost ako su u potpunosti ekvivalentna s kliničkim stanjima, ako je kvalitet mišića normalan, gojaznost nije evidentna, a komorbidna stanja nisu očigledna. Analizom kliničkih studija, Marks je ustanovio da ne postoji konsenzus u pogledu vitamina D i OA zbog mnogih faktora. Studije imaju različite rezultate jer različito traju, razlikuju im se kriterijumi isključivanja ili uključivanja, vrsta i stepen bolesti, broj i tipovi pogođenih zglobova, prisustvo, broj i vrsta drugih hroničnih stanja i intervencija, i nepoznate stope upotrebe lekova i suplemenata. Studije su se odvijale u različitim godišnjim dobima i na različitim

geografskim širinama, a poznata je fluktuacija u nivoima aktivne forme vitamina D s različitim izloženošću sunčevim zracima. Osim toga, evidentne su i razlike u ishrani u različitim populacijama, nivoi vitamina D u serumu nisu ujednačeni, niti su standardizovani (88), što sve doprinosi velikoj heterogenosti studija i oprečnim nalazima.

Kako ne postoje konzistentni podaci o ulozi vitamina D kao prekursora OA, ne postoji ni konsenzus o njegovoj upotrebi kao terapijskog sredstva. U dvostruko slepom, randomizovanom ispitivanju placebo, Arden i sar. pokazali su da nema značajne razlike u brzini sužavanja prostora u zglobovima u medijalnom odeljku kolena nakon suplementacije vitaminom D (90). Iako vitamin D može imati mali uticaj na gubitak hrskavice, moguće je da nedostatak vitamina D bitno utiče na druge elemente bolesti, uključujući bol i slabost, koji su kritični za iskustvo pacijenta s OA. Pokazalo se da su niski nivoi vitamina D povezani sa slabošću mišića i povećanim rizikom od bolova (91, 92). U dvostruko slepoj studiji sa 103 pacijenta s OA kolena, pacijenti koji su primali oralni suplement vitamina D imali su nešto manje bolova u poređenju s onima kojima je davan placebo posle jednogodišnjeg praćenja. Ovi pacijenti, međutim, nisu bili fizički jednako sposobni kao njihove placebo kontrole (93). Pored toga, 787 ispitanika studije iz Hertfordšira u Velikoj Britaniji učestvovalo je u unakrsnom ispitivanju koje nije otkrilo povezanost nivoa vitamina D i radiografske OA kolena, ali je sugeriralo značajnu povezanost između vitamina D i bolova u kolenima (94). S druge strane, u dvogodišnjoj studiji u kojoj su simptomatskim pacijentima s OA kolena davane oralne doze holekalciferola, u cilju povećanja niva vitamina D u serumu, nije došlo do smanjenja broja bolova u kolenu (95).

Uprkos višedecenijskim naporima da se smanji incidenca osteoartritisa ili uspori tok bolesti, ne vidi se istinski napredak u proteklih 30 godina, osim u oblasti hirurških zamena zglobova (96). Dokazi ukazuju da 84 % hirurških slučajeva pacijenata podvrgnutih totalnoj artroplastici zgloba u krajnjem stadijumu OA, s niskim nivoom vitamina D, ima veću verovatnoću za neku od komplikacija u okviru prvih 90 dana od operacije, uključujući i periprotetičke infekcije zglobova nakon operacije, nego pacijenti s adekvatnim nivoom vitamina D (97, 98). Zbog toga, Traven i sar. (97) predlažu da se preoperativni nivoi vitamina D razmotre kao faktor rizika za komplikacije i da se prema njima postupa. Razni autori zaključili su da, bilo direktno ili indirektno, kroz uticaj na mišiće i kosti, upale i gojaznost (99, 100), prisustvo adekvatnih nivoa vitamina D u serumu može pomoći u smanjenju bola i disfunkcije zglobova u slučajevima osteoartritisa, bez obzira na stadijum bolesti (85, 91, 92). Čak i ako se zaustavi progresija bolesti usled suplementacije vitaminom D, to se samo može smatrati pozitivnim rezultatom u kontekstu ove progresivne degenerativne bolesti.

Budući da je osteoartritis najčešća progresivna degenerativna bolest zglobova u svetu, terapijske mogućnosti treba proširiti. Vitamin D3 može biti obećavajući dijetetski faktor u prevenciji ili lečenju osteoartritisa, zbog svoje uloge u mineralizaciji kostiju i antiinflamatornim efektima. Prethodna otkrića pokazala su da bi progresija osteoartritisa mogla biti povezana s niskim nivoom vitamina D3, i da dodatak vitamina D3 pozitivno utiče na strukturu zgloba kod pacijenata s osteoartritisom (120). Lečenje vitaminom D3 uzrokuje dugotrajnu inhibiciju proliferacije ćelija i proizvodnju citokina u sinovijalnim stromalnim ćelijama, što je dokazano laboratorijski, ispitivanjem efekata vitamina D na ćelijske kulture

pacijenata s osteoartritisom (121). Dodatak vitamina D3 starijim pacijentima koji boluju od osteoartritisa smanjuje bol i poboljšava kvalitet života (122, 123). Niz drugih studija pokazao je nedosledne rezultate, ukazujući na to da bi dodatak vitamina D3 mogao verovatnije pokazati svoje efekte usporavanjem napredovanja osteoartritisa, umesto da ga zaustavi ili poništi simptome. Pojedinačni odgovori na suplementaciju vitaminom D mogu biti diktirani genetskim polimorfizmima i možda su izvor nedoslednosti između različitih studija.

Iako istraživanje multifaktorskih oboljenja poput OA predstavlja veliki izazov, saznanja o kompleksnoj mreži različitih proteina koji učestvuju u mineralizaciji kostiju, izgradnji zglobne hrskavice i matriksa i u modulaciji imunskog odgovora, kao i genetske osnove koja dovodi do predispozicije za nastanak osteoartritisa, pružila bi detaljan uvid u patofiziologiju OA. Nakon razvoja različitih vidova imunoterapije i utvrđivanja genetskih promena koje se dovode u vezu s ovom bolešću, savremena medicina bi u budućnosti mogla da smanji incidencu, zaustavi tok ili uspori progresiju OA personalizovanim pristupom u lečenju pacijenata. Optimalna strategija za OA bila bi individualizovana terapija na osnovu genetičkog profila i kliničkog stanja pacijenta. Dalje genetske studije mogle bi dati veliki doprinos farmakogenomici osteoartritisa i uspostavljanju personalizovanih medicinskih pristupa koji mogu usporiti progresiju, ublažiti simptome i sprečiti hirurško lečenje pacijenata s uznapredovalom bolešću. Studije polimorfizma u genima koji kodiraju proteine uključene u fiziološka i patološka stanja zglobova, osim što su mogući terapijski ciljni molekuli u lečenju bolesti, mogu predstavljati i važno sredstvo u ranoj identifikaciji rizika za razvoj OA.

Da zaključimo, rezultati dobijeni u ovoj studiji mogli bi da doprinesu daljem rasvetljavanju uloge varijanti gena za VDR u osteoartritisu. Naša otkrića pokazuju da su polimorfizmi gena VDR TaqI (rs731236) i FokI (rs2228570) značajno povezani s predispozicijom za osteoartritis. Polimorfizmi gena za receptor vitamina D (VDR) mogu predisponirati nastanak osteoartritisa specifičnog za zglobove, kao i prisustvo hroničnog, trajnog bola kod pacijenata s dijagnostikovanim osteoartritisom.

Ovo istraživanje je, prema našim saznanjima, obuhvatilo do sada najveći broj ispitanika s dijagnostikovanim osteoartritisom u Srbiji, u cilju ispitivanja uloge FokI, TaqI, ApaI i EcoRV polimorfizama VDR gena, pritom vodeći računa o stratifikaciji ispitanika prema polu i starosnoj dobi, kao i drugim faktorima rizika. Potrebne su dodatne studije da bi se rešili oprečni nalazi o ulozi vitamina D u razvoju i napredovanju osteoartritisa. Randomizirano kontrolisano ispitivanje omogućilo bi najobuhvatnije utvrđivanje uticaja dodatka vitamina D na razvoj osteoartritisa. Suplementacija vitaminom D3 pacijenata s osteoartritisom, kao i rizičnih grupa za nastanak osteoartritisa, mogla bi imati pozitivan efekat na usporavanje toka bolesti ili sprečavanje ili odlaganje pojave simptoma u rizičnim grupama ili kod osoba s genetskom predispozicijom za nastanak osteoartritisa, odn. porodičnim opterećenjem. Osim toga, suplementacija vitaminom D3 mogla bi uticati na ublažavanje kliničke slike ili pojavu bola. Predložena primena vitamina D3 u budućnosti može uticati na manifestacije osteoartritisa kao što su upala, bol, disfunkcija zglobova i nizak kvalitet života. Utvrđivanje prisustva nedostatka vitamina D i njihovo ranije otklanjanje tokom životnog veka, moglo bi se pokazati efikasnim i ekonomičnim načinom za smanjivanje invaliditeta u kasnijoj životnoj dobi. S obzirom na ključnu ulogu vitamina D u metabolizmu kostiju i upalnim

procesima, biće potrebna buduća integrativna analiza koja kombinuje širi panel genetskih promena, epigenetskih i transkriptomskih podataka kako bi se razjasnila uloga vitamina D i VDR u osteoartritisu. Budući pravci za lečenje osteoartritisa mogli bi da uključuju individualizovan pristup i suplementaciju vitamina D prema genotipu polimorfizmima VDR i statusu vitamina D u serumu osobe, kako bi potencijalno odložili nastanak osteoartritisa, usporili napredovanje ili smanjili bol kod pacijenata s osteoartritisom.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu analize dobijenih rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji izvedeni su sledeći zaključci:

- Naši rezultati ukazali su na značajnu razliku u TaqI distribuciji genotipa VDR između grupe pacijenata s OA i zdravih kontrola, dok je za FokI polimorfizam uočena tendencija ka različitoj učestalosti genotipa pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.
- Analiza specifična za zglobove otkrila je značajne razlike u distribuciji genotipa TaqI VDR pacijenata s OA kuka i osteoartritisom kolena, u odnosu na kontrolnu grupu.
- Nije utvrđena razlika u distribuciji genotipa za ApaI i EcoRV VDR polimorfizama između pacijenata s OA i kontrolne grupe.
- Rezultati analize odnosa šansi prilagođene za pol i godine, poznate faktore rizika, pokazali su da je polimorfizam VDR TaqI značajno povezan s povećanim rizikom od OA, dok je polimorfizam VDR FokI povezan sa značajno povećanim rizikom od OA kolena, ali ne i OA kuka.
- U aditivnom modelu, polimorfizam VDR ApaI je doveden u vezu sa smanjenim rizikom za nastanak OA.
- Polimorfizmi VDR TaqI i FokI značajno povezani s pojavom trajnog (hroničnog) bola.
- ApaI VDR polimorfizam je doveden u vezu s porodičnom istorijom OA.
- U stratifikovanoj analizi osoba starijih od 55 godina uočena je značajno veća učestalost mutiranog genotipa za FokI polimorfizam obolelih od OA u odnosu na kontrolnu grupu, dok kod osoba mlađih od 55 godina nije uočena ova razlika.
- U stratifikovanoj analizi u odnosu na pol uočena je povezanost FokI polimorfizma s rizikom za nastanak OA kod ženskog pola u odnosu na kontrolnu grupu, dok kod muškog pola razlika nije bila značajna.
- Značajnu razliku u učestalostima genotipova u odnosu na pol uočili smo i za TaqI polimorfizam u odnosu na kontrolnu grupu, s drugačijom distribucijom genotipova između polova.

8. REFERENCE

1. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2014; 28(1):5-15.
2. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;388(10053):1545-1602.
3. Atanacković M., Bacetić D. (2009). Kosti, zglobovi i tumori mekih tkiva. In Katedra za patologiju (Eds.), *Patologija (747-795)*. Beograd: Medicinski Fakultet Univ. U Beogradu.
4. Mabey T, Honsawek S. Role of Vitamin D in Osteoarthritis: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives. *Int J Endocrinol* 2015; vol.2015: 383918.
5. Spector TD, Hart DJ, Leedham-Green M. The prevalence of knee and hand osteoarthritis(OA) in the general population using different clinical criteria: the Clingford study. *Arthritis Rheum* 1991;34:S 171.
6. Bagge E, Bjelle E, Svanborg A. Radiographic osteoarthritis in the elderly. A cohort comparison and longitudinal study of the "70-year old people in Goteburg". *Clin Rheumatol* 1992;11:486-91.
7. Masse JP, Glimet T, Kluntz D. Age de debut et frequences des douleurs chroniques dans la gonarthrose. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1992;1:17-21.
8. Wilson MG, Michet CJ, Ilstrup DM, Melton LJ. Idiopathic symptomatic osteoarthritis of the hip and knee: a population-based incidence study. *Mayo Clin Proc* 1990;65:1214-21.
9. Brandt KD, Mankin HJ, Shulman JE. Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1986;13:1126-1160.
10. Kumar V, Abbas AK, Mitchell RS, Nelson F. *Robbins Basic Pathology*. 2007; 21:817-819.
11. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*. 2003; 81(9):646-56.
12. Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Research & Therapy*. 2009; 11(5):241.
13. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, Goldring SR, Jones G, Teichtahl AJ, Pelletier J. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2:1-18.
14. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2010; 26(3):355-69.
15. Warner SC, Valdes AM. Genetic association studies in osteoarthritis: is it fairytale?. *Current opinion in rheumatology*. 2017; 29(1):103-9.

16. Vina ER, Kwok CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Current Opinion in Rheumatology*. 2018; 30(2):160-7.
17. Bennell K, Hinman RS, Wrigley TV, Creaby MW, Hodges P. Exercise and osteoarthritis: cause and effects. *Comprehensive Physiology*. 2011; 1(4):1943-2008.
18. Xia B, Chen D, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcified Tissue International*. 2014; 95(6):495-505.
19. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, Carr AJ. Osteoarthritis. *The Lancet*. 2015; 386(9991):376-87.
20. Jang S, Lee K, Ju JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2619. Published 2021 Mar 5. doi:10.3390/ijms22052619
21. Cooper C. The epidemiology of osteoarthritis. U: Klippel J, Dieppe P, eds. *Rheumatology*. New York: Mosby. 1994:7.3.1.-4.
22. Heine J. Über die arthritis deformans. *Arch Path Anat* 1926;260:521.
23. Stankovic A, Mitrovic D, Ryckewaert A. Prevalence of degenerative lesions in articular cartilage of the human knee joint: relationship with age. U: Peyron JG, ed. *Epidemiologie de l'arthrose*. Paris: Geigy. 1980:94-8.
24. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1986;213:34-40.
25. Massardo L, Watt I, Cushnaghan J, Dieppe PA. An eight year prospective study of osteoarthritis of the knee joint. *Ann Rheum Dis* 1989;48:893-7.
26. Miller R, Kettelkamp DB, Lauberthal KN. Quantitative correlations in degenerative arthritis of the knee. *J Bone Joint Surg* 1973;55A:956-62.
- 27 Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1957;16:494-501.
28. Kellgren JH, Jeffrey MR, Ball J. *The Epidemiology of Chronic Rheumatism: Atlas of Standard Radiographs*. Vol 2. Oxford: Blackwell Scientific c. 1963.
29. J. A. Ferrier¹, E. Rowbotham¹, M. Mcleery², P. Robinson. Under-reporting of the severity of osteoarthritis on primary care-referred radiographs by non musculoskeletal radiologists. *ESSR 2015 / P-0053*
30. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K. et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*; 1986;29:1039-1049.
31. Altman R. Classification of disease: osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1991;20(6, suppl 2):40-47.

32. Shirley P Yu, David J Hunter. Managing osteoarthritis. *Aust Prescr*. 2015 Aug. 38(4): 115–119
33. Susanne Grässel, Dominique Muschter. Recent advances in the treatment of osteoarthritis. 2020; 9: F1000 Faculty Rev-325; 10.12688/f1000research.22115.1
34. Hunter DJ. Lower extremity osteoarthritis management needs a paradigm shift. *Br J Sports Med* 2011;45:283-8.
35. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22:363-88.
36. Messier SP, Mihalko SL, Legault C, Miller GD, Nicklas BJ, DeVita P, et al. Effects of intensive diet and exercise on knee joint loads, inflammation, and clinical outcomes among overweight and obese adults with knee osteoarthritis: the IDEA randomized clinical trial. *JAMA* 2013;310:1263-73.
37. McGettigan P, Henry D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA* 2006;296:1633-44.
38. Spiegel BM, Farid M, Dulai GS, Gralnek IM, Kanwal F. Comparing rates of dyspepsia with Coxibs vs NSAID+PPI: a meta-analysis. *Am J Med* 2006;119:448.e27-36.
39. Miceli-Richard C, Le Bars M, Schmidely N, Dougados M. Paracetamol in osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 2004;63:923-30.
40. Mason L, Moore RA, Derry S, Edwards JE, McQuay HJ. Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *BMJ* 2004;328:991.
41. Raynauld JP, Buckland-Wright C, Ward R, Choquette D, Haraoui B, Martel-Pelletier J, et al. Safety and efficacy of long-term intraarticular steroid injections in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2003;48:370-7.
42. Rutjes AW, Jüni P, da Costa BR, Trelle S, Nüesch E, Reichenbach S. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012;157:180-91.
43. Nüesch E, Rutjes AW, Husni E, Welch V, Jüni P. Oral or transdermal opioids for osteoarthritis of the knee or hip. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(4):CD003115.
44. Reichenbach S, Sterchi R, Scherer M, Trelle S, Bürgi E, Bürgi U, et al. Meta-analysis: chondroitin for osteoarthritis of the knee or hip. *Ann Intern Med* 2007;146:580-90.
45. Cleland LG, James MJ. Osteoarthritis. Omega-3 fatty acids and synovitis in osteoarthritic knees. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:314-5.
46. Karsdal MA, Michaelis M, Ladel C, et al. : Disease-modifying treatments for osteoarthritis (DMOADs) of the knee and hip Lessons learned from failures and opportunities for the future. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(12):2013–21. 10.1016/j.joca.2016.07.017

47. Roubille C, Pelletier JP, Martel-Pelletier J: New and emerging treatments for osteoarthritis management: Will the dream come true with personalized medicine? *Expert Opin Pharmacother*. 2013;14(15):2059–77. 10.1517/14656566.2013.825606
48. Vaysbrot EE, Osani MC, Musetti MC, et al. : Are bisphosphonates efficacious in knee osteoarthritis? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(2):154–64. 10.1016/j.joca.2017.11.013
49. Yu Y, Liu D, Feng D, et al. : Association between Vitamin D and Knee Osteoarthritis: A PRISMA-Compliant Meta-analysis. *Z Orthop Unfall*. 2020. 10.1055/a-1098-8815
50. Madry H, Cucchiaroni M: Gene therapy for human osteoarthritis: principles and clinical translation. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(3):331–46. 10.1517/14712598.2016.1124084 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
51. Watson Levings RS, Broome TA, Smith AD, et al. : Gene Therapy for Osteoarthritis: Pharmacokinetics of Intra-Articular Self-Complementary Adeno-Associated Virus Interleukin-1 Receptor Antagonist Delivery in an Equine Model. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2018;29(2):90–100. 10.1089/humc.2017.142
52. Anderson PH, Turner AG, Morris HA, Vitamin D actions to regulate calcium and skeletal homeostasis. *Clin Biochem* 2012; 45(12): 880–886.
53. Müller DN, Kleinewietfeld M, Kvakan H. Vitamin D review. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2011; 12(2):125-8.
54. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, Shoenfeld Y, Lerchbaum E, Llewellyn DJ, Kienreich K, Soni M. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—a review of recent evidence. *Autoimmunity Reviews*. 2013; 12(10):976-89.
55. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *New England Journal of Medicine*. 1989; 320(15):980-91.
56. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *European Journal of Nutrition* 2013; 52(2): 429–441.
57. Kogawa M, Anderson PH, Findlay DM, Morris HA, Atkins GJ. The metabolism of 25-(OH)vitamin D3 by osteoclasts and their precursors regulates the differentiation of osteoclasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121(1-2):277–280.
58. Laura Hargrove, Taylor Francis, Heather Francis Vitamin D and GI cancers: shedding some light on dark diseases, *ATM Vol 2, No 1* (January 2014)
59. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 2005; 289(1): F8-F28.

60. Remelli, F.; Vitali, A.; Zurlo, A.; Volpato, S. Vitamin D Deficiency and Sarcopenia in Older Persons. *Nutrients* 2019, *11*, 2861. <https://doi.org/10.3390/nu11122861>
61. Lanske B , Densmore MJ, Reinhold G, Erben RG. Vitamin D endocrine system and osteocytes Bonekey Rep 2014; 3: 494.
62. Quarles LD. Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8(5):276-86.
63. Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK et al. Vitamin D Receptor: Key Roles in Bone Mineral Pathophysiology, Molecular Mechanism of Action, and Novel Nutritional Ligands. *J Bone Miner Res* 2007; 22(2):2-10.
64. Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Rheumatic Disease Clinics.* 2012; 38(1):13-27.
65. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, Pols HA, van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004; 338(2):143-56.
66. Laverny, Gilles. (2010). Efficacy of a potent and safe vitamin D receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunol. Lett.* 131.
67. Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science.* 2005; 307(5712):1072-9.
68. van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, Overbergh L, Verstuyf A, Bouillon R, Roep BO, Badenhoop K, Mathieu C. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):395-405.
69. Chen L, Zhao S, Niu F, Bi GB. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and intervertebral disc degeneration: A meta-analysis. *J Orthopaedic Sci.* 2017; 22(2):184-189.
70. Corrado A, Neve A, Macchiarola A, Gaudio A, Marucci A, Cantatore FP. RANKL/OPG ratio and DKK-1 expression in primary osteoblastic cultures from osteoarthritic and osteoporotic subjects. *J Rheumatol* 2013;40(5):684-694.
71. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 1998;41(5):891-899.
72. Walsh DA, McWilliams DF, Turley MJ et al. Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology* 2010;49(10):1852-1861.

73. Saetan N, Honsawek S, Tanavalee A et al. Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis. *Intl Orthop* 2014;38(5):1099–1104.
74. Rossini, S. Adami, O. Viapiana et al. Dose-dependent short-term effects of single high doses of oral vitamin D3 on bone turnover markers. *Calcif Tissue Int* 2012;91(6):365–369.
75. Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S et al. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest* 2006; 116(12): 3150–3159.
76. Orfanidou T, Malizos KN, Varitimidis S, Tsezou A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and extracellular inorganic phosphate activate mitogen-activated protein kinase pathway through fibroblast growth factor 23 contributing to hypertrophy and mineralization in osteoarthritic chondrocytes. *Exp Biol Med* 2012;237(3):241–253.
77. Ming Jie, Cronin Shane J. F., Penninger Josef M. Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy *Frontiers in Oncology*, vol 10, 2020., 2234-943X
78. Jansen JA, Haddad FS. High prevalence of vitamin D deficiency in elderly patients with advanced osteoarthritis scheduled for total knee replacement associated with poorer preoperative functional state. *Ann R Coll Surg Engl* 2013;95(8): 569–572.
79. Haroon M, Bond U, Quillinan N, Phelan MJ, Regan MJ. The prevalence of vitamin D deficiency in consecutive new patients seen over a 6-month period in general rheumatology clinics. *Clin Rheumatol* 2011; 30(6): 789–794.
80. Felson DT, Niu J, Clancy M, et al. Low Levels of Vitamin D and Worsening of Knee Osteoarthritis. Results of Two Longitudinal Studies. *Arthritis Rheum* 2007;56(1):129–136.
81. Konstari S, Kaila-Kangas L, Jaaskelainen T et al. “Serum 25- hydroxyvitamin D and the risk of knee and hip osteoarthritis leading to hospitalization: a cohort study of 5274 Finns. *Rheumatology* 2014;53(10):1778–1782.
82. Kwan Tat S, Lajeunesse D, Pelletier JP, Martel-Pelletier J .Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res.* 2010;24: 51-70.
83. Chaganti RK, Parimi N, Cawthon P, Dam TL, Nevitt MC, Lane NE. Association of 25-hydroxyvitamin D with prevalent osteoarthritis of the hip in elderly men: the osteoporotic fractures in men study. *Arthritis & Rheum* 2010;62(2):511–514.
84. Bergink AP, Uitterlinden AG, Van Leeuwen JP, Buurman CJ, Hofman A, Verhaar JA, Pols HA. Vitamin D status, bone mineral density, and the development of radiographic osteoarthritis of the knee: the Rotterdam Study. *J Clin Rheumatol* 2009; 15(5): 230-237.
85. Abu El Maaty MA, Hanaf RS, Badawy SE, Gad MZ. Association of suboptimal 25-hydroxyvitamin D levels with knee osteoarthritis incidence in post-menopausal Egyptian women. *Rheumatol Int* 2013;33(11): 2903– 2907.

86. Cao Y, Winzenberg T, Nguo K, Lin J, Jones G, Ding C. Association between serum levels of 25-hydroxyvitamin D and osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology* 2013; 52(7):1323–1334.
87. Ding C, Cicuttini F, Parameswaran V, Burgess J, Quinn S, Jones G Serum levels of vitamin D, sunlight exposure, and knee cartilage loss in older adults: the Tasmanian older adult cohort study. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(5):1381-9.
88. Marks R. Vitamin D and Osteoarthritis: What is the Consensus? *Int J Orthop* 2018;5(1) 849-862.
89. Castillo EC, Hernandez-Cueto MA, Vega-Lopez MA, Lavalle C, Kouri JB, Ortiz-Navarrete V. Effects of vitamin D supplementation during the induction and progression of osteoarthritis in a rat model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 156563.
90. Arden NK, Cro S, Sheard S, Doré CJ, Bara A, Tebbs SA, Hunter DJ, James S, Cooper C, O'Neill TW, Macgregor A, Birrell F, Keen R The effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis, the VIDEO study: a randomised controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016; 24(11):1858-1866.
91. Laslett LL, Quinn S, Burgess JR et al. Moderate vitamin D deficiency is associated with changes in knee and hip pain in older adults: a 5-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis,* 2014;73(4): 697–703.
92. Heidari B, Javadian Y, Babaei M, Yousef-Ghahari B. Restorative effect of vitamin D deficiency on knee pain and quadriceps muscle strength in knee osteoarthritis. *Acta Med Iran* 2015; 53(8): 466-470.
93. Sanghi D, Mishra A, Sharma AC, Singh A, Natu SM, Agarwal S, Srivastava RN. Does vitamin D improve osteoarthritis of the knee: a randomized controlled pilot trial. *Clin Orthop Relat Res.* 2013 Nov; 471(11):3556-62.
94. Muraki S, Dennison E, Jameson K et al. Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2011;19(11):1301–1306.
95. McAlindon T, LaValley M, Schneider E, Nuite M, Lee JY, Price LL, Lo G, Dawson-Hughes B. Effect of vitamin D supplementation on progression of knee pain and cartilage volume loss in patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2013; 309(2):155-62.
96. Oliviero F, Ramonda R, Punzi L. New horizons in osteoarthritis. *Swiss Med Wkly* 2010;17:140.
97. Traven SA, Chiaramonti AM, Barfield WR, Kirkland PA, Demos HA, Schutte HD, Drew JM. Fewer complications following revision hip and knee arthroplasty in patients with normal vitamin D levels. *J Arthroplasty* 2017; 32(9S): S193-S196.
98. Nawabi DH, Chin KF, Keen RW, Haddad FS. Vitamin D deficiency in patients with osteoarthritis undergoing total hip replacement: a cause for concern? *J Bone Joint Surg Br* 2010; 92(4): 496-499.

99. Glover TL, Goodin BR, King CD, Sibille KT, Herbert MS, Sotolongo AS, Cruz-Almeida Y, Bartley EJ, Bulls HW, Horgas AL, Redden DT, Riley JL 3rd, StaudR, Fessler BJ, Bradley LA, Fillingim RB. A cross-sectional examination of vitamin D, obesity, and measures of pain and function in middle-aged and older adults with knee osteoarthritis. *Clin J Pain* 2015; 31(12): 1060-1067.
100. Rai V, Dietz NE, Dilisio MF, Radwan MM, Agrawal DK. Vitamin D attenuates inflammation, fatty infiltration, and cartilage loss in the knee of hyperlipidemic microswine. *Arthritis Res Ther* 2016;18(1):203.
101. Lanyon P, Muir K, Doherty S, Doherty M. Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study. *BMJ*. 2000;321(7270):1179–83.
102. Keen RW, Hart DJ, Lanchbury JS, Spector TD. Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. *Arthritis & Rheumatology*. 1997; 40(8):1444-9.
103. Solovieva S, Hirvonen A, Siivola P, Vehmas T, Luoma K, Riihimäki H, Leino-Arjas P. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility of hand osteoarthritis in Finnish women. *Arthritis research & therapy*. 2005; 8(1):R20.
104. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Odding E, Duijn CM, Hofman A, Birkenhäger JC, van Leeuwen JP, Pols HA. Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J Clin Invest*. 1997;100(2):259–63.
105. González-Huerta NC, Borgonio-Cuadra VM, Morales-Hernández E, Duarte-Salazar C, Miranda-Duarte A. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility for primary osteoarthritis of the knee in a Latin American population. *Adv Rheumatol Lond Engl*. 2018;58(1):6.
106. Li HM, Liu Y, Zhang RJ, Ding JY, Shen CL. Vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis: a meta-analysis. *Rheumatology*. 2021;60(2):538–548.
107. Zhu ZH, Jin XZ, Zhang W, Chen M, Ye DQ, Zhai Y, Dong FL, Shen CL, Ding C. Associations between vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis: an updated meta-analysis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2014;53(6):998–1008.
108. Liu H, He H, Li S, Yang L, Wang P, Liu C, Wei X, Wu T, He C. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of osteoarthritis: a meta-analysis. *Exp Biol Med Maywood NJ*. 2014;239(5):559–67.
109. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Vitamin D receptor TaqI, BsmI and ApaI polymorphisms and osteoarthritis susceptibility: a meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2009;76(2):156–61.
110. Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ, Spector TD. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(8):2497–507.

111. Muraki S, Dennison E, Jameson K, Boucher BJ, Akune T, Yoshimura N, Judge A, Arden NK, Javaid K, Cooper C. Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(11):1301–6.
112. Yilmaz AD, Yazicioglu D, Tüzüner Öncül AM, Yilmaz E, Ereş G. Vitamin D receptor gene polymorphisms (Apa1 and Taq1) in temporomandibular joint internal derangement/osteoarthritis in a group of Turkish patients. *Mol Biol Rep*. 2018;45(6):1839–48.
113. Bagheri-Hosseini Z, Imani D, Yousefi H, Abbasifard M. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism and risk of rheumatoid arthritis (RA): systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol* 2020;39(12):3555–3569.
114. Reynard LN, Loughlin J. The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility. *Expert Rev Mol Med*. 2013;15:e2.
115. Xu Y, Barter MJ, Swan DC, Rankin KS, Rowan AD, Santibanez-Koref M, Loughlin J, Young DA. Identification of the pathogenic pathways in osteoarthritic hip cartilage: commonality and discord between hip and knee OA. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012;20(9):1029–38.
116. Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, Brittberg M, Pruss A, Sittlinger M, Ringe J. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010;18(4):581–92.
117. Lastlett LL, Quinn S, Burgess JR, Parameswaran V, Winzenberg TM, Jones G, et al. Moderate vitamin D deficiency is associated with changes in knee and hip pain in older adults: a 5-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 2014;73:697–703.
118. Wu Z, Malihi Z, Stewart AW, Lawes CM, Scragg R. The association between vitamin D concentration and pain: a systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr* 2018;21:2022–37.
119. Shipton EA, Shipton EE. Vitamin D and Pain: Vitamin D and Its Role in the Aetiology and Maintenance of Chronic Pain States and Associated Comorbidities. *Pain Res Treat*. 2015;2015:904967.
120. Cao Y, Winzenberg T, Nguo K, Lin J, Jones G, Ding C. Association between serum levels of 25-hydroxyvitamin D and osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatol Oxf Engl*. 2013;52(7):1323–34
121. Huhtakangas JA, Veijola J, Turunen S, Karjalainen A, Valkealahti M, Nousiainen T, Yli-Luukko S, Vuolteenaho O, Lehenkari P. 1,25(OH)2D3 and calcipotriol, its hypocalcemic analog, exert a long-lasting anti-inflammatory and anti-proliferative effect in synoviocytes cultured from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017; 173:13–22.
122. Many P, Yuktanandana P, Tanavalee A, Anomasiri W, Ngarmukos S, Tanpowpong T, et al. Vitamin D supplementation improves quality of life and physical performance in osteoarthritis patients. *Nutrients* 2017;9:799.

123. Heidari B, Javadian Y, Babaei M, Yousef-Ghahari B. Restorative effect of vitamin D deficiency on knee pain and quadriceps in knee osteoarthritis. *Acta Med Iran* 2015;53:466-70.

BIOGRAFIJA KANDIDATA

Vladimir Vranić je rođen 05.03.1977. u Podujevu, AP Kosovo Srbija. Medicinski fakultet Univerzita u Beogradu završio je 2002. sa prosečnom ocenom 9,22 a 2011. je završio specijalizaciju iz ortopedске hirurgije na Vojnomedicinskoj akademiji, Univerzitet odbrane u Beogradu sa odličnom ocenom.

Član je više strukovnih udruženja. Usavršavao se iz oblasti primarne i revizione artroplastike kolena i kuka na ortopedskoj klinici u Lovranu u Hrvatskoj 2012. godine i u ortopedskoj bolnici Valdotra u Sloveniji 2014. godine.

Autor/koautor je više publikacija u nacionalnim i međunarodnim časopisima, među kojima se ističu:

Vranić V, Zeljić K, Štefik D, Ivković N, Abazović D, Arsenijević N, Vojvodić D, Šupić G. "Vitamin D receptor gene variants contribute to hip and knee osteoarthritis susceptibility." ArchBiolSci[Internet].2021Jul.13;73(2):247-55.
<https://www.serbiosoc.org.rs/arch/index.php/abs/article/view/6442>

Vranić Vladimir, Floranović Potić Milena, Petrović Milan, Starcević Srdjan and Supić Gordana. "Vitamin D and Vitamin D Receptor Gene in Osteoarthritis" Serbian Journal of Experimental and Clinical Research, vol.0, no.0, 2019, pp.-.
<https://doi.org/10.2478/sjecr-2018-0075>

Štefik D, Vranić V, Ivković N, Abazović D, Marić D, Vojvodić D, Supić G. "An insight into osteoarthritis susceptibility: Integration of immunological and genetic background." BosnJofBasicMedSci[Internet].2021Apr.1;21(2):155-62.
<https://www.bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/4735>

Jugoslav Marinković, Aleksandar Radunović, Vladimir Vranić and Munitlak Staša. "MPFL Reconstruction Using Quadriceps Tendon Graft - Our Five Years Experience" International Journal of Orthopedics and Rehabilitation, 2020, 7, 30-36
<http://savvysciencepublisher.com/downloads/ijorv7a4/>

Nosilac je medalje Ujedinjenih nacija za učešće u mirovnoj operaciji u Centralnoafričkoj Republici 2015. godine, kao i medalje Ministarstva odbrane Republike Srbije za naročito isticanje u istoj mirovnoj operaciji.

Od januara 2021. godine imenovan je za asistenta, na predmetu hirurgija, Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Владимир Вранић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Повезаност полиморфизма у гену за рецептор витамина Д са генском предиспозицијом и клиничким параметрима оболелих од остеоартритиса великих зглобова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

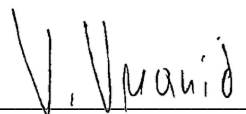
Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 14.03.2022. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Владимир Вранић,



дозвољавам



не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Повезаност полиморфизма у гену за рецептор витамина Д са генском предиспозицијом и клиничким параметрима оболелих од остеоартритиса великих зглобова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође



дозвољавам



не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

