

# Utjecaj polimorfizama u genima za interleukin 6 (IL-6), tumor nekrotizirajući čimbenik alfa 1 (TNF- $\alpha$ 1) i transformirajući čimbenik rasta beta 1 (TGF- $\beta$ 1) na stabilnost endoproteza zgloba kuka

---

**Kolundžić, Robert**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2006**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:512268>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-06**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Robert Kolundžić**

**Utjecaj polimorfizama u genima za  
interleukin 6 (*IL - 6*), tumor nekrotizirajući  
čimbenik alfa 1 (*TNF- $\alpha$ 1*) i  
transformirajući čimbenik rasta beta 1  
(*TGF- $\beta$ 1*) na stabilnost endoproteza zgloba  
kuka**

**DISERTACIJA**



Zagreb, 2006.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Robert Kolundžić**

**Utjecaj polimorfizama u genima za  
interleukin 6 (*IL-6*), tumor nekrotizirajući  
čimbenik alfa 1 (*TNF- $\alpha$ 1*) i  
transformirajući čimbenik rasta beta 1  
(*TGF- $\beta$ 1*) na stabilnost endoproteza zgloba  
kuka**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2006.

Rad je izrađen u Klinici za ortopediju Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za molekularnu patologiju Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Dubravko Orlić

## ZAHVALA

Po završetku rada želim najiskrenije zahvaliti svom mentoru, prof. dr. sc. Dubravku Orliću, koji mi je svojim savjetima i potporom pomogao u izradi ovog rada i uz kojeg stalno produbljujem znanja iz endoprotetike zgloba kuka.

Osobito sam zahvalan prof dr. sc. Krešimiru Paveliću na prepoznavanju ideje i pružanju mogućnosti izvođenja većeg dijela ovog istraživanja u Laboratoriju za molekularnu patologiju Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Dr. sc. Koraljki Gall Trošelj dugujem osobitu zahvalnost na velikoj pomoći, razradi ideje, edukaciji, pružanju korisnih savjeta i, nadasve, na velikom strpljenju tijekom cijelog istraživačkog rada.

Posebnu zahvalnost izražavam doc. dr. sc. Vladimiru Trkulji za pomoć pri statističkoj obradi podataka i drugim prijateljskim savjetima.

Srdačno zahvaljujem laborantskoj tehničarki Ivi Karlović na pomoći tijekom provođenja rada u laboratoriju, kao i ostalom osoblju Laboratorija za molekularnu patologiju Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Srdačno zahvaljujem stručnom kolegiju, kao i brojnom osoblju Klinike za ortopediju Kliničkog bolničkog centra Zagreb na razumijevanju i suradnji tijekom izrade ovog istraživanja.

Na kraju, najtoplije zahvaljujem svojoj obitelji, koja je uvijek, pa i tijekom pisanja ovog rada koji je od mene iziskivao potpunu predanost, bila uz mene.

Robert Kolundžić

Zagreb, 2006.

## SADRŽAJ:

<b>1. POPIS OZNAKA I KRATICA</b>	1
<b>2. UVOD</b>	2
<b>3. ENDOPROTEZA ZGLOBA KUKA</b>	5
<b>3.1. Povijesni pregled</b>	5
<b>3.2. Vrste endoproteza zgloba kuka</b>	10
<b>3.3. Materijali za izradu endoproteze</b>	12
<b>3.4. Indikacije za ugradnju endoproteze zgloba kuka</b>	14
<b>3.5. Komplikacije</b>	15
<b>3.5.1. Aseptička nestabilnost endoproteze zgloba kuka</b>	17
3.5.1.1. <i>Demografski čimbenici</i>	20
3.5.1.2. <i>Biomehanički čimbenici</i>	22
3.5.1.3. <i>Ostali čimbenici</i>	23
<b>4. BOLEST SITNIH STRANIH ČESTICA</b>	24
<b>4.1. Koštano remodeliranje</b>	24
<b>4.2. Upalna reakcija na strane čestice - Bolest sitnih čestica</b> <b>“Particle disease”</b>	29
<b>5. MOLEKULARNA MEDICINA</b>	34
<b>5.1. Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP)</b>	35
<b>5.1.1. Određivanje prisutva polimorfizama</b>	35
3.1.1.1. <i>Lančana reakcija polimeraze (PCR)</i>	36
3.1.1.2. <i>Metoda cijepanje umnoženih odsječaka</i> <i>DNA određenim restriksijskim</i> <i>endonukleazama</i>	38
<b>5.2. Važnost polimorfizma pojedinačnih nukleotida u</b> <b>molekularnoj ortopediji</b>	38
<b>5.3. Interleukin 6 (IL - 6)</b>	39
<b>5.4. Tumor nekrotizirajući čimbenik - alfa (TNF-<math>\alpha</math>1)</b>	40
<b>5.5. Transformirajući čimbenik rasta beta (TGF-<math>\beta</math>1)</b>	41
<b>5.6. Važnost polimorfizma gena IL-6, TGF-<math>\beta</math>1 i TNF-<math>\alpha</math> u</b> <b>kliničkoj praksi – transplantacija i ugradbeni materijali</b>	42

<b>6. HIPOTEZA</b>	45
<b>7. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	47
<b>8. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE</b>	48
<b>8.1. Oblikovanje istraživanja</b>	48
<b>8.2. Mjesto istraživanja</b>	48
<b>8.3. Etički aspekt istraživanja</b>	48
<b>8.4. Ispitanici</b>	49
<b>8.5. Operacijska tehnika i radiološka evaluacija</b>	50
<b>8.6. Definicija ishoda mjerenih u istraživanju</b>	53
<b>8.7. Analiza polimorfizama u genomskoj DNA</b>	54
<b><i>8.7.1. Korištene kemikalije, puferi, enzimi i gelovi za analizu polimorfizama gena</i></b>	55
<b><i>8.7.2 Postupci u analizi polimorfizama u genomskoj DNA</i></b>	59
<b><i>8.7.2.1. Izdvajanje DNA iz stanica pune krvi</i></b>	59
<b><i>8.7.2.2. Lančana reakcija polimerazom</i></b>	60
<b><i>8.7.2.3. Provjera uspješnosti umnažanja lančanom reakcijom polimeraze</i></b>	61
<b><i>8.7.2.4. Analiza polimorfizama u genima IL -6 i TNF-<math>\alpha</math>1 metodom RFLP</i></b>	62
<b><i>8.7.2.5 Analiza polimorfizma u genu TGF-<math>\beta</math>1 metodom PCR</i></b>	64
<b>9. STATISTIČKA ANALIZA</b>	66
<b>10. REZULTATI</b>	73
<b>10.1. “Preživljenje“ totalnih endoproteza kuka do pojave aseptičke nestabilnosti i polimorfizmi analiziranih gena: TGF-<math>\beta</math>1 položaj 29, TNF-<math>\alpha</math>1 položaj -308 te IL-6 na položajima -597 i -572</b>	73
<b><i>10.1.1. Opća svojstva ispitanika i analiziranih endoproteza kuka</i></b>	73

10.1.2.	<i>“Preživljenje“ endoproteza zgloba kuka i genotipovi na analiziranim lokusima – opisni podaci</i>	75
10.1.3.	<i>Procjena združenosti «preživljenja» endoproteze zgloba kuka i genotipova na analiziranim lokusima</i>	80
10.2.	<b>Razvojni poremećaj zgloba kuka i polimorfizmi analiziranih gena: <i>TGF-β1</i> položaj 29, <i>TNF-α1</i> položaj -308 te <i>IL-6</i> na položajima -597 i -572</b>	100
11.	<b>RASPRAVA</b>	110
11.1.	<b>Povezanost polimorfizma istraživanih gena i nastanka aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka</b>	110
11.1.1.	<i>Svojstva provedenog istraživanja koja osiguravaju internu validnost</i>	112
11.1.2.	<i>Nedostaci provedenog istraživanja</i>	113
11.1.3.	<i>Glavni rezultati i njihov značaj</i>	114
11.2.	<b>Povezanost polimorfizma istraživanih gena i nastanka razvojnog poremećaja zgloba kuka</b>	118
11.2.1.	<i>Svojstva provedenog istraživanja i glavni rezultati</i>	119
12.	<b>ZAKLJUČAK</b>	122
13.	<b>SAŽETAK</b>	124
14.	<b>SUMMARY</b>	126
15.	<b>LITERATURA</b>	128
16.	<b>ŽIVOTOPIS</b>	151

## 1. POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>EP</b>	endoproteza zgloba kuka
<b><i>IL-6</i></b>	interleukin 6
<b><i>TNF-<math>\alpha</math>1</i></b>	tumor-nekrotizirajući čimbenik $\alpha$ 1
<b><i>TGF-<math>\beta</math>1</i></b>	transformirajući čimbenik poticanja rasta $\beta$ 1
<b>PCR</b>	lančana reakcija sinteze DNA korištenjem DNA polimeraze (lančana reakcija polimeraze)
<b>RFLP</b>	metoda cijepanje umnoženih odsječaka DNA određenim restrikcijским endonukleazama



## 2. UVOD

Razvoj tehnika ugradnji totalnih endoproteza početkom 70-tih godina 20. stoljeća revolucionarizirao je liječenje degenerativnih promjena zgloba kuka te omogućio uklanjanje boli kao i poboljšanje funkcije zgloba s posljedičnim poboljšanjem kvalitete života oboljelih (1).

Primjena umjetnih zglobova doživjela je golem napredak, pa smo svjedoci nezadrživa razvoja endoprotetske kirurgije gotovo svih zglobova ili većih dijelova koštanoga sustava. Ugradnja raznih endoproteza danas je gotovo rutinski ortopedski operacijski zahvat koji se provodi diljem svijeta.

Uz mnogobrojne, nesumnjivo pozitivne rezultate, jedan dio endoproteza može završiti s određenim komplikacijama.

Najvažnija kasna specifična komplikacija ovog zahvata jest nastanak nestabilne endoproteze, a najčešći oblik je tzv. aseptička nestabilnost. Njezino najvažnije oboljeđe je aseptička upalna reakcija u okolici ugrađenih komponenti te postepena blaga demineralizacija kosti koja dovodi do nestabilnosti endoproteze (2-5).

Uporabom biokemijskih i imunohistokemijskih metoda dokazan je velik broj posrednika u ovom procesu: staničnih (makrofazi, mononuklearni histioci, fibroblasti) i humoralnih. Među potonje, se ubrajaju, na primjer, razni kemokini, interleukini (interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), interferoni, tumor-nekrotizirajući čimbenik  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ 1, od engl. tumor necrosis factor alpha), prostanglandin E2 (PGE2), zatim čimbenici rasta u koje ubrajamo: inzulinu sličan čimbenik rasta tipa 1 (IGF-1, od engl. insulin like growth factor) i transformirajući čimbenik poticanja rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , od engl. transforming growth factor beta) te čimbenik poticanja rasta kolonija monocita (M-CSF, od engl. macrofage colony

stimulating factor) i, nadalje, receptorski aktivator jezgrenog čimbenika kapa-B (RANKL, od engl. receptor activator of NF kappa B ligand ), osteoprotegerin, koštane morfogenezne proteine (BMP, od engl. bone morphogenic protein) i enzime poput laktat-dehidrogenaze, kolagenaze, gelatinaze i metaloproteinaze (6-11). Točna uloga i funkcionalno značenje ovih molekula u nastanku nestabilnosti endoproteza nisu još u potpunosti poznati, no jasno je da se radi o složenoj interakciji staničnih i humoralnih čimbenika koji podržavaju upalu te, izravno ili neizravno, dovode do resorpcije kosti (12). Općeprihvaćeno je stajalište, kako je razvoj aseptičke nestabilnosti postupan proces koji započinje oslobađanjem djelića protetskog materijala uslijed trenja dva dijela endoproteze, ili dijelova endoproteze i kosti. Makrofazi fagocitiraju ove čestice, ali ih ne mogu resorbirati. Stoga dolazi do nespecifične upalne reakcije na strano tijelo. U nekih su bolesnika u proces uključeni i specifični imunološki mehanizmi poput T-limfocitima posredovane preosjetljivosti tipa IV (12). Uzaludno nastojanje makrofaga da “svladaju” fagocitirane čestice vremenom postaje štetno, zato što izlučuju medijatore upale koji pokreću daljnju reakciju koja, u konačnici, rezultira neravnotežom osteoblastičke i osteoklastičke aktivnosti, odnosno osteolizom kosti. Zahvaljujući ključnoj ulozi čestica endoprotetskog materijala u poticanju procesa aseptičke upale te združenosti količine oslobođenog materijala i intenziteta procesa, ova se bolest naziva i “bolest sitnih čestica” (12).

Uznapredovalost osteolize ili količina oslobođenih čestica dvije su osobitosti, pri čijem je tumačenju potreban oprez (12,13). Osteoliza, nerijetko i opsežna, kao i količina oslobođenih čestica, vidljiva je i kod klinički stabilnih endoproteza. Stoga se nameće pitanje koji čimbenici određuju poticanje upalnog procesa, neovisno o količini oslobođenih čestica.

U tom su smislu, počevši od sredine 70-tih godina prošlog stoljeća, ispitivani razni čimbenici, a posebnu su pozornost privukli endoprotetski materijali i tipovi endoproteza. Već je dugo vremena poznato da je polietilen nepodesan materijal za izradu implantata, zato što oslobađa velik broj čestica. Stoga se danas koriste različiti materijali te velik broj modela endoproteza, za koje često nema dovoljno podataka koji bi eventualno ukazivali na razlike u učestalosti nastanka aseptičke nestabilnosti (14). Danas se, ipak, zna da je rizik pojave aseptičke nestabilnosti u svih oblika bescementnih endoproteza obloženih hidroksiapatitom manji u odnosu na cementne endoproteza (bilo femoralnih, bilo acetabularnih dijelova), a najviši je rizik u hidroksiapatitom neobloženih bescementnih endoproteza (15). Unatoč razlikama u učestalosti, aseptička nestabilnost javlja se uz svaki tip materijala ili endoproteze, pri čemu posreduju isti mehanizmi/medijatori (3).

Općeprihvaćen je stav, kako individualna sklonost bolesnika, neovisna o spomenutim čimbenicima, značajno doprinosi (ne)nastanku spomenute komplikacije. Analogno drugim multifaktorijskim bolestima/poremećajima, individualna sklonost oboljevanju povezuje se s genetskim ustrojem jedinke. Za razliku od mnogih drugih bolesti i stanja, istraživanja genetske varijabilnosti kao uzrok nastanka aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka u samom su začetku.

Nedvojbeno, postoji čitav niz "gena kandidata" koje bi u tom smislu valjalo istražiti – npr., gene koji kodiraju medijatore za koje se zna ili pretpostavlja da sudjeluju u razvoju ovog stanja, gene za njihove receptore, gene koji kodiraju proteine uključene u metabolizam kosti, a nisu izravno uključeni u nastanak ovog stanja i mnoga druga.

### **3. ENDOPROTEZA ZGLOBA KUKA**

#### **3.1. Povijesni pregled**

Nastojanja uspostavljanja gibljivosti zgloba kirurškim putem potječu još iz 19. stoljeća. Već su Barton (1826.) i Rodgers (1830.) pokušali intertrohanternom osteotomijom ostvariti pseudartrozu i određenu pokretljivost kod ankiloze kuka, ali s prolaznim rezultatom (1). Metode kirurškog preoblikovanja osteotomijom ili resekcijom kosti sa stvaranjem pseudartroze i novog zgloba dugo su bile jedine i nepovoljne metode kirurškog uspostavljanja funkcije zgloba. Početkom 20. stoljeća, češće su se počeli koristiti interpozitumi (fascija, mast, mišić, koža) kako bi se spriječilo zarašćivanje reseciranog ili rekonstruiranog dijela zgloba (1).

Prvu opću interpozicijsku artroplastiku vjerojatno izvršio Rehn u Freiburgu, Njemačka, početkom 30-tih godina prošloga stoljeća (16). Niti ova metoda se nije pokazala uspješnom, osobito kada je bila primjenjena na velike zglobove noge. Kasnije su se počeli primjenjivati interpozitumi s različitim anorganskim tvarima (srebro, zlato, gutaperka, celuloid, najlon i dr.), također s lošim ishodom. Tek je Smith-Petersen (godine 1933.), primjenom svoje "cup-plastike" kao oblikovanog interpozituma metala, između čašice i glave bedrene kosti, postigao bolje i trajnije rezultate (1).

Prvu totalnu artroplastiku kuka izvršio je Wiles u Londonu godine 1938. Implantat se sastojao od dvije čelične komponente (17).

Prije nego što se spoznalo da samo totalna endoproteza kuka, koja se sastoji i od acetabularnog i od bedrenog dijela, može osigurati dugotrajan uspjeh u liječenju osteoartroze kuka, čitavo desetljeće i pol provodila se je ranije gotovo isključivo hemiartroplastika. Sve su endoproteze u tim postupcima implantirane bez cementa.

Imale su na truplu udubljenja i/ili otvore koji su pojačavali fiksaciju urastanjem kosti u endoprotezu (18,19,20).

McKee, te McKee i Watson-Farrar pokušali su razviti totalnu endoprotezu kuka koja se sastojala od dva metalna dijela. Prvi model izrađen je 1940. godine, ali nikada nije upotrebljen u kliničkoj praksi. Drugi model, iz 1951. godine, sastojao se od metalne acetabularne komponente učvršćene u zdjelici i metalne glave pričvršćene zavrtnjem u vrat bedrene kosti. McKee-jev treći model sastojao se od metalne čašice, također pričvršćene u zdjelicu, ali je glava bedrene kosti zamijenjena Thompsonovom endoprotezom, učvršćenom u medularni kanal. Rezultati tih postupaka bili su slabiji od očekivanih sve dok početkom 60-tih Charnley nije uveo koštani cement u ortopedsku kirurgiju (21). McKee je 70-tih napisao: “1960. godine metilmetakrilat se počeo upotrebljavati kao koštani cement i odmah je poboljšao postotak uspjeha, koji je sada veći od 90%. Uspjeh se pripisuje činjenici da se kod koštanog cementa povećava površina opterećenja, a kod uporabe navoja ona se koncentrira u jednoj točki.” McKee je vjerojatno želio istaknuti ključ problema endoprotetičke fiksacije: to je jednakomjerna raspodjela sila između kontaktnih površina endoproteze i kosti.

Ranih 60-tih, Sivash iz SSSR-a je razvio posebne bescementne endoproteze, često primjenjivane u istočnoeuropskim državama, no većina ih je kasnije zamijenjena zbog velikog broja nestabilnosti i drugih neuspjeha (22). Ring je, 1964. godine, uveo totalnu bescementnu endoprotezu kuka koristeći metal-metal endoproteze s acetabularnom fiksacijom, tj. zavrtnjem dugog nastavka u kost. Nakon 1979. godine, više je upotrebljavao i proučavao bescementnu metal-polietilen endoprotezu (23). Sir John Charnley prvi je u endoprotetiku zgloba kuka uključiti obnavljanje površine glave i acetabuluma s teflonskim pokrovom. Zamisao je propala na samom početku zbog

razvoja aseptičke nestabilnosti bedrenog dijela i reakcije na strano tijelo pri primjeni teflonskog materijala kao u acetabularnoj komponenti (24).

Smanjenjem veličine glave endoproteze i uvođenjem acetabularne komponente od polietilena velike gustoće, 1962. godine, nastao je implantat koji je stvorio temelje kasnijih modernih dizajna endoproteza.

Godine 1967. Müller je razvio zakrivljeni bedreni dio endoproteze koja je mogla biti implantirana korištenjem modifikacije Watson-Jonesova anterolateralnog pristupa. Charnleyev bedreni nastavak bio je ravan u svoje distalne dvije trećine. Promjer glave bedrenog dijela Müllerove endoproteze bio je 32 mm, a glava Charnleyeve endoproteze u promjeru je iznosila 22 mm (24).

Prvi pokušaji zamjene kuka, izvođeni između 1965. i 1975. godine, imali su kratkotrajne dobre rezultate. Ipak, nisu u potpunosti prihvaćeni, jer je u tom desetogodišnjem razdoblju bilo i 10-30% neuspjelih zahvata. Međutim, u drugome razdoblju - od kasnih 70-tih i 80-tih - rezultati su bili puno bolji, ponajviše zbog boljeg endoprotetičkog dizajna, tehnike cementiranja i same kirurške tehnike (25,26).

Usporedno s rješavanjem problema oblikovanja i materijala endoproteza te njihove primjene, liječnici su sve više počeli proučavati veliki problem koji se odnosi na aseptički gubitak kosti nakon ugradnje endoproteze.

Periprostetsku osteolizu nastalu oko loše cementiranog bedrenog dijela prvi je 1975. godine opisao Charnley. Povezao je cistične erozije kosti s reakcijom makrofaga oko bedrenog dijela endoproteze. Harris je, 1976. godine, (27) izvijestio o četiri opsežne resorpcije bedrene kosti, nakon ugradnje endoproteze. Zamijetio je kako opseg resorpcije upućuje na prisutnost infekcije ili tumora. Godine 1977., Willert i Semlitsch (28) izvjestili su da metalnim djelićima različitih neuspjelih kobalt-kromij zglobnih

endoproteza primarno pohranjenih unutar makrofaga u zglobnoj kapsuli, što je povezano i s povećanom fibrozacijom tkiva. Ta su istraživanja postavila hipotezu o određenoj ravnotežnoj situaciji. Naime, ravnoteža postoji kada se mali komadići debrisa metala, nastali zbog trenja dijelova endoproteza, transpotiraju putem limfatičkog sustava ili se pohranjuju u intracelularnu kapsulu makrofaga. U slučaju opsežnog trošenja endoproteze i prekomjernog oslobađanja čestica, ravnoteža se poremeti što rezultira lokalnim zadržavanjem tih stranih čestica i stvaranju granuloma oko endoproteze (29,30).

Goldring i suradnici su, 1983. godine (31,32), opisali sinovijsko membranozno okruženje oko olabavljene cementiranog bedrenog dijela totalne endoproteze. Postojanje ove membrane pokazalo je da postoji mogućnost oslobađanja medijatora koji djeluju na resorpciju kosti, i smatra se da ima ključnu ulogu u nastanku žarišne osteolize. Kasniji izvještaji o osteolizi, povezanoj sa stabilno cementiranim bedrenim nastavkom, ukazali su na činjenicu da samo olabavljenje nije nužno za razvoj osteolize. Jasty i ostali (33) opisali su četiri slučaja osteolize u kojima je bila dokazana povezanost sa stabilnim cementiranim bedrenim dijelovima. U osteolitičkom tkivu su se nalazile nakupine makrofaga i divovskih stanica koje su erodirali femoralni korteks. Ostaci debrisa polimetilmetakrilata (PMMA) bili su prisutni, ali polietilenski debris nije pronađen. Maloney i suradnici (34) su analizirali 25 bolesnika s uznapredovalom osteolizom kostiju. Histološka je analiza pokazala nakupine makrofaga i divovskim stanica, koje su sličile stanicama koje su postojale kada je postajala nestabilnost cementiranih bedrenih dijelova. Uporabom posebne tehnike mikroskopiranja serijskih rezova i biomehaničkim ispitivanjem na preparatima dobivenim post-mortum, autori su potvrdili prisutnost lokalne frakture cementa koja je bila povezana s žarišnom osteolitičkom lezijom,

pronađenom u stabilnih implantanata (35). Ovi su nalazi ukazali na ulogu loma ili defekta u cementnom sloju u patogenezi lokalnih osteoliza. Koncept tzv. “cementne bolesti“ potaknut je, zapravo, otkrićem djelića PMMA u uzorcima kosti zahvaćenih osteolitičkim procesom, oko stabilne i labave endoproteze te u područjima resorpcije (36). Neuspjesi prvih “pres feet” endoproteza, kao i endoproteza korištenih bez koštanog cementa rijetko su bili povezani s nastankom osteolize. Histološki nalaz, uz “pres feet” bedreni nastavak nije pokazivao PMMA djeliće, što upućuje na hipocelularnu, a ne na upalnu pseudmembranu. Na prijelazu između kosti i vezivnog tkiva pokazana je organizacija kolagena i osifikacija vezivnog tkiva. S druge strane, tkivo u kojem se dašavala aktivna resorpcija kosti, koje je sadržavalo strane čestice - PMMA, imalo je i histiocyte okružene divovskim stanicama.

Mallony i ostali (37) pratili su 16 pacijenata s žarišnim endoostealnom osteolitičkom destrukcijom kosti tijekom tri i više godina nakon ugradnje bescementnih totalnih endoproteza. U 14 su bolesnika postignuti izvrsni klinički rezultati, bez dokaza o labavljenju. Njihova je studija dokazala da strane čestice PMMA, UHMWPE (ultra-high-molecular-weight polyethylene) i metala mogu potaknuti progresivnu resorpciju kosti s posljedičnim labavljenjem. Stoga je prvotni naziv “cementna bolest” zamijenjen mnogo preciznijim nazivom “bolest čestica” ili “particular disease”. Iako je većina radova o osteolizi bila skoncentrirana na bedreni dio endoproteze, osteoliza se pojavljuje i oko acetabularnog dijela endoproteze, što je povezano s loše cementiranom acetabularnom dijelom. Lezije se mogu prikazati na zglobnom rubu acetabularnog dijela endoproteze ili centralno.

Prevalencija osteoliza povezanih s bescementnim acetabularnim dijelom endoproteza različita je i ovisi o tipu ugrađenih komponenti i vremenu proeklom od



ugradnje. Xenos i suradnici (38) su, prateći stotinu bescementnih PCA komponenti tijekom najmanje sedam godina (7-9 godina) opisali 12% incidenciju osteolize i 4% incidencu osteolize acetabularnog dijela endoproteze. Endoproteze su bile napravljene od kobalta i kroma. Beauchensne i suradnici (39) pratili su anatomsku medularnu ukotvljenu AML endoprotezu tijekom šest ili više godina (u prosjeku 7 i pol godina) i otkrili osteolizu bedrene kosti u 23% pacijenata i osteolizu acetabularnog dijela endoproteze u 15% pacijenata.

Zanimanje znanstvenika za problematiku aseptičke nestabilnosti endoproteza, odnosno za bolest sitnih čestica, vrlo je velika.

## **2.2. Vrste endoproteza zgloba kuka**

Endoproteze zgloba kuka razvrstane su prema različitim kriterijima (40).

### ***3.2.1 S obzirom na broj dijelova endoproteze***

Endoproteze zgloba kuka mogu biti:

Djelomične ili parcijalne endoproteze kuka

Potpune ili totalne endoproteze kuka

Djelomična endoproteza kuka, kao što sam naziv govori, nadomješta samo jedan konveksni dio zgloba kuka. U povijesti se djelomična endoproteza kuka upotrebljavala kao “cup-plastica” koja je prekrivala glavu bedrene kosti, odnosno zamjenjivala zglobnu površinu glave bedrene kosti. S vremenom, su se razvili noviji modeli. Poboljšanje je, u tehničkom smislu, postignuto uvođenjem parcijalne bedrene endoproteze s bedrenim nastavkom koji proksimalno simulira vrat i glavu bedrene kosti. Glave endoproteze mogu se mijenjati s obzirom na razne promjere acetabuluma.

Totalna endoproteza kuka jest endoproteza koja zamjenjuje oba zglobna tijela kuka: bedreni i acetabularni dio.

### **3.2.2. Prema načinu fiksacije**

Endoproteze zgloba kuka mogu biti:

- a) Bescementne endoproteze
- b) Cementne endoproteze
- c) Hibridne endoproteze.

Važna razlika između cementnih i bescementnih endoproteza jest u njihovim površinama i u njihovu obliku. Cementne endoproteze imaju potpuno glatke plohe, dok bescementne moraju biti hrapave, s mikro i makro porama na površini u koje kasnije urasta kost. Kod cementnih se endoproteza upotrebljava koštani cement (metilmetakrilat) čija je primarna zadaća povećanje dodirne površine između endoproteze i ležišta u kosti za približno 200 puta. Na ovaj se način smanjuje opterećenje po jedinici dodirne površine. Kod bescementnih je endoproteza vrlo je važna dobra primarna fiksacija endoproteze u ležištu kosti, nakon čega vremenom slijedi urastanje kosti u mikro i makro pore, što se naziva sekundarna fiksacija endoproteze. Težnja je izvršiti cijeli zahvat fiksacije uz što manji proces oštećenja okolnog tkiva, što se postiže boljim oblikovanjem i poboljšanjem mehaničkih osobina endoproteze (41).

Hibridne su endoproteze kombinacija prethodne dvije: dio endoproteze je bez cementa (najčešće acetabularni dio), dok se za drugi dio koristi koštani cement (češće bedreni dio) (42).

### **3.2.3. Prema indikacijama za ugradnju**

1. Totalne endoproteze možemo podijeliti na:
2. Standardne ili primarne endoproteze

3. Revizione ili sekundarne endoproteze
4. Specijalne endoproteze - tumorske

Standardne endoproteze su cementne i bescementne endoproteze, koje se upotrebljavaju u liječenju primarnih i sekundarnih degenerativnih promjena zgloba kuka, zatim u liječenju tumora u gornjem okrajku bedrene kosti i kod zbrinjavanja prijeloma u području glave bedrene kosti. Standardne endoproteze su danas modularne, tj. može se najveći broj bolesnika uspješno riješiti s kombinacijom raznih veličina.

Revizione endoproteze se najčešće upotrebljavju u rješavanja kasnih komplikacija, npr. nestabilnih standardnih endoproteza, a češće je danas riječ o bedrenim dijelovima endoproteze.

Specijalne endoproteze posebno su oblikovane, vrlo duge, modularne endoproteze koje se koriste u rekonstruktivnoj kirurgiji kod liječenja tumora kosti odnosno u rješavanju opsežnih oštećenja gornjeg okrajka bedrene kosti, a mogu biti i rastuće endoproteze koje prate rast djece.

### **3.3. Materijali za izradu endoproteze**

Nastojanja ortopeda, imunologa, inženjera, tehničara i mnogih drugih u teorijskim i eksperimentalnim istraživanjima, dovela su do nastanka kvalitetnih endoproteza, načinjenih od dobrih materijala. Materijali za izradu endoproteza moraju posjedovati određenu čvrstoću (lom, zamor materijala itd.), postojanost na oštećenja (trošenje zglobnih površina i koroziju), dobru biološku podnošljivost (reakcija na strano tijelo – toksičnost te kemijske, kancerogene i imunološke reakcije). Također je važna reakcija na sterilizaciju prilikom koje ne smiju biti narušene osobine endoproteze. I na kraju, one moraju biti dostupne i povoljne po cijeni.

Reakcija organizma na implantat vrlo je složena. Ovisi o veličini i obliku implantata, njegovoj stabilnosti, eventualnoj razgradnji. U fiziološkim se uvjetima uvijek stvara tanak sloj vezivnoga tkiva, između implantata i kosti. Niti jedna vrsta aloplastičnog materijala nije idealan. U posljednje se vrijeme upotrebljavaju različiti materijali, metali i slitine koje organizam dobro podnosi. To su kemijski otporni nehrđajući čelik, titan-krom, kobalt, molibden, nikal i drugi.

Prve totalne endoproteze kuka bile su izrađene samo od metala (McKee, Ring, Sivaš i dr.) ili su se kombinirale s plastičnim masama (Charnley, Müller-Charnley, Bucholz, Weber i dr.). Potpuno metalne endoproteze malo se troše, ali imaju veći postotak olabavljenja. Endoproteze izrađene od kombinacije metala i plastike se, s druge strane, više troše.

Plastične mase, kao biostabilni materijali, imaju posebno mjesto u izradi dijelova endoproteze zglobova. Uveo ih je Charnley, na načelu svoje tzv. "low friction" endoproteze (43). Pojedine njihove kvalitete, u pogledu modula elastičnosti, plastičnosti i loma, a s tim u vezi i apsorpcije energije i prijeloma zbog zamora te dezintegracije u upotrebi, vrlo su pogodne za primjenu u organizmu. Vrlo dobro odgovaraju i na intermitentno opterećenje i trenje uz razmjerno malo trošenje. Posebno su pogodne za obradu pa su se zbog svojih mehaničkih i bioloških reakcija danas afirmirali kao rješenje acetabularnog dijela endoproteze, naravno uz primjenu koštanog cementa. Uz dobru podnošljivosti, plastične su mase pokazale dobru elastičnost u odnosu na koštano tkivo. Posebno mjesto u izradi acetabularnog dijela endoproteze zglobova imali su biostabilni polimeri (Endlerov acetabularni dio) (44).

Neko su se vrijeme, za izradu dijelova endoproteza, upotrebljavali keramika i aluminij. Povoljne značajke keramike su vrlo dobra podnošljivost od strane organizma i

mali koeficijent trenja. Međutim, ipak je prečvrsta i češće podložna pucanju (lomovima) .

### **3.4. Indikacije za ugradnju endoproteze zgloba kuka**

Najvažnije indikacije za potpunu zamjenu zgloba prikazane su u tablici 1.

**Tablica 1.** Indikacije za ugradnju endoproteze kuka.

primarne koksartroze	idiopatske
	reumatoidno upalni procesi
	avaskularna nekroza
	razvojni poremećaji kuka
sekundarne koksartroze	posljedica prijeloma
	metabolički poremećaji
	neuropatski poremećaji
	endokrini poremećaji
	hemofilija
prijelomi i posljedica loše liječenih prijeloma	
posljedica neprikladno obavljenih operativnih zahvata	
neoplastični procesi	

Najvažnija indikacija za potpunu zamjenu zgloba kuka je degenerativno oštećen zglob i to idiopatske etiologije. Nadalje, potpuna zamjena zgloba s endoprotezom u

suvremenoj ortopediji sve se češće primjenjuje kod prijeloma, posljedica prijeloma kuka i posljedica neuspjelog liječenja prijeloma. Tu spadaju: svi prijelomi u području glave i vrata bedrene kosti, gdje djeluju nepovoljni biomehanički uvjeti, tj. smične sile koje neizbježno dovode do neuspjeha osteosinteze, prijelomi glave bedrene kosti te prijelomi u području acetabuluma. S endoprotezom zgloba kuka danas se uspješno liječe sve sekundarne degenerativne promjene zgloba kuka, kao što je kod razvojnih anomalija zgloba kuka (displazija acetabuluma, subluksacija ili luksacija kuka), avaskuarnih nekroza glave bedrene kosti, reumatskih upala s ograničenom gibljivošću zgloba, određenih smetnji rasta, te sistemskih bolesti. Zatim se upotrebljava endoproteza za rekonstrukciju gornjeg okrajka bedrene kosti nakon resekcije tumora u bloku. Također se primjenjuje endoproteze kod izraženog ili prijetućeg patološkog prijeloma gornjeg okrajka bedrene kosti (45).

Indikacije za primjenu endoproteza ovise o mnoštvu čimbenika, kao npr. o patološkim promjenama u zglobu, odnosu morfoloških promjena i funkcionalnih tegoba te o funkcionalnom stanju ostalih zglobova. Posebno su važne bolesnikove subjektivne tegobe i njegova dob.

### **3.5. Komplikacije**

Ugradnja totalnih endoproteza zgloba kuka rutinski je zahvat, a broj bolesnika kojima je ugrađena endoproteza zgloba kuka neprekidno raste. Implantacija endoproteza zgloba kuka postalo je zahvat koji primjenjuju mnogi ortopedi. Na ovaj operativni zahvat, kao i svaki drugi, nosi određene rizike i komplikacije koje prema lokalizaciji možemo podijeliti - na sistemske i lokalne, a prema vremenskom pojavljivanju - na intraoperacijske (tablica 2) i postoperacijske (46).

**Tablica 2.** Najčešće komplikacije tijekom artroplastike zgloba kuka.

anesteziološke i metaboličke
neurovaskularne
prijelom bedrene kosti
prijelom zdjelice
štetno djelovanje koštanog cementa na krvni tlak
prekomjerno krvarenje tijekom zahvata

Nakon što se endoproteza zgloba kuka ugradi i neposredno postoperativno razdoblje prođe bez komplikacija, a bolesnik se počinje služiti ugrađenom endoprotezom. No, niti tada ne prestaju opasnosti od komplikacija, a najčešće su koje su posljedica više elemenata:

1. komplikacije koje nastaju uslijed tehnički ne idealnih odnosa endoproteze;
2. komplikacije koje nastaju kao poradi istrošenosti dijela kosti ili endoproteze te time uvjetovanih bioloških promjena uslijed reakcije organizma na strane sitne čestice;
3. komplikacije kao posljedice povrede, a u vezi s istrošenošću ili slabljenjem pojedinih dijelova endoproteze ili kosti, a u vezi s endoprotezom.

U odnosu na vrijeme pojavljivanja, postoperacijske komplikacije možemo podijeliti u rane i kasne. U rane ubrajamo one koje nastaju unutar 3 mjeseca od operativnog zahvata, i najčešće su: tromboza, alergične reakcije, hematomi, površinska infekcija, luksacija endoproteze, komplikacije osteotomije veliko trohantera i periartikularne kalcifikacije. Kasne komplikacije nastaju nakon više od 3 mjeseca od

operativnog zahvata. U kasne infekcije spadaju: duboka infekcija, prijelom bedrene kosti s ugrađenom endoprotezom zgloba kuka, prijelom endoproteze, aseptička nestabilnost endoproteze zgloba kuka - "Bolest sitnih čestica" ili "Particle disease" te sistemske i različite dugotrajne komplikacije.

### ***3.5.1. Aseptička nestabilnost endoproteze zgloba kuka***

Mnoge legure, plastični materijali, a u posljednje vrijeme i keramika koja se primjenjuju u konstrukciji endoproteza kuka, danas, ali teorijski jamče gotovo neograničenu trajnost endoproteze, odnosno njezin minimalni koeficijent trošenja. Međutim, činjenica je kako u kliničkoj praksi trajnost ugrađene endoproteze dobiva posve drugačiju dimenziju. Rasklimavanje, olabavljenje i pomak endoproteze u kasnijem su postoperativnom razdoblju upravo onaj problem koji je potencijalno uvijek prisutan i koji, bez obzira na prisustvo ili odsustvo infekcije, ugrožava njezinu stabilnost, a time i osnovnu svrhu njezine ugradnje, a to je uspostavljanje pokretljivosti i otklanjanja boli (47).

Pomak endoproteze kuka ima posebne značajke s obzirom na zakone biomehanike, morfološke osobine endoproteze i zgloba te prijenos sila opterećenja preko ugrađene endoproteze na ležište u kosti.

U dijagnostici olabavljenja i pomaka endoproteze važno je obratiti pozornost na bolesnikovo subjektivno stanje – bol u preponi, otežan hod, bol u natkoljenici, te osjećaj nesigurnosti prilikom opterećenja. Važan klinički nalaz koji ukazuje na smanjenu pokretljivost zgloba su: atrofija miškulature i otežan hod. Dodatne dijagnostike postupci uključuju standardnu radiološku dijagnostiku i scintigrafiju. Radiološki nalazi pokazuju da kod bedrenog dijela endoproteze, čije je olabavljenja ipak učestalije od acetabularnog, primarno dolazi do resorpcije kosti, s posljedičnim popuštanjem uporišta



endoproteze, upravo na medijalnom dijelu reseciranog vrata bedrene kosti. Radiološki se analizira posebno bedreni dio endoproteze, a posebno acetabularni dio. Na bedrenom se dijelu endoproteze pozornost treba obratiti na promjene u području bedrenog kalkara, položaj trupa endoproteze u kanalu (pomak distalnog dijela), promjene spužvastog dijela bedrene kosti, promjene na cementu i odnos implantat - cement - kost (radiolucetna zona). Pri analizi acetabularnog dijela endoproteze, prati se promjena položaja čašice - kut nagiba, promjene na koštanom dijelu (atrofija - sklerozacija), promjene na čašici (trošenje - lomovi) i odnos - cement - kost (radiolucetna zona).

Najvažniji element koji upućuje na olabavljenje endoproteze jest povećanje širine radiolucetne linije te njezino proširenje uz bedreni ili acetabularni dio endoproteze. S obzirom na rezultate ili pretraga radiološki napravljene su klasifikacije koje imaju veliku ulogu u otkrivanju nestabilnosti endoproteze (Kruglugerova klasifikacija) (48) te u odabiru načina operativnog liječenja, odnosno rekonstruktivnih zahvata. Dok, dvije najčešće korištene klasifikacije koštanih defekta su: klasifikacija Američke akademije ortopeda i Paproskyjeva klasifikacija (49,50).

Inače, aseptički gubitak kosti dugotrajna je komplikacija nakon ugradnje endoproteze, i pojavljuje se u prisutnosti sitnih čestica svih materijala i endoprotetskih sistema koji su ikada primjenjivani (51-54). Gubitak kosti nakon ugradnje endoproteze može biti ozbiljan problem u revizijskoj operaciji te može ograničiti opseg rekonstruktivnog zahvata. Gubitak kosti otežava značajno reoperaciju i može “zahtijevati“ autologni ili homologni koštani presadak.

Postoje tri čimbenika koji negativno utječu na održavanje koštane mase nakon ugradnje endoproteze:

1. sekundarni gubitak kosti zbog debris stranih čestica;

2. adaptivno koštano remodeliranje i sekundarni “stres shelding” zbog osobina materijala i površinskih svojstava endoproteza;
3. gubitak kosti kao posljedica prirodnog starenja.

Sekundarni gubitak kosti zbog debrisa sitnih čestica nastaje zbog prisustva sitnih čestica koje se oslobađaju trošenjem, korozijom te oslobađanjem s površine materijala. Štetni učinci djelića materijala mogu biti različiti. Danas su poznati metabolički, bakteriološki, imunološki i karcinogeni učinci o kojima, za sada, znamo relativno malo. Jedan od uzroka nastanka ovih komplikacija je materijal koji se koristi za izgradnju dijelova endoproteze. Svakako je potrebno istaknuti visokomolekularni polietilen, koji služi za izradu cijelog acetabularnog dijela cementnih endoproteza, ili umetka kod bescementnih acetabularnih dijelova. Dugo je postojala dvojba može li se pojava agresivne osteolize oko dijelova endoproteze objasniti djelovanjem metala, koštanog cementa – metilmetakrilat, odnosno visokomolekularnog polietilena, ili je svaki od tih sastojaka pojedinačno odgovoran za nastanak komplikacije.

Trenjem metalne glave endoproteze i polietilenskog acetabuluma oslobađaju se velike količine stranih čestica, što pospješuje razvoj bolesti stranih čestica ili, ako se oslobađa samo polietilenska čestica, polietilenske bolesti (55,56). Bolest stranih čestica nastaje zbog upale, kao odgovora organizma na strane čestice (metal, koštani cement, polietilen) koje nastaju abrazijom ili trenjem dva dijela endoproteze. Strane čestice moraju biti izrazito male (do 10 $\mu$ m) kako bi ih mononuklearni histioci, multinuklearne gigantske stanice mogle fagocitirati. Tijekom upalne reakcije strane čestice stimuliraju stvaranje medijatora koštane resorpcije (IL - 1, IL - 6, IL - 8, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE2), što za posljedicu ima aseptičku nestabilnost endoproteze.

Međutim, aseptička nestabilnost javlja se uz svaki tip materijala ili endoproteze, a u tome posreduju isti mehanizmi/medijatori (3). Velik broj endoproteza napravljenih od različitih materijala i različitih konstrukcija, za koje često nema dovoljno sigurnih relevantnih podataka za pouzdanu procjenu eventualne razlike u učestalosti, razvijaju aseptičku nestabilnost (14). Jasno je da je rizik pojave aseptičke nestabilnosti kod svih oblika bescementnih endoproteza obloženih s hidroksiapatitom manji nego kod cementnih endoproteza (bilo femoralnih, bilo acetabularnih dijelova). Rizik za nastanak kod hidroksiapatitom neobloženih bescementnih endoproteza (15).

Nadalje, čimbenici s mogućim utjecajem na nastanak aseptičke nestabilnosti mogu se podijeliti na demografske, biomehaničke i ostali.

#### *3.5.1.1. Demografski čimbenici*

Dob. Analize velikih serija (poput onih temeljenih na norveškom ili švedskom registru), endoproteza kuka, s više tisuća ili više desetina tisuća endoproteza (45, 57,58) ukazuju da je rizik nastanka aseptičke nestabilnosti veći, odnosno da je vrijeme preživljenja endoproteze (aseptička nestabilnost kao ishod) kraće, u ljudi kojima se endoproteza ugrađuje u mlađoj životnoj dobi. Pritom rezultat ne ovisi o bolesti koja je uzrokovala potrebu za ugradnjom endoproteze, o vrsti endoproteze i materijala, spolu i drugim čimbenicima. Ishod je lošiji za bolesnike koji su u vrijeme ugradnje endoproteze mlađi od 55 godina, u odnosu na one u dobi višoj od 55 godina (57, 58). Također, je lošiji za osobe mlađe od 46 godina u odnosu na bolesnike u dobi 46-55 godina (57,58). Lošiji ishodi u mlađih bolesnika mogli bi biti posljedica veće fizičke aktivnosti, i posljedično, većeg opterećenja endoproteze u mlađoj životnoj dobi (15).

Spol. U presječnoj studiji, Wilkinson i suradnici (57) su analizirali 217 bolesnika u kojih je nastala aseptička nestabilnost endoproteze i 267 bolesnika sa stabilnim

endoprotezama. U studiji nije analizirano vrijeme preživljenja endoproteze: od ugradnje do pojave aseptičke nestabilnosti, već združenost pojave aseptičke nestabilnosti s pojedinim čimbenicima. U logističkoj binarnoj regresijskoj analizi (aseptička nestabilnost da/ne), uz korekciju za utjecaj dobi, endoproteze, vremena proteklog od ugradnje endoproteze i razloga za ugradnju endoproteze, mogućnost nastanka aseptičke nestabilnosti bila je nešto veća, iako ne statistički značajno, u muškaraca (omjer mogućnosti 1,4; 95% granice pouzdanosti 1,0 do 2,0;  $p=0,09$ ). S druge strane, ciljano istraživanje “preživljenja” endoproteze (do pojave aseptičke nestabilnosti) na 4600 endoproteza u bolesnika kod kojih su endoproteze ugrađene zbog primarne osteoartroze i u dobi mlađoj od 55 godina, a koje je temeljeno na podacima iz finskog registra (15), pokazalo je da je rizik pojave aseptičke nestabilnosti veći uz graničnu značajnost (relativni rizik 1,2; 95% granice pouzdanosti 1,0-1,4;  $p=0,05$ ), odnosno preživljenje endoproteze kraće je kod žena, neovisno o tipu endoproteze ili drugim čimbenicima. Shodno tome, zasad nema jednoznačnih podataka o spolu kao predviđajućem čimbeniku za nastanak aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka. Nastaje i u muškaraca i u žena pa razlike u odnosu na spol, ako i postoje, nisu posebno izražene.

*Indeks tjelesne mase.* Pretjerana tjelesna masa (indeks tjelesne mase  $>25$ , a posebno  $>30$ ) jest klasičan čimbenik koji doprinosi (pre)opeterećenju koštano-mišićnog sustava pa tako i endoproteze kuka. Međutim, istraživanje utjecaja visokog indeksa tjelesne mase na pojavu aseptičke nestabilnosti združeno je s određenim problemima. Naime, s obzirom na to da se radi o istraživanjima “vremena proteklog do događaja”, u kojim se bolesnici prate tijekom duljeg vremenskog razdoblja (npr. 10-tak i više godina), utjecaj pojedinih potencijalnih čimbenika na preživljavanje endoproteze analizira se uz pretpostavku “stalnog rizika” (“constant hazard assumption”). Pretpostavka je da je rizik

stalan tijekom vremena (npr., dob u vrijeme operacije, vrsta endoproteze, spol, bolest koja je dovela do potrebe za endoprotezom itd.). Indeks tjelesne mase može se tijekom vremena znatno mijenjati. Među literaturnim podacima nema praktično niti jedne studije u kojoj je indeks tjelesne mase uključen u analizu pojavnosti aseptičke nestabilnosti kao varijabla ovisna o vremenu. Stoga je teško realno procijeniti utjecaj ovog čimbenika na pojavu aseptičke nestabilnosti. U jednoj studiji kraćeg trajanja, indeks tjelesne mase  $>30$  vrijeme ugradnje endoproteze, identificiran je kao negativan čimbenik za preživljenje endoproteze (59). Svakako treba naglasiti da se aseptička nestabilnost javlja i u bolesnika s trajno fiziološkim indeksom tjelesne mase.

#### *3.5.1.2. Biomehanički čimbenici*

Stupanj fizičke aktivnosti i indeks tjelesne mase utječu na sile koje djeluju na endoprotezu, pa se također smatraju i biomehaničkim čimbenicima. Daljni potencijalno važan čimbenik bile bi konstrukcijske, odnosno biomehaničke osobine endoproteze (60). Postoji velik broj modela endoproteza koje se neznatno razlikuju s obzirom na detalj konstrukcije. Nema podataka na temelju kojih bi se došlo do zaključaka o razlikama u pojavnosti aseptičke nestabilnosti, koja bi se mogla pripisati konstrukcijskim svojstvima endoproteze. Također, nema podataka koji bi ukazali da su operativni zahvati, koje je katkad potrebno izvesti uz ugradnju endoproteze (acetabuloplastika ili pak osteotomija trohantera), a koji mijenjaju biomehaničku situaciju u zglobu kuka, važni za pojavnost aseptičke nestabilnosti endoproteze.

S druge strane, inklinacijski kut acetabuluma postignut prilikom ugradnje endoproteze, značajno utječe na pojavu aseptičke nestabilnosti. Naime, cilj je ostvariti kut od 45 stupnjeva, pri čemu se toleriraju odstupanja od  $\pm 5$  stupnjeva. Nepovoljan inklinacijski kut acetabuluma povećava rizik od nastanka aseptičke nestabilnosti

endoproteze (61,62,63). Pokazalo se, međutim, da do aseptičke nestabilnosti endoproteze dolazi i kod zadovoljavajućeg inklinacijskog kuta (40 – 50 stupnjeva).

#### *3.5.1.3. Ostali čimbenici*

Bolest zbog koje je ugrađena endoproteza. Na temelju analize oko 54000 endoproteza iz norveškog registra endoproteza kuka (45), zaključeno je da je rizik nastanka aseptičke nestabilnosti veći u bolesnika s razvojnim anomalijama kuka, u odnosu na one kojima je endoproteza ugrađena zbog drugih razloga (npr. primarna osteoartroza, aseptička nekroza glave bedrene kosti, ozljeda itd.).

Iskustvo operatera i vrijeme trajanja operacije. Na temelju analize oko 32000 endoproteza (cementne i bescementne endoproteze) iz norveškog registra (62,64) pokazano je kako iskusniji operateri (mjereno brojem godišnjih operacija) prosječno troše manje vremena za ugradnju endoproteze u odnosu na manje iskusne operatere. Neovisno o dobi i spolu bolesnika, tipu endoproteze ili bolesti koja je dovela do potrebe za endoprotezom, rizik nastanka aseptičke nestabilnosti bio je veći kod bolesnika liječenih od strane manje iskusnih. Rizik aseptičke nestabilnosti veći je ako operacije traju dulje od prosječnih 90 minuta. Također, rizik je veći ako operacija traje kraće od 50 minuta.

Svi navedeni čimbenici samo manjim dijelom objašnjavaju varijabilnost pojavnosti aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka.

## **4. BOLEST SITNIH ČESTICA**

### **4.1. Koštano remodeliranje**

Kost nije inertna. Njezina pregradnja zbiva se različitim intenzitetom tijekom cijelog života jedinke, u okviru održavanja homeostaze koštanog sustava. Proces razgradnje i stvaranja kosti u uzajamnoj su interakciji i u homeostazi. Pregradnja se odvija u jedinicama koštane pregradnje, koje se sastoje od koštanih stanica, osteoblasta i osteoklasta te njihovih progenitora (65-67). Regulacija pregradnje, odnosno metabolizma kosti uključuje složen sustav citokina, čimbenika rasta i hormona koji utječu na aktivaciju osteoblasta, stvaranje i funkciju osteoklasta, te na međudnos tih stanica (68,69).

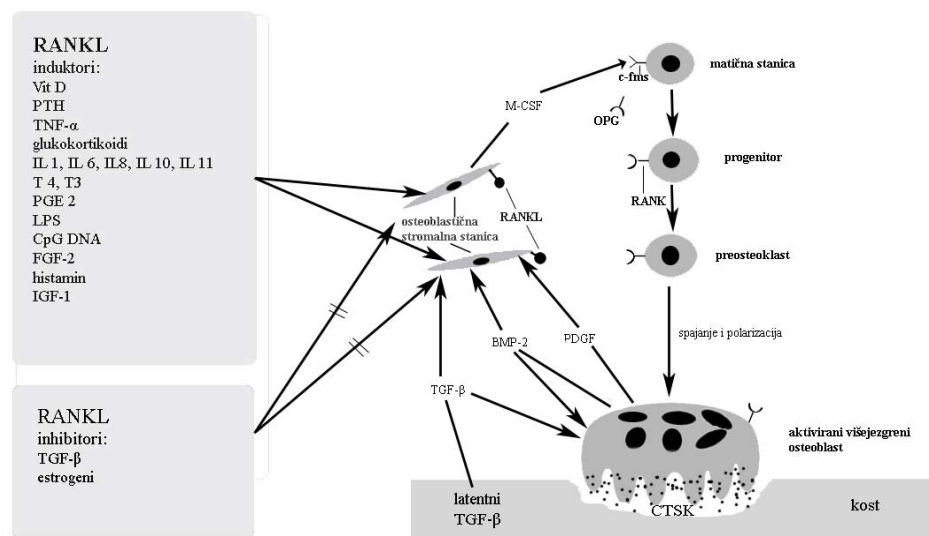
Aktivacija takve jedinice počinje osteoklastičnom resorpcijom, a nastalu prazninu oblika stošca popunjavaju osteoblasti novostvorenom kosti. Brzina pregradnje, kao i količina resorbirane i novostvorene kosti, ovisi o broju aktiviranih jedinica pregradnje te o broju i stanica unutar nje (70,71).

Funkcija osteoblasta i osteoklasta usko je povezana. Stanice osteoblastične loze sintetiziraju molekule koje započinju i kontroliraju diferencijaciju osteoklasta s jedne strane, dok s druge strane sintetiziraju molekule koštanih morfogenetskih bjelančevina (BMP, od engl. bone morphogenetic proteins). Ove su bjelančevine pripadnici u nadobitelj transformirajućeg čimbenika rasta tipa beta. Potiču osteoblastogenezu, odnosno diferencijaciju progenitorskih stanica u osteogenom smjeru, što se klinički manifestira stvaranjem kosti i lokalnim povećanjem koštane mase (72-75).

#### ***4.1.1. Osteoklastogeneza***

Aktivacija osteoklastičnog procesa započinje sazrijevanjem osteoklasta iz stanica preteča, što zahtijeva prisustvo stromalnih stanica koštane srži. Osteoblasti proizvode

različite molekule nužne za osteoklastogenezu, od kojih je važno spomenuti čimbenik poticanja rasta kolonija monocita (M-CSF, od engl. macrofage colony stimulating factor) i receptorski aktivator jezgrinog čimbenika Kapa-B (RANKL, od engl. receptor activator of NF kappa B ligand) (76-80) (slika 1).



**Slika 1.** Genetička kontrola diferencijacije osteoklasta (Slika korištena iz rada Troen i sur. (80)).

RANKL je bjelančevina koju proizvode osteoblasti nakon vezanja s receptorskim aktivatorom jezgrinog čimbenika Kapa-B (RANK), transmembranskim proteinom na preosteoklastu, koji potiče njegovu diferencijaciju u osteoklast. Najveća količina glasničke RNA (mRNA) za RANKL protein dokazana je u trabekulama kosti i koštanoj srži te limfatičnom tkivu koje aktivno sudjeluje u imunološkom odgovoru. RANKL se, osim na membrani osteoblasta, može dokazati i u slobodnom obliku. Vezan na



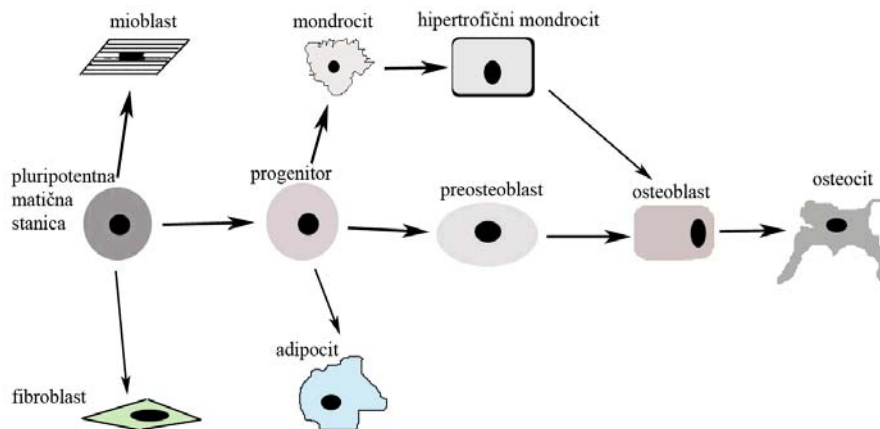
membrani osteoblasta, RANKL omogućuje sazrijevanje osteoklasta dok njegov slobodan oblik inhibira vezanja preosteoklasta i osteoblasta, što za posljedicu ima smanjeno sazrijevanje osteoklasta. U diferencijaciji progenitora osteoklasta sudjeluju, osim proteina RANKL-RANK, još i IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa, TGF-beta i M-CSF (81,82).

Molekula M-CSF vežu se na receptore preosteoklasta i aktiviraju signal za proliferaciju osteoklasta. Nakon aktivacije M-CSF-om i vezanja RANKL-RANK dolazi do promjene oblika receptora RANK. Svojim oblikom postiže formu na koju se mogu vezivati TRAF (TNF udruženi receptorski čimbenici). Aktivirani TRAF uzrokuje aktivaciju NF-kapaB transkripcijskog čimbenika. On se aktivira i ulazi u jezgru, veže se na promotore gena odgovornih za proliferaciju osteoklasta.

U mnogim radovima dokazane su promjene količine M-CSF i RANKL u uvjetima in vitro te njihov učinak na diferencijaciju i sazrijevanje osteoklasta (67,79-83). Neposredno nakon osteoklastičnog slijedi osteoblastični diferencijacijski proces.

#### ***4.1.2. Osteoblastogeneza***

Osteoblastični proces uključuje regrutiranje i diferencijaciju osteoblastičnih stanica s usporednim kaskadnim aktivacijama različitih molekula tijekom faze intenzivne proliferacije i sazrijevanja osteoblastične diferencijacije te sinteze različitih molekula (69) (slika 2). U regulaciju osteoblastičnog procesa uključen je cijeli niz sustavnih i lokalno proizvedenih čimbenika (83).

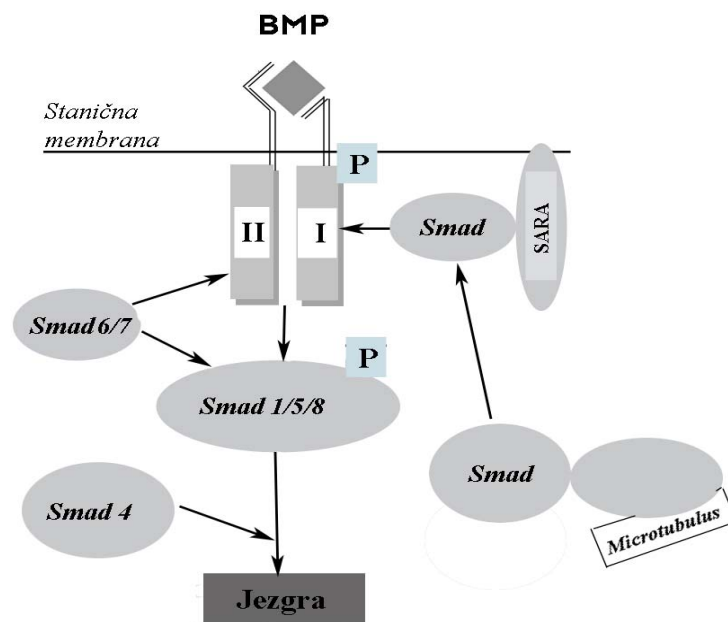


**Slika 2.** Stanice koje nastaju iz diferencijacije matične stanice.

Za osteoblastični proces odgovorne su stanice osteoblastične linije te visoka aktivnost enzima alkalne fosfataze te vezanje paratireoidnog hormona i čimbenika rasta, inzulinu slični čimbenici rasta tipa I i II (IGF-I, IGF-II), epidermalni čimbenik rasta (EGF), čimbenik rasta porijeklom iz fibroblasta (FGF), čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (PDGF), transformirajući čimbenik rasta beta 1 (TGF- $\beta$ 1) te razni citokini, na primjer interleukin 1 i interleukin 6 (84-87).

Nova kost nastaje uz prisustvo kolagena tipa I i velikog broja nekolagenih proteina koštanog matriksa, kao što su osteokalcin, osteonektin, osteopontin i neki drugi. Ovi proteini sudjeluju u stvaranju koštanog matriksa i utječu na sposobnost mineralizacije (88). Osteoblastične stanice mogu sintetizirati koštane morfogenetske proteine, odgovorne za stvaranje kosti (89). Ovi proteini imaju nezaobilaznu regulacijsku ulogu u procesima morfogeneze i “popravka kosti”, kao i u fazi održavanja fiziološke homeostaze. Mehanizam djelovanja sastoji se u aktivaciji molekule iz prekusorskih kompleksa, te njihovim međusobnim djelovanjem s drugim specifičnim veznim proteinima i receptorima stanične površine (90). Intracelularni aktivirani

kompleks drugih glasnika prenosi signale u jezgru preko kompleksa SMAD koji, uz cijeli niz koaktivatora i korepresora, stvaraju preduvjet za aktivaciju ciljnih gena (primjerice, gena BMP-2 i BMP-4) (91). Kontrola prijenosa signala molekulama SMAD odvija se na vrlo složenim razinama, a uključuje posebne transportne molekule (SARA protein) te različite mehanizme povratne sprege (92) (slika 3). Aktivacijom gena za koštane morfogenetske proteine nastaje ključni preduvjet za složeni proces diferencijacije osteoblastičnih stanica, kako za inicijaciju, tako i za održavanje zrelog osteoblastičnog fenotipa (17).



**Slika 3.** Shematski prikaz BMP receptora I i II te SMAD i SARA proteina koji sudjeluju u prijenosu signala od stanične površine do jezgre.

Inače, složeni homeostatski mehanizam stvaranja i resorpcije kosti, koji je u fiziološkim uvjetima i pod utjecajem hormona, npr. estrogena, dodatno se komplicira

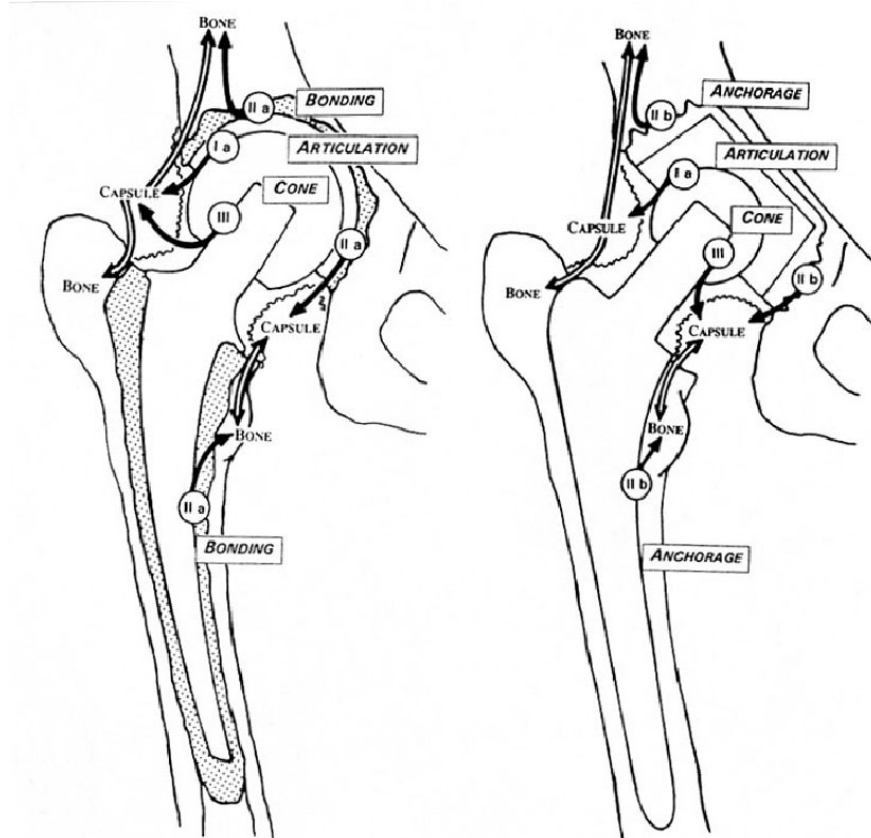
stanjima upale, prijeloma, menopauze, promijenjenih mehaničkih sila ili bolesti koje karakterizira promijenjena gustoća kosti (80).

#### **4.2. Upalna reakcija na strane čestice - Bolest sitnih čestica (“Particle disease”)**

Ako sve prije navedene činjenice koristimo u analizi aseptičke nestabilnosti endoproteza zgloba kuka, možemo reći da postoji upalna reakcija, kao odgovor organizma na strano tijelo. Produkti upalne reakcije negativno utječu na homeostazu neophodnu za pravilno koštano remodeliranje. Za razvijanje upalne reakcije nije važno koja je čestica u pitanju. Značaj ima njezina veličina i koncentracija. Upalnu reakciju nastalu zbog prisustva stranih čestica nazivamo bolešću sitnih čestica ili “particle disease”.

U bolesnika s bolešću sitnih čestica dolazi do upalne reakcije, što rezultira poremećenom homeostazom osteoblasta i osteoklasta, zbog čega nema kvalitetnog koštanog remodeliranja, što se klinički očituje kao nestabilna endoproteza zgloba kuka.

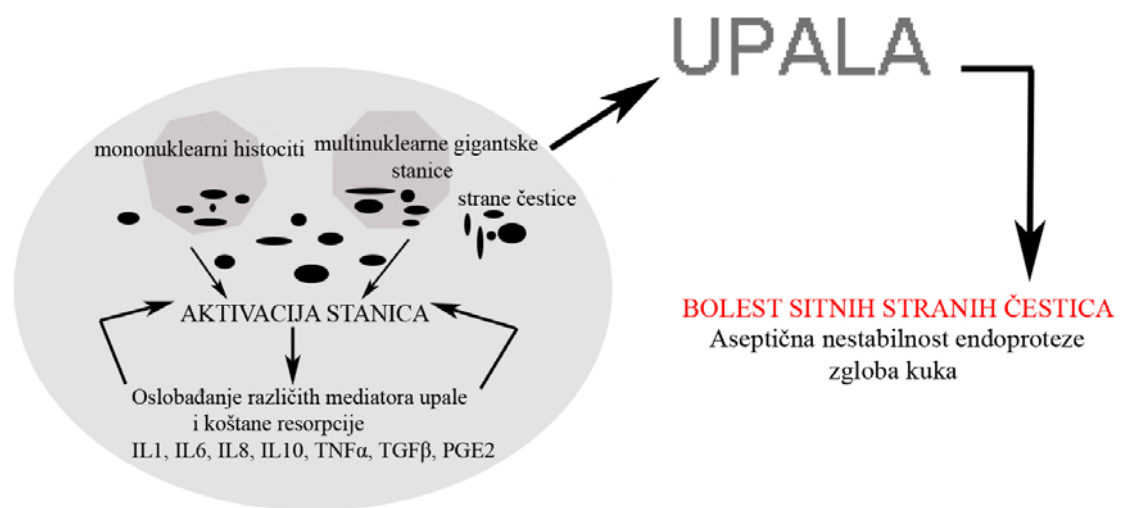
U literaturi spomenuti pojmovi, kao što je osteoliza i/ili aseptičko olabavljenje endoproteze, predstavljaju jednaki patološki proces s jednakim bazičnim mehanizmima. Odgovor tkiva ovisi o nekoliko čimbenika: o stupnju olabavljenja endoproteze, o vrsti endoprotetskog materijala, o vremenu trajanju implantata te o količini i veličini stranih čestica (debrisa). Strane čestice najčešće su metal, koštani cement i polietilen. Nalazimo ih unutar zglobne tekućine i/ili u periartikularnom tkivu. Mehanizam stvaranja metalnih djelića je mehanički; nastaju najčešće abrazijom i/ili trenjem dijelova endoproteze (glave i vrata, glave i acetabuluma) (slika 4).



**Slika 4.** Mjesta na kojima se oslobađaju sitne čestice uslijed abrazije i trenja kod cementnih i bescementnih endoproteza zgloba kuka. (Slika kopirana iz rada Wilert i suradnici (5)).

Djelci polietilena oslobađaju se pri trenju metalne glave o polietilenski acetabulum (označeno na slici A kao Ia), pri trenju metalne glave o metalni vrat bedrenog dijela endoproteze (označeno na slici A kao III) i/ili abrazijom polietilenskog dijela ili metalnog dijela o kost (označeno u slici A kao II b), a djelići koštanog cementa nastaju isključivo abrazijom o kost (označeno u slici A kao II a). Postoje tri mehanizma širenja stranih čestica: 1. preko perivaskularnih limfnih prostora; 2. regionalno širenje; 3. pasivnom disimnacijom preko otvorenih prostora zgloba. Transport makrofazima u perivaskularnim limfnim prostorima, za posljedicu ima odnošenje stranih čestice daleko

od mjesta stvaranja u novoformiranim kapsulama oko zglobova, koštanoj srži i u tkivima, na granici između kosti i implantata. Na taj način debris može biti odnesen centripetalno, područja, u regionalne limfne čvorove. Oko umjetnih zglobova oslobođene će strane čestice, ako su manje od 12 nm, biti fagocitirane u mononuklearnim histiocitima i multinuklearnim gigantskim stanicama i razviti će se reakcija na strano tijelo (Slika 5) (6,7).



**Slika 5.** Prikaz osnovne patogeneze kronične upale na strane čestice.

Reakcija tkiva na metalne dijelove endoproteze, kao i reakcije na UHMWPE ili PMMA djeliće, jednake su i ovisi o količini i veličini oslobođenih djelića.

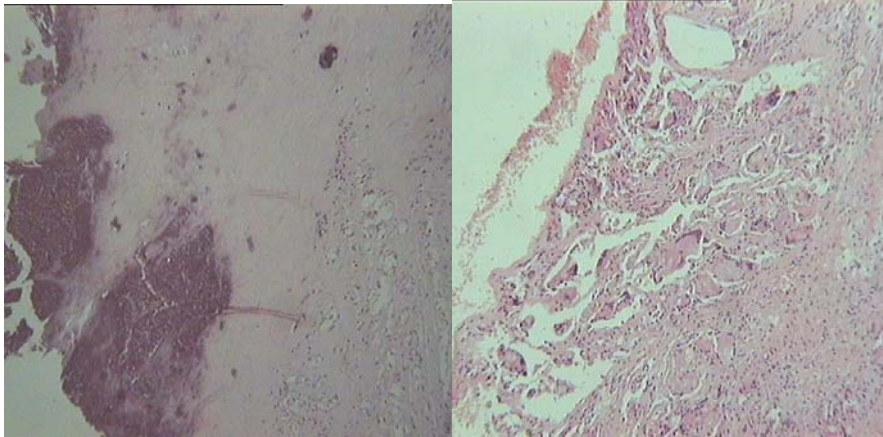
Najvažnije stanice u ovom procesu su makrofazi. Kada makrofazi fagocitiraju strane čestice, lizozomski enzimi i superoksid-radikali oslobađaju se intracelularno te djeluju na takav materijal. U odgovoru na strane čestice, ove stanice mogu izlučivati nekoliko medijatora upale, kao što su interleukini (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), tumor nekrotizirajući čimbenik (TNF- $\alpha$ ), prostaglandin E2 (PGE2), laktička dehidrogenaza,

kolagenaza, želatinaza i metaloproteinaza (4-14, 93). Točna uloga svakog medijatora vjerojatno će se tek otkriti. Strane čestice, ovisno o koncentracije, mogu, uz ostalo, utjecati na izlučivanje staničnih medijatora, što je izravno povezano s pojavom resorpcije kosti. Izgledno je da su u osteolitičkom procesu sitnije čestice izazivaju snažniji odgovor u odnosu na velike (5).

Mnogi citokini mogu imati višenamjenske aktivnosti, regulirati jedni druge ili mogu interferirati s ekspresijom receptora pojedinih tvari koje uzrokuju koštane resorpcije, kao što su metaloproteinaza i cikloustanaza. S obzirom na vrstu stranih čestica pri tkivnoj reakciji, oslobađaju se različiti medijatori koštane resorpcije. Kod tkivne reakcije na metal izlučuje se prostaglandin E<sub>2</sub>, kod tkivne reakcije na polietilen izlučuje se IL-1, TNF- $\alpha$ , a kod tkivne reakcije na koštani cement izlučuje se TNF- $\alpha$ .

Histološki, tkivna reakcija sadrži nekrozu udruženu s opsežnom granulomatoznom reakcijom kao neželjenim učinkom kako na kostima, i tako na drugim tkivima koja okružuju umjetni zglob. Nekroza se u pravilu razvija u području velikih granuloma zbog poremećaja opskrbe krvlju.

Na mjestima gdje postoji radiolucetna linija koja govori u prilog aseptičkog olabavljanja endoproteze kuka, makroskopski se nailazi na granulacijsku opnu (pseudokapsulu) koja mikroskopski sadržava sve osnovne elemente upalne tkivne reakcije s prisutnim stranim česticama. Prisutna su i polja nekroze (slika 6).



**Slika 6.** Patohistološka slika pseudokapsule koja je nastala između polietilenskog acetabularnog dijela endoproteze i kosti. Vidljiv je veliki broj stranih čestica u izvanstaničnom prostoru.

Mehanički čimbenici, procesi starenja i adaptacije koštanog remodeliranja pridonose gubitku kosti nakon ugradnje endoproteze kuka, no ipak se najodgovornijim mehanizmom smatra biološka reakcija organizma na strane čestice.

Oslobađanje i širenje stranih čestica, upalna lokalna reakcija i prihvaćanje tih čestica kao stranog tijela, pa čak i razvoj osteolize zbog stvaranja granuloma, nisu specifično vezani za neki posebni materijal.

Zaključno, nazivi kao što su “metal disease”, “cement disease” ili “polietilen disease” općenito su neodgovarajući te je, stoga, preporučeni naziv - “bolest stranih čestica” ili “particle disease”.



## 5. MOLEKULARNA MEDICINA

Molekularna medicina je područje medicine unutar kojeg se nastanak bolesti istražuje na molekularnoj razini (94). Razumijevanje nastanka patološkog procesa na razini molekularnih promjena je bazično znanje na kojem bi se trebalo temeljiti sveobuhvatno znanje o nastanku, ali i liječenju određene bolesti, odnosno stanja.

Primjena molekularne medicine u ortopediji u samom je začetku, za razliku od nekih drugih područja, kao što je, na primjer, molekularna onkologija. Spoznaje o molekularnim mehanizima nastanka bolesti danas se koriste u dijagnostici različitih vrsta artritisa, nasljednih bolesti lokomotornog sustava, kao što su koštane displazije, ili metaboličkih bolesti, npr. osteoporoze, rahitisa, osteopoikiloze (95) i mnogih drugih.

Projektom Genom čovjeka (engl. *Human Genome Project*), koji se temeljio na sekvencioniranju molekule DNA, pokazano je da u svim genima postoji polimorfizam nukleotida (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphysm*), koji ne moraju nužno dovesti do nastanka polimorfnog proteina ako je polimorfizam u intronu, odnosno zbog degeneriranog koda tripleta nukleotida. S druge strane, zbog prisustva polimorfizma protein može biti promijenjen.

Polimorfizam je zamjena nukleotida u molekuli DNA, uobičajena u populaciji, pri čemu se niti jedan alel ne smatra "standardnim". Umjesto toga, postoje dvije ili nekoliko podjednako zastupljenih sljedova DNA. Smatra se da granica između polimorfizma i mutacije iznosi 1%. Drugim riječima, da bi se promjena sljeda nazvala polimorfizmom, učestalost u populaciji mora biti od jedan ili više posto (96). Ako je učestalost manja od 1%, tada se promjena u sljedu DNA smatra mutacijom (97).

Mutacija je također promjena sljeda nukleotida u molekuli DNA, pri čemu u populaciji postoji prevladavajući tip alela. Za razliku od polimorfizma mutacija dovodi

do nastanka sljeda nukleotida koji je vrlo rijedak u populaciji i nerijetko se manifestira bolešću, odnosno, određenim patološkim fenotipom.

Polimorfne promjene u molekuli DNA nisu razlogom nastanka bolesti. Najčešće se nalaze u nekodirajućim područjima molekule DNA i njihovo se postojanje, stoga, ne odražava na građu i funkciju proteina.

### **5.1. Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP)**

Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP) je naziv za zamjenu jedne baze drugom (npr, A umjesto G). Polimorfizmi se, u prosjeku, pojavljuju jednom na 250 baza, čineći tako više od 3 milijuna varijacija u genomu čovjeka (98). Polimorfizam DNA može biti izazvan različitim mehanizmima, između ostalih - rekombinacijom i greškama nastalim tijekom replikacije molekule DNA (99).

Do danas je otkriveno 1,8 milijuna SNP. Ovi podaci su pohranjeni u baze podataka dostupne javnosti (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>; <http://www.snp.cshl.org>). Najviše pažnje pobuđuju SNP koji utječu na ispoljavanje gena, odnosno mijenjaju građu proteina. Pretpostavlja se da broj takvih SNP u genomu čovjeka između 50 000 - 250 000 (100-103). Učestalosti SNP na autosomima je veća nego na spolnim kromosomima (103-106).

#### **5.1.1. Određivanje prisutva polimorfizama**

Polimorfizmi gena mogu se otkriti različitim metodama: a) metoda lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. polymerase chain reaction), korištenjem početnih oligonukleotida koji su na 3' kraju komplementarni određenom polimorfnom nukleotidu; b) cijepanje odsječaka DNA određenim restrikcijским endonukleazama (određivanje duljine restrikcijских ulomaka – RFLP, od engl. restriction fragment length

polymorphism); c) metodom “Lightcycler”, koja se temelji na lančanoj reakciji polimeraze uz vrlo brze izmjene temperaturnih ciklusa; d) metodom koja se temelji na bioluminiscenciji pirofosfata nastalih u specifičnim “proba-produljenim” reakcijama (BAMPER, od engl. *Bioluminometric Assay Coupled With Modified Probe Extension Reactions*); e) bioinformatičkim programima kojima je moguće izračunati mjesto SNP (Immunoblot/Genoblot Scanning System – WGSA, od engl. *Whole-Genome Shotgun Assembly*) (98,107-112).

U ovom istraživanju korištene su metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) i cijepanje odsječaka DNA restrikcijskim endonukleazama (RFLP).

#### *5.1.1.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)*

Lančana reakcija sinteze DNA korištenjem DNA polimeraze, PCR, je postupak umnažanja DNA in vitro, u tijeku kojeg se umnažaju (ciljano uvišestručuju) željeni sljedovi gena. Metoda je osjetljivija od bilo koje do danas upotrijebljene i njome se može otkriti, između ostalog, samo jedna ciljna molekula u prisutnosti velikog broja ostalih.

Preduvjet za izvođenje reakcije je poznavanje sljeda nukleotida rubnih dijelova odsječaka DNA koji se želi umnožiti, na temelju kojeg se konstruiraju početni oligonukleotidi (engl. primer) i postojanje barem jedne početne molekule DNA koja u reakciji ima ulogu kalupa (templata). U reakciji dolazi do prepisivanja obaju lanaca DNA koji se nalaze između 3' rubnih dijelova početnih oligonukleotida, uvijek u smjeru 5' → 3'. Nakon vezanja početnog oligonukleotida na DNA (po načelu komplementarnosti), oni se produljuju (prema postojećem kalupu) ugradnjom slobodnih nukleotida DNA-polimerazom. Rezultat prvog kruga je udvostručen broj ciljnih molekula (94,113).

Jedan krug umnažanja sastoji se od tri koraka koji se izvode na različitim temperaturama (114). Svaki ciklus započinje razdvajanjem lanaca (denaturacija), nastavlja se sparivanjem početnih oligonukleotida i završava produžavanjem lanca. Optimalan broj ciklusa ovisi o mnogim čimbenicima, najčešće količini i kvaliteti DNA. Prevelikim brojem ciklusa povećava se količina neželjenih produkata reakcije dok premali broj dovodi do stvaranja vrlo malih količina produkata PCR. U optimiziranoj reakciji obično se izvodi 25-40 temperaturnih ciklusa.

Umnoženi odsjecci detektiraju se, nakon završene elektroforeze, u gelu agaroze ili gelu poliakrilamida.

Uspješnost izvođenja reakcije ovisi o pravilnom odabiru uvjeta umnažanja (vrijeme i temperatura), količini početne DNA, kao i ostalih sastojaka reakcijske smjese (115). Količina DNA koja se koristi u reakciji najčešće je 0,5  $\mu\text{g}$  /100 $\mu\text{l}$ .

PCR je, najčešće u kombinaciji s nekim drugim metodama, nezamjenjiv u molekularnoj medicini. U dijagnostici je prvi put korišten za prenatalno postavljanje dijagnoze anemije srpastih stanica, genetskog oboljenja uzrokovanog mutacijom gena za  $\beta$ -globin (116).

Ova metoda je baza (u kombinacijama s drugim metodama) za otkrivanje mutacija gena odgovornih za nastanak  $\beta$ -talasemije, cistične fibroze, zloćudnih tumora, za otkrivanje bakterija, te DNA i RNA virusa (117-119). Osim za dijagnozu genetskih oboljenja, primjena PCR znatno olakšava analizu određivanja sklonosti pojedinim oboljenjima, npr. dijabetes tipa II i reumatoidni artritis (120). Također, ova metoda koristi i u sudskoj praksi (121).

### *5.1.1.2. Metoda cijepanje umnoženih odsječaka DNA restrikcijskim endonukleazama (RFLP)*

Metoda cijepanje umnoženih odsječaka DNA određenim restrikcijskim endonukleazama (RFLP) jedna je od metoda kojima se otkriva polimorfizam odsječka molekule DNA. Osnova metode je u slijedećem: postojanje određenog polimorfnog nukleotida u određenom odsječku DNA dovest će do stvaranja novog, odnosno uklanjanja postojećeg restrikcijskog mjesta za određenu restrikcijsku endonukleazu.

## **5.2. Važnost polimorfizma pojedinačnih nukleotida u molekularnoj ortopediji**

Polimorfizmi u genima za citokine koji sudjeluju u stvaranju i održavanju koštane mase imaju posebno važno mjesto u molekularnoj ortopediji (122-126).

Interleukin 6 (IL-6) i TGF- $\beta$ 1 su dva upalna citokina za koje postoje dokazi za uključenost u nastanak aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka (127). Određeni polimorfizmi u promotorskom području gena IL-6, npr transverzija G  $\rightarrow$  C na položaju -572, povezuju se s povećanom transkripcijskom aktivnošću gena IL-6 (128) i posljedično, povećanom gustoćom minerala u kostima žena nakon menopauze (122,129). Polimorfizam u kodirajućem području TGF- $\beta$ 1, na položaju 29 (T $\rightarrow$ C tranzicija), povezuje se sa sniženom transkripcijskom aktivnošću TGF- $\beta$ 1 i smanjenom gustoćom minerala u kostima u žena nakon menopauze (122,130).

Do danas je objavljen samo jedan rad u kojem je analiziran polimorfizam gena TNF -  $\alpha$ 1 u bolesnika s endoprotezom zgloba kuka, te njegov utjecaj na razvijanje nestabilnosti endoproteze (57). SNP TNF- $\alpha$  (-238; G $\rightarrow$ A tranzicija) povezan je s pojavom aseptičke nestabilnosti, nakon potpune artroplastike kuka. Prisutnost nukleotida A na položaju -308 u promotorskom području (G $\rightarrow$ A tranzicija) povezan je s

transkripcijom gena TNF- $\alpha$ 1, te povećanom sklonošću prema različitim upalnim procesima (131). Također, protein TNF- $\alpha$ 1 posreduje i u osteolitičkim procesima.

Utjecaj polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genima za IL-6, TNF - $\alpha$ 1 i TGF- $\beta$ 1, kao čimbenika u ranom odbacivanju endoproteze zgloba kuka nitko nije analizirao.

### **5.3. Interleukin 6 (IL - 6)**

Interleukin 6 (IL-6) je multifunkcionalan citokin, koji se sintetizira u mnogim stanicama: makrofazima, T-stanicama, fibroblastima i endotelnim stanicama (132-135). Također ga mogu producirati bakterije i virusi. Neki citokini, na primjer interleukin 1 i tumor nekrotizirajući čimbenici mogu potaknuti njegovu sintezu.

Gen IL-6 je smješten na kromosomu 7 (7p21) (137), gdje zauzima 1125 pb genomske DNA. Sastoji se od pet eksona i četiri introna. Zreli interleukin 6 je glikoprotein molekulske mase 23 718 Da, a čine ga 212 aminokiseline (136,137).

Do danas je poznato 147 polimorfizama u ovom genu (136,138). Unutar eksona su poznata 54 polimorfizama; 12 ispred kodirajućeg područja, 37 u kodirajućem području i 5 iza kodirajućeg područja.

U literaturi se spominje pod različitim imenima: interferon beta-2 (IFN- $\beta$ 2), čimbenik diferencijacije B limfocita (engl. B-cell differentiation factor), stimulirajući čimbenik B limfocita (BSF2, od engl. B-cell stimulatory factor 2), stimulirajući čimbenik hepatocita (HSF, od engl. hepatocyte stimulatory factor), čimbenik rasta hibridoma (HGF, od engl. hybridoma growth factor) (137).

Osnovna uloga interleukina 6 je: regulacija imunološke reakcije kao pro-upalni i protu-upalni citokin; remodeliranje kosti. Najvažnije djelovanje interleukina 6 zasniva

se na završnoj diferencijaciji B-limfocita i poticanju biosinteze sekretornog tipa imunoglobulina (Ig) na razini mRNA (138, 139,140). Također, interleukin 6 potiče sintezu slijedećih proteina: fibrinogen, alfa-1-antikimotripsin, alfa 1 kiseli glikoprotein, serumski amiloid A i C-reaktivni protein (CRP) (141). Interleukin 6 ima proosteoklastično (aktivaciji progenitora osteoklasta nakon čega započinje proces osteoklastogeneze) i proosteoblastično djelovanje (izravna aktivacija osteoblasta) (136,142-146).

#### **5.4. Tumor nekrotizirajući čimbenik – alfa1 (TNF- $\alpha$ 1)**

Tumor nekrotizirajući čimbenik - alfa je multifunkcionalan citokin koji posjeduje antitumorsku aktivnost (147). Izlučuju ga makrofagi, monociti, neutrofil, T limfociti, astrociti, glatke mišićne stanice i fibroblasti nakon stimulacije mikroorganizmima ili stranim česticama (148,149).

Gen TNF- $\alpha$ 1 nalazi se na kromosomu 6 (6p21.3) (150), gdje zauzima 1660 pb genomske DNA. Posjeduje 4 eksona koji kodiraju nastanak proteina molekularne mase 25 644 Da, koji sadrži 233 aminokiseline (150). Do danas je poznato 715 polimorfizama ovog gena (150).

Receptori za TNF- $\alpha$ 1 nalaze se na gotovo svim stanicama uključujući i eritrocite te stanice sinovijalne tekućine i sinovijalne membrane. Povećana količina topivih receptora dokazana je u oboljelih od reumatoidnog artritisa, sistemskog lupusa eritematozusa, sistemske skleroze i osteoartritisa (151-154).

U malim količinama, TNF- $\alpha$ 1 djeluje na ciljne stanice parakrinom i autokrinom regulacijom. To znači da potiče ispoljavanje receptora na endotelnim stanicama što omogućuje pojačanu adheziju neutrofila, monocita i limfocita. Ovo je ujedno i najvažniji

lokalni učinak TNF- $\alpha$ 1. Također, u malim količinama potiče endotelne stanice da luče kemokine, osobito IL-8 (152). U velikim količinama, ako ulazi u krv, djeluje kao endokrini hormon i ponaša se kao endogeni pirogen (149,153).

TNF- $\alpha$ 1 je važan čimbenik u remodeliranju kosti: aktivira progenitore osteoklasta i započinje proces osteoklastogeneze (154).

### **5.5. Transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ 1)**

Transformirajući čimbenik rasta beta je multifunkcionalan citokin (155), koji sudjeluje u proliferaciji i diferencijaciji velikog broja stanica, ali također može djelovati i antiproliferativno, ovisno o vrsti stanica (156,157).

Potiče sintezu ekstracelularnog matriksa, inhibira njegovu razgradnju, djeluje kao imunosupresor. U glatkim mišićnim stanicama, fibroblastima i hondrocitima potiče bimodalni odgovor, u smislu proliferativnog ponašanja (158-164). Stoga, TGF- $\beta$ 1 u ovim stanicama djeluje kao autokrini čimbenik rasta. Također, TGF- $\beta$ 1 može djelovati kao negativan regulator staničnog ciklus.

Gen *TGF- $\beta$ 1* je smješten na kromosomu 19 (19q13.1) (155,165), gdje zauzima 2555 pb genomske DNA. Sastoji se od 7 eksona i 6 introna. Glasnička RNA dugačka je 1173 baze; kodira protein molekularne mase 44341 Da, koji sadrži 390 aminokiselina (165, 166). Do danas je poznato 106 polimorfizama u ovom genu (155,167).

Gen *TGF- $\beta$ 1* aktivan je u gotovo svim stanicama čovjeka. Član je superobitelji TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ SF, od engl. transforming growth factor beta superfamily), u kojoj se nalazi veliki broj polipeptida (npr. koštani morfogenetski proteini, BMPs, od engl. bone morphogenetic proteins; GDFs, od engl. growth differentiation factors; GDNFs od engl. glial derived neurotrophic factors; MIS, od engl. mullerian inhibiting substance) (159).



Oni se razlikuju se po veličini molekule (npr. molekularnoj masi TGF- $\beta$  je 25000 Pa, a TGF-  $\alpha$  5600 Pa) i naravno, u funkciji.

TGF- $\beta$ 1 inhibira proliferaciju T- i B- limfocita, timocita, makrofaga, NK- i LAK stanica (168).

Ovaj citokin ima značajan utjecaj na remodeliranje kosti. Djeluje kao RANKL inhibitor, što se očituje inhibiranjem osteoklastogeneze. Poznato je da aktivacija osteoklastičnog procesa započinje sazrijevanjem osteoklasta iz stanica preteča, što zahtijeva prisustvo stromalnih stanica koštane srži. Osteoblasti sintetiziraju različite molekule nužne za osteoklastogenezu, od kojih je važno spomenuti čimbenik poticanja rasta kolonija monocita (M-CSF) i receptorski aktivator jezgrinog čimbenika Kapa-B (RANKL) (77,78). TGF- $\beta$ , također, djeluje kemotaksično na osteoblaste i na diferencijaciju osteoblasta iz matičnih stanica (169,170).

### **5.6. Važnost polimorfizma gena IL-6, TGF- $\beta$ 1 i TNF- $\alpha$ u kliničkoj praksi – transplantacija i ugradbeni materijali**

Do danas je objavljeno oko 1250 radova koji opisuju povezanost polimorfizama u genima IL-6, TGF- $\beta$ 1 i TNF- $\alpha$  s određenim bolestima. Mali broj radova opisuje povezanost polimorfizma u ovim genima s ranim odbacivanjem transplantiranog organa, naročito bubrega i srca, odnosno - implantata nakon kardioloških ili stomatoloških zahvata.

Poli i sur. (2002) (171) su iznjeli da polimorfizam gena ima utjecaj na djelovanje imunosupresivne terapije te na taj način utječe na odbacivanje transplantiranog organa. Pogotovo takvo djelovanje imaju polimorfizmi na genima TNF- $\alpha$ , IL-6 i TGF- $\beta$ 1 (172).

Müller-Steinhardt i sur. (173), su nedavno objavili rad u kojem su pokazali povezanost polimorfizama u genu IL-6 s preživljenjem bubrežnog transplantata. Dokazali su da kombinacija genotipova na pozicijama -597, -572 i -174 u promotorskom području gena IL-6 imaju veći utjecaj na preživljenje bubrežnog transplantata.

Alakulppi i sur. (174) su analizirali polimorfizam u genu TNF- $\alpha$  i pokazali su da bolesnici s genotipom AA na -308 TNF- $\alpha$  imaju veliki rizik od akutnog odbacivanja transplantata bubrega.

Postoji nekoliko radova koji povezuju preživljenje kardioloških transplantata i određenih genotipa. Awad i sur. (175) su pokazali da postoji povezanost između genetskog polimorfizma koji posjeduje alel A u genu TGF- $\beta$ 1 na položajima -800 i -509 u promotorskom području te na kodon položajima 869 i 915 sa stvaranjem fibroze pluća nakon transplantacije pluća. Aziz i sur. (176) su, promatrali povezanost polimorfizma u genu TGF- $\beta$ 1 sa stvaranjem koronalne vaskulopatije nakon urađene transplantacije srca i povišenim koncentracijama TGF- $\beta$ 1 u krvi nakon zahvata. Došli su do zaključka da polimorfizam u genu TGF- $\beta$ 1 ima utjecaj na povišene vrijednosti TGF- $\beta$ 1 i na stvaranje koronalne vaskulopatije.

S druge strane, slična su istraživanja radili Gourley i suradnici (177), pri čemu su promatrali povezanost polimorfizama u genima TGF- $\beta$ 1, IL-10, IL-6 i INF- $\gamma$  i odbacivanje srca te nisu našli povezanost. Densem i sur. (178) su pokušali povezati genotip donora i preživljenje srca, odnosno razvoju koronarne vaskulopatije. Analizirali su polimorfizme kodona 915 i 869 u genu TGF- $\beta$ 1 i zaključili su da nema združenosti.

Brazilska grupa stomatologa (179,180,181) analizirala je povezanost polimorfizama gena, i to: položaj -509 (C $\rightarrow$ T) i -800 (C $\rightarrow$ A) u genu TGF- $\beta$ 1, položaj -308 (G $\rightarrow$ A) u genu TNF- $\alpha$  te položaj 330 (T $\rightarrow$ G) u genu IL-2 i položaj -174 (G $\rightarrow$ C) u

genu IL-6 s preživljenjem implantata u čeljusti. Nisu našli statistički značajno povećan rizik olabavljenja implantata u analiziranoj populaciji.

Analogno ovim radovima, koji govore o povezanosti polimorfizama gena IL-6, TGF- $\beta$ 1 i TNF- $\alpha$  s odbacivanjem transplanta ili implantata, te radovima koji govore o povezanosti polimorfizama istih gena i smanjene gustoće kosti u postmenopauzalnih žena, postavlja se logično pitanje: Postoji li povezanost polimorfizama u genima IL-6, TGF- $\beta$ 1 i TNF- $\alpha$  s kraćim preživljavanjem endoproteze zgloba kuka, odnosno ranijim nastankom aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka?

## 6. HIPOTEZA

Bolesnici u kojih dolazi do nastanka rane aseptičke nestabilnosti totalne endoproteze zgloba kuka genetski se razlikuju od bolesnika s dugotrajnim i stabilnim endoprotezama. Izabrali smo tri gena: gen interleukin 6 (položaji -572 i -597 u promotorskom području gena), gen tumor nekrotizirajući čimbenik alfa tipa 1 (položaj -308 u promotorskom području gena) i gen transformirajući čimbenik rasta beta tipa 1 (položaj 29 u kodirajućem području).

Naravno, nije moguće uključiti sve potencijalno zanimljive gene – kandidate u jedno istraživanje. Naš se izbor temeljio na sljedećim činjenicama:

**IL-6** (nukleotidi na položajima -572 i -594). Interleukin 6 je protuupalni citokin, smatra se medijatorom aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka (182,183,184), a sudjeluje i u procesu koštanog remodeliranja (185). U promotorskom području ovog gena postoje polimorfizmi na nekoliko položaja (-597G→A, -572G→C, -373AnTn, i -174 G→C) (184) i pokazana je njihova povezanost s nekim biološkim fenomenima/kliničkim stanjima – na primjer, alel “C” (-572) je povezan s većom koštanom masom u pre- i post-menopauzalnih žena (122,190). Način na koji prisustvo tog alela utječe na koštanu masu nije poznat. Postoji mogućnost da prisustvo određenih alela utječe na ekspresiju gena, no regulacija ekspresije IL-6 posljedica je složene interakcije svih spomenutih polimorfizama (188).

**TNF- $\alpha$ 1** (položaj -308). TNF- $\alpha$ 1 je također medijator u procesu razvoja aseptičke nestabilnosti. Protupalni je citokin višestrukih mehanizama djelovanja koji imaju aktivirajući učinak na osteoklaste (6, 9, 186). U promotorskom području gena *TNF- $\alpha$ 1* postoje polimorfizmi na barem dva položaja: -308 (G→A) i -238 (G→A). Prisustvo nukleotida “A” na položaju -308 povezano je s povećanom sklonošću većem

broju različitih upalnih i zaraznih bolesti (130). Pretpostavlja se da je to posljedica pojačane aktivnosti alela s nukleotidom "A" na položaju -308 (130). Nedavno se pokazalo (57) da nukleotid "A" na položaju -238 povećava rizik od nastanka aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka, zasad nepoznatim mehanizmom.

**TGF-β1** (položaj 29). TGF-β1 je snažno ispoljen u periprostetičkom granulacijskom tkivu kod aseptičkih nestabilnih endproteza zgloba kuka i smatra se važnim medijatorom nastanka aseptičke nestabilnosti (6, 9). TGF-β1 djeluje protuupalno i to se djelovanje ostvaruje višestrukim mehanizmima (187). Polimorfizam T→A na položaju 29 povezan je s većom koštanom masom u postmenopauzalnih žena (131). Smatra se da bi učinak nukleotida "A" na ovom položaju mogao za posljedicu imati pojačano ispoljavanje gena kod nositelja ovog alela (131).

## 7. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Svrha planiranog istraživanja je testiranje postavljene hipoteze. Dokazivanje ili odbacivanje dijela ili cijele hipoteze doprinijelo bi boljem razumijevanju genetske osnove nastanka aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka.

**Primarni cilj** ovoga istraživanja je ustanoviti postoji li združenost polimorfizama u genima za IL-6, TNF- $\alpha$ 1 i TGF- $\beta$ 1 i nastanka aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka kao funkcije vremena proteklog od ugradnje endoproteze do pojave aseptičke nestabilnosti. Učinak pojedinog genotipa biti će izražen kao relativni rizik.

**Sekundarni cilj.** Većini bolesnika koji su pristali sudjelovati u ovom istraživanju endoproteza kuka ugrađena je zbog artroze kuka uzrokovane poremećenim razvojem zgloba kuka. Stoga je sekundarni cilj istraživanja određivanje potencijalne razlike u učestalosti pojedinih genotipova u odnosu na zdrave dobrovoljce.

## **8. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE**

### **8.1 Oblikovanje istraživanja**

U svrhu ostvarenja primarnog cilja, provedeno je retrospektivno prognostičko istraživanje upotpunjeno s presječnom (“cross-sectional”) analizom genotipa. Svi podaci vezani uz ugradnju i ishod ugrađenih endoproteza prikupljeni su retrospektivno, zaključno s prosincem 2004. godine.

U svrhu ostvarenja sekundarnog cilja, provedeno je istraživanje tipa slučaj-kontrola, u kojem “kontrolni ispitanici“ nisu bili birani tako da odgovaraju “slučajevima“ po dobi, spolu i broju (“unmatched case-control”).

### **8.2 Mjesto istraživanja**

Svi bolesnici operirani su i praćeni u Klinici za ortopediju, KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Genetičke analize učinjene su u Laboratoriju za molekularnu patologiju Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

### **8.3 Etički aspekt istraživanja**

Ovo je istraživanje odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičkog povjerenstva KBC Zagreb. Svi su ispitanici bili obavješteni o prirodi i cilju istraživanja, nakon čega su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u studiji.

## 8.4 Ispitanici

U svrhu ostvarenja primarnog cilja, u istraživanje su uključeni bolesnici s ugrađenom totalnom endoprotezom zgloba kuka. U svrhu ostvarenja sekundarnog cilja, u istraživanje je uključena i skupina zdravih dragovoljaca.

### *Bolesnici – kriteriji za uključivanje/neuključivanje u studiju*

Bolesnici, sudionici ovog istraživanja, podskupina su ispitanika koju su bili uključeni u naše prethodno istraživanje u kojem smo analizirali utjecaj biomehaničkih i demografskih čimbenika na pojavu aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka (60). Potencijalni ispitanici za to istraživanje odabrani su pregledom baze podataka Klinike za ortopediju KBC-a.

Kriteriji za uključivanje bolesnika bili su: a) informirani pristanak; b) odazivanje na kontrolni pregled u prosincu 2004.g. (“zaključna evaluacija”); c) od ugradnje endoproteze proteklo je  $\geq 12$  godina; d) ugrađena endoproteza sastojala se od Zweymüllerovog bedrenog dijela endoproteze i Endlerove polietilenskog acetabularnog dijela; e) sve proteze je ugradio isti operater (D.O. – mentor ove dizertacije); f) tijekom vremena postoperativnog praćenja redovito su se odazivali na kontrolne preglede u približno jednom godišnje (osim ako se nisu javljali spontano, u kraćem razmaku, zbog subjektivnih tegoba); g) ako je tijekom praćenja ustanovljena nestabilnost proteze, ona je bila posljedica nastanka aseptičke nestabilnosti.

Kriteriji za neuključivanje u studiju bili su: a) tijekom postoperativnog razdoblja ustanovljeni su drugi čimbenici (osim aseptičke nestabilnosti) koji su mogli utjecati na stabilnost endoproteze (npr.osteomijelitis, trauma); b) nedostajali su podaci (radiogrami) o inklinacijskom kutu acetabuluma neposredno nakon ugradnje endoproteze.



U studiju su bila uključena 72 ispitanika (ukupno 82 totalne endoproteze zgloba kuka). Od tog broja, 41 je bolesnik (ukupno 45 endoproteza – dva muškarca i dvije žene imali su obostrane endoproteze) pristao sudjelovati (informirani pristanak) u ovom istraživanju.

#### *Zdravi dragovoljci*

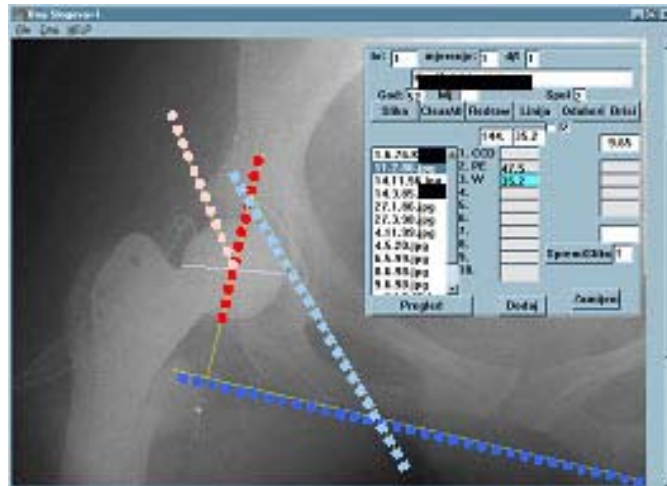
Zdravi dragovoljci izabrani su među studentima 5. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i uposlenicima Klinike za ortopediju KBC-a Zagreb. Uključeni su u studiju ako su bili zadovoljeni ovi uvjeti: a) informirani pristanak za sudjelovanje; b) na temelju anamneze i radiološkog pregleda kukova isključena je mogućnost da boluju od razvojnog poremećaja zgloba kuka.

### **8.5 Operacijska tehnika i radiološka evaluacija**

Sve endoproteze sastojale su se od Zweymullerovog bedrenog dijela endoproteze i Endlerove polietilenske acetabularne čašice s navojima (slika 7). Za artroplastiku je korišten modificirani antero-lateralni pristup (Watson-Jones) (1). Postoperacijski inklinacijski kut acetabuluma izmjeren je na rentgenskim snimkama u antero-posteriornoj projekciji koja je, najčešće, učinjena drugog postoperacijskog dana (slika 8).

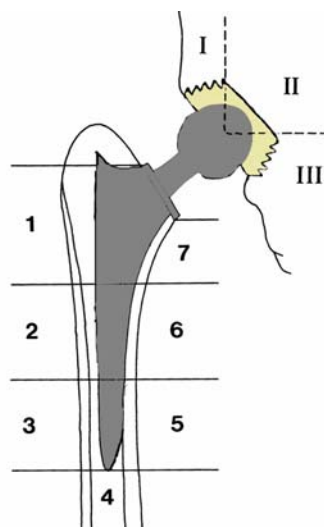


**Slika 7.** Bolesnica je imala obostrane degenerativne promjene zgloba kuka nastale zbog razvojnog poremećaja. Ugrađena je totalna endoproteza zgloba kuka, polietilenski bescementni acetabularni dio model Endler i bedreni dio model Zweymüller. Zbog loše razvijenog acetabularnog dijela kuka urađena je acetabuloplastika obostrano s autolognim koštanim presatkom uz fiksaciju s jednim vijkom.



**Slika 8.** Program Delphi, Visual Pascal, kojim smo mjerili kut inklinacije acetabuluma, drugi postoperacijski dan.

Bedreni dio endoproteze je uvijek bio postavljen u neutralnu poziciju. U kasnijim su kontrolnim pregledima analizirane rentgenske snimke u antero-posteriornoj i lateralnoj projekciji, po metodi DeLee i Charnley (193) (slika 9).



**Slika 9.** Shematski prikaz podjele acetabularnog i bedrenog dijela endoproteze po zonama (188).

Područje doticaja acetabularne čašice i kosti, odnosno femoralnog usatka i kosti podijele se u tri, odnosno sedam zona (područja) u svakoj projekciji i svaki se dio posebno analizira. Parametri koji se prate na radiološkim snimkama su: 1) sklerozacija na mjestima prijenosa najvećeg opterećenja s acetabularnog dijela endoproteze kuka na kost; 2) vidljivi navoji acetabularnog dijela endoproteze mogu se pojaviti u jednoj i/ili više acetabularnih zona; 3) radiolucetna linija (širine  $\geq 1\text{mm}$ ;  $1-2\text{mm}$ ;  $\leq 2\text{mm}$ ) koja se može se pojaviti u jednoj i/ili više acetabularnih zona; 4) smještaj zahvaćene zone; i 5) pomak endoproteze (medijalno, kranijalno).

## **8.6 Definicije ishoda mjerenih u istraživanju**

Sukladno dvama ciljevima istraživanja (primarnim i sekundarnim), definirani su i primarni i sekundarni ishodi istraživanja.

### **8.6.1. Primarni ishod istraživanja**

U svrhu ostvarenja primarnog cilja istraživanja (analize utjecaja genskih polimorfizama na “preživljenje endoproteze do pojave aseptičke nestabilnosti“), kao primarni ishod istraživanja određeno je vrijeme (izraženo u godinama) koje je proteklo od trenutka ugradnje totalne endoproteze zgloba kuka do postavljanja dijagnoze aseptičke nestabilnosti (acetabularnog i/ili femoralnog dijela) koja zahtjeva reviziju ili do “zaključne evaluacije“, ovisno koji je od ta dva događaja nastupio prvi.

Za postavljanje dijagnoze aseptičke nestabilnosti koja zahtjeva reviziju korišteni su kriteriji Krugluger i Eyb (48): a) stadij 1 – stabilna endoproteza (vidljivi navoji ili radiolucetna linija  $\leq 1\text{ mm}$  širine u samo jednom području, sa ili bez sklerozacije; b) stadij 2 – rana aseptička nestabilnost: vidljivi navoji ili prisustvo radiolucetnih linija 1-2 milimetra širine u dva područja; c) stadij 3 – vjerojatna aseptička nestabilnost: vidljivi

navoji ili prisustvo radiolucenčnih linija 1-2 mm širine u dva ili više područja, osteolitički defekt veći od 2 mm; d) stadij 4 – očita nestabilnost: vidljivi navoji ili prisustvo radiolucenčnih linija 1-2 milimetra širine u više područja, osteolitički defekt veći od 2 mm, pomak endoproteze. Radiološki nalaz stadija 2 (acetabularni ili bedreni dio endoproteze) smatran je indikacijom za reviziju ako je bio združen s kliničkim smetnjama, dok su radiološki nalazi stadija 3 i 4 smatrani indikacijom za reviziju, bez obzira na kliničke simptome.

### **8.6.2. Sekundarni ishod istraživanja**

Sekundarni ishod istraživanja (u svrhu ostvarenja sekundarnog cilja) bila je prevalencija pojedinih polimorfizama položajima u oboljelih od razvojnog poremećaja zgloba kuka i u zdravih dragovoljaca.

## **8.7 Analiza polimorfizama u genomskoj DNA**

Analiza polimorfizama napravljena je na genomskoj DNA ispitanika izdvojenoj iz stanica pune krvi. Lančanom reakcijom polimeraze umnožena su ona područja DNA, odnosno oni dijelovi gena, unutar kojih se nalaze polimorfni nukleotidi (123,128,131). Nakon provjere uspješnosti reakcije u gelu agaroze, umnoženi odsječci “cijepani” su određenim restrikcijskim endonukleazama (metoda RFLP) i to: *IL-6* endonukleazama Fok-1 i BsrB-1 te *TNF- $\alpha$ 1* endonukleazom Nco-1.

Polimorfizam u kodirajućem području na položaju 29 TGF $\beta$ -1 ne stvara, odnosno ne briše restrikcijsko mjesto. Stoga se ovaj polimorfizam otkriva korištenjem početnih oligonukleotida čija zadnja baza na 3' kraju “pokriva” polimorfno mjesto.

### **8.7.1. Korištene kemikalije, puferi, enzimi i gelovi**

#### *8.7.1.1. Izdvajanje DNA iz stanica pune krvi*

- pufer za digestiju: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, pH 8,5;
- fenol: ekvilibriran i nadsvođen s Tris, pH 7,9;
- kloroform (Kemika, Zagreb);
- apsolutni alkohol (Kemika, Zagreb);

#### *8.7.1.2. Otapanje DNA*

- pufer TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4;

#### *8.7.1.3. Lančana reakcija polimerazom*

- pufer za PCR (10xTaq Reaction Buffer, Eppendorf) komercijalno dostupan kao 10x koncentriran: 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> i 0,1% želatina;
- pufer za PCR (5x Taq Master (sastav pufera proizvođač ne deklarira);
- 10 mM smjesa deoksinukleotida : 2,5 mM svaki (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Eppendorf);
- Taq polimeraza 5 U/μl (TaKaRa, Japan).

#### *8.7.1.4. Elektroforeza genomske DNA i odsječka PCR u gelu agaroze*

- pufer TAE: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0;
- agarozna tipa I (Sigma);
- pufer za nanošenje (engl. loading buffer): pripremljen kao 6x koncentriran: 0,25% bromofenolno modriilo (Sigma), 0,25% ksilen cijanol (Sigma) i 30% glicerol (Kemika, Zagreb).

#### *8.7.1.5. Restrikcije odsječaka PCR*

-pufer 2 (New England BioLabs): 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7,9 pri 25°C; dostupan kao 10x koncentriran i koristi se s restriksijskom endonukleazom BsrB1;

-pufer 4 (New England BioLabs): 50 mM K-acetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM Mg-acetat, 1 mM DTT, pH 7,9 pri 25°C, dostupan kao 10x koncentriran i koristi se s restriksijskim endonukleazama: NcoI i FokI.

#### *8.7.1.6. Elektroforeza u 15% gelu poliakrilamida*

-pufer TBE: 90 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,3;

-pufer za nanošenje (engl. loading buffer): pripremljen kao 6x koncentriran: 0,15% bromfenolno modriilo (Sigma), 0,15% ksilen cijanol (Sigma) i 40% glicerol (Kemika, Zagreb);

-30% otopina akrilamid/bisakrilamid (Roche);

-TEMED (N,N,N,N-tetrametiletildiamin) (Serva);

-10% otopina amonij-persulfata (APS) (Kemika).

#### *8.7.1.7. Standardi DNA*

-standard V: odsječci veličina 8-587 pb (Roche);

-standard X: odsječci veličina 76-12216 pb (Roche);

-standard XIII: odsječci veličina 50-2642 pb (Roche).

#### *8.7.1.8. Bojanje restriksijskih ulomaka DNA srebro-nitratom*

-10% otopina etanola;

-oksidans: 1% otopina dušične kiseline (HNO<sub>3</sub>) (Kemika, Zagreb);

-srebro za bojanje: 0,2% otopina srebro (I)-nitrata (AgNO<sub>3</sub>) (Kemika, Zagreb);

-razvijatelj: 3% otopina natrij-karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) + 500  $\mu\text{l}$  36% formalina (konačna koncentracija 0,018%) (Kemika, Zagreb);

-otopina za zaustavljanje reakcije: 5% otopina octene kiseline (Kemika, Zagreb).

#### *8.7.1.9. Početni oligonukleotidi*

U lančanoj reakciji polimerazom koristio sam početne oligonukleotide prikazane u tablici 3.

#### *8.7.1.10. Enzimi*

U postupku izdvajanja DNA koristio sam enzim proteinaza K (Sigma), koncentracije 20 mg/ml. U analizi određivanja različitih duljina restrikcijskih ulomaka (RFLP), koristio sam tri restrikcijske endonukleaze prikazane u tablici 3.



**Tablica 3.** Početni oligonukleotidi i očekivana veličina odsječaka nakon analize PCR/RFLP

Gen	Oligonukleotidi	Broj ciklusa i temperatura sparivanja	Dužina odsječka	Tip polimorfizma	Restriksijska endonukleaza	Restriksijske sekvence	Dužina dobivenih odsječaka	Literatura
<b>IL 6</b>	Početni oligonukleotidi: 5'- GCA ACT TTG AGT GTG TCA CG-3'	35 ciklusa / 57°C	163 bp	-597 A → C	Fok-1	5'GG ATG(N) <sub>9</sub> ↓3' 3'CC TAC(N) <sub>13</sub> ↑5'	115/48	128
	5'-TGA CGT GAT GGA TGC AAC AC-3'	35 ciklusa /57°C	163 bp	-572 G → C	BsrB-1	5'CCG↓CTC3	101/62	128
<b>TGF-β1</b>	A. 5'-CTC CGG GCT GCG GCT GCT GCT-3'	40 ciklusa/ 62°C	346 bp	29 T → C				131
	B. 5'-CTC CGG GCT GCG GCT GCT GCC-3'	40 ciklusa / 62°C						
	C. 5' -GTT GTG GGT TTC CAC CAT TAG-3'							
<b>TNF- α1</b>	Početni oligonukleotidi: 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'	35 ciklusa / 57°C	107 bp	-308 G → A	Nco-1	5' C↓CA TGG3'	42/65	123
	5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3'							

#### *8.7.1.11. Priprema 1% i 2% gelova agaroze*

1% gel agaroze pripremio sam vaganjem 0,6 g agaroze koju sam prenio u tikvicu i dodao 60 ml pufera 1xTAE. Za pripremu 2% gela koristio sam 1,2 g agaroze u istom volumenu. Otapanje agaroze pospješio sam zagrijavanjem do točke ključanja u mikrovalnoj pećnici, u tekuću agarozu dodao sam 3 µl etidij-bromida (konačna koncentracije 0,5 µg/ml), a potom je ohladio pod mlazom vode uz lagano miješanje do približno 50°C te izlio u prethodno pripremljen kalup kadice sastavnog dijela sustava za elektroforezu Mini-Plus Horizontal Gel Unit HU 10 (Scie-Plas, UK).

#### *8.7.1.12. Priprema 15% gela poliakrilamida*

Izmiješao sam 15 ml 30% otopine poliakrilamida (bisakrilamid (Sigma) i akrilamid (Sigma) u omjeru 1:29), 12 ml destilirane vode i 3 ml pufera TBE. Nakon toga sam dodao 16 µl TEMED i 200 µl APS, otopinu promiješao i ulio između dva stakla sistema za okomitu elektroforezu. U tako napunjen sistem postavio sam češalj, pomoću kojeg će se tijekom polimerizacije gela, tijekom jednog do dva sata, formirati jažice.

### **8.7.2. Postupci u analizi polimorfizama u genomskoj DNA**

#### *8.7.2.1. Izdvajanje DNA iz stanica pune krvi*

Na 5 ml pune krvi dodao sam 5 ml sterilne deionizirane vode i 50 µl 1% deterđenta NP-40. Nakon miješanja, uzorak sam ostavio na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta i zatim centrifugirao na 7 000 rpm tijekom 5 minuta (Eppendorf 5415 C) Supernatant sam odvojio, a na zaostali talog ponovno dodao sterilnu deioniziranu vodu i postupak ponovio još dva puta. Na talog sam dodao 800 µl pufera za digestiju i proteinazu K u konačnoj koncentraciji 100 µg/mL. Uzorak sam inkubirao na 37°C, preko noći, uz stalnu trešnju.

Nakon toga sam uzorak razdijelio u dvije mikroeprovete volumena 2 ml te dodao jednak volumen fenola nadsvođenog s Tris. Mikroeprovete sam pričvrstio na kružnu ploču (Rotex), na kojoj se mješavina lagano miješala tijekom narednih 10 minuta, a zatim centrifugirao na 10 000 rpm tijekom 10 minuta, što je omogućilo razdvajanje vodene i fenolne faze. Odvojio sam gornju, vodenu fazu i prenio je u novu mikroeprovetu. Dodao sam jednak volumen mješavine fenol-kloroform (1:1) te ponovio postupak miješanja i centrifugiranja. Ponovo sam odvojio gornju, vodenu fazu kojoj sam dodao jednak volumen kloroforma.

Nakon ponovnog miješanja, gornjoj, vodenoj fazi, dodao sam dva i pol volumena apsolutnog etanola ohlađenog na -20°C i uzorke stavio na precipitaciju tijekom noći na -20°C kako bi se DNA istaložila. Slijedeći sam dan odvojio DNA centrifugiranjem na 14 000 rpm tijekom 20 minuta. Iz epruvete sam uklonio alkohol a na istaloženu DNA dodao, ovisno o zaostalom talogu, 50-200 µl pufera TE. Otpoljenu DNA pohranio sam na +4°C.

Količinu DNA odredio sam spektrofotometrijski na valnoj duljini od 260 nm. Pri izračunavanju koncentracije koristio sam formulu:  $\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{razrjeđenje} \times 50$ . Kvalitetu DNA provjerio sam elektroforezom u 1% gelu agaroze.

#### *8.7.2.2 Lančana reakcije polimeraze*

Koristeći 100 ng DNA izdvojene iz stanica pune krvi umnažao sam odsječke gena za interleukin 6 , tumor nekrotizirajući čimbenik alfa tipa 1 i transformirajući čimbenik rasta beta tipa 1.

Reakcijska smjesa volumena 25 µl sastojala se od:

- početni oligonukleotidi: 10 pmola (konačna koncentracije: 400 nM);
- Taq polimeraza: 0,625 jedinica;

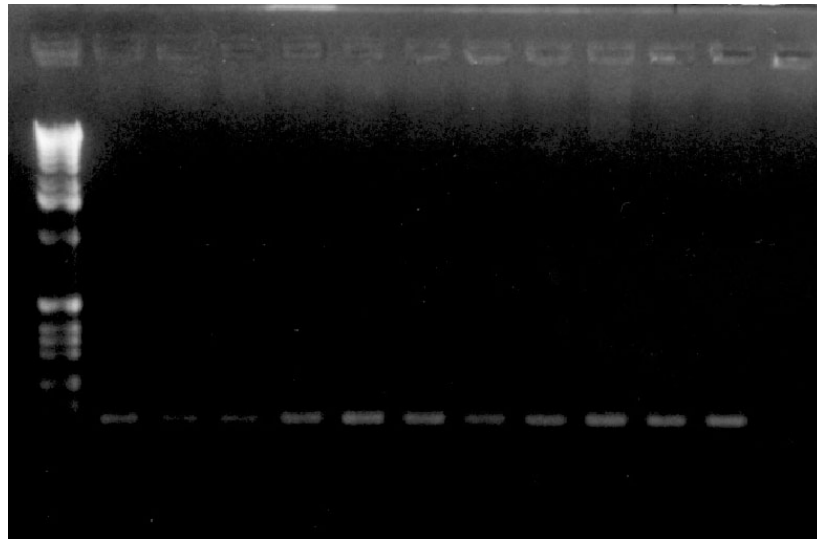
- 8  $\mu$ l Taq Master Mix;
- sterilna deionizirana voda do 25  $\mu$ l;

Za izvođenje reakcija koristio sam aparat PerkinElmer GeneAmp PCR System 2400. Pojedinačni ciklusi umnažanja i temperatura sparivanja početnih oligonukleotida prikazani su u tablici 4.

#### 8.7.2.3. *Provjera uspješnosti umnažanja lančane reakcije polimerazom*

Uspješnost reakcija umnažanja provjeravao sam u 2% gelu agaroze pripremljenom u puferu 1xTAE uz prisustvo DNA standarda X (slika 7).

U jažice gela nanašao sam po 6  $\mu$ l uzorka PCR pomiješanog s 1  $\mu$ l pufera za nanošenje. Elektroforeze su trajale približno 30 minuta pri naponu od 130 V. Gelove u kojima su vidljivi odsječci DNA, pogledao sam pod UV-svjetlom transiluminatora. Fotografirao filmom Polaroid tipa 667.



**Slika 10.** Primjer provjere uspješnosti umnažanja lančane reakcije polimeraze u 2% gelu agaroze.

#### 8.7.2.4. Analiza polimorfizama u genima IL -6 i TNF- $\alpha$ 1 metodom RFLP

Za određivanje postojanja poznatih polimorfizama u genima I -6 i TNF- $\alpha$ 1 koristio sam metodu RFLP. Koristio sam poznate odsječke i restrikcijske endonukleaze (tablica 3).

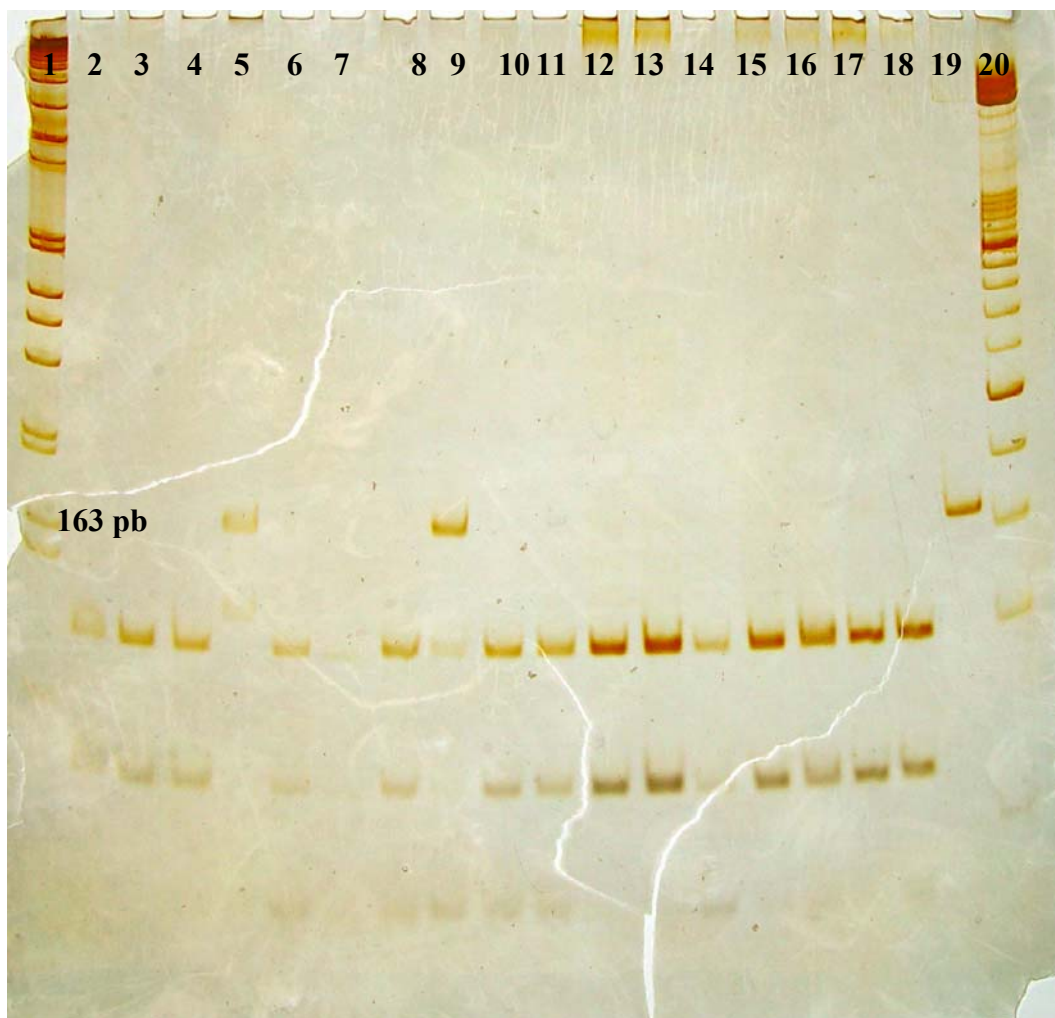
U mikroeprevetu Eppendorf volumena 1,5 ml stavio sam 2,5  $\mu$ l pufera za restrikciju, 400 ng DNA umnožene u PCR, i po 20 U restrikcijske endonukleaze. Volumen sam, do 25  $\mu$ l, nadopunio sterilnom deioniziranom vodom. Nakon inkubacije, koja se odvijala preko noći na temperaturi od 37°C u mješalici, u smjesu sam dodao 3  $\mu$ l pufera za nanošenje i uzorke pohranio na +4°C.

Veličinu dobivenih odsječaka provjeravao sam u 15 % gelu. U jažice 15% gela poliakrilamida nanosio sam 15  $\mu$ l uzorka, uz obavezno nanašanje 50 ng standarda DNA poznatih veličina odsječaka (standardi: V, X i XIII). Srednje vrijeme trajanja elektroforeze bilo je 2-3 sata na 300 V. Po završetku elektroforeze, gel sam odvojio od stakla i fiksirao u 10% alkoholu tijekom 10-15 minuta.

Nakon toga sam ga bojao srebrom. Bojanje se sastoji od tri osnovna koraka: oksidacije, vezanja srebra i razvijanja slike redukcijom srebra. Gel sam fiksirao u 10% EtOH tijekom 20 minuta. Nakon uklanjanja etanola, uronio sam gel u 1% otopinu dušične kiseline, tri do pet minuta uz stalnu trešnju. Nakon toga sam ga isprao u destiliranoj vodi (2 -3 puta). Dodao sam 0,2 % otopinu srebra (AgNO<sub>3</sub>) u kojoj je gel bio narednih 20 do 30 minuta. Ponovno sam ga ispirao u destiliranoj vodi. Konačno, na gel sam dodao hladni razvijач (+ 4°C). Pri najmanjoj pojavi zamućenja, uklanjao sam

razvijač i dodavao novi. Razvijanje “slike” trajalo je približno 15-20 minuta. Reakciju sam zaustavio dodavanjem 5% octene kiseline.

Analiza reakcije cijepanja je učinjena nakon elektroforeze odsječaka u nenedenaturirajućem gelu poliakrilamida i bojenja gela otopinom srebro-nitrata. Ovisno o prisutnosti određenog nukleotida, moguća su tri ishoda reakcije cijepanja restriksijskim endonukleazama: a) niti jedan alel ne posjeduje restriksijsko mjesto (necijepani homozigot), a na 15% poliakrilamida gelu se prikazuje samo PCR odsječak; b) oba alela posjeduju restriksijsko mjesto (cijepani homozigot), na 15% poliakrilamida gelu se ne prikazuje PCR odsječak, već cijepana oba alela; c) jedan alel posjeduje, a drugi ne posjeduje restriksijsko mjesto (heterozigot), na 15% poliakrilamida gelu se prikazuje uz PCR odsječak jednog alela, te cijepane odsječke drugog alela (slika 11).

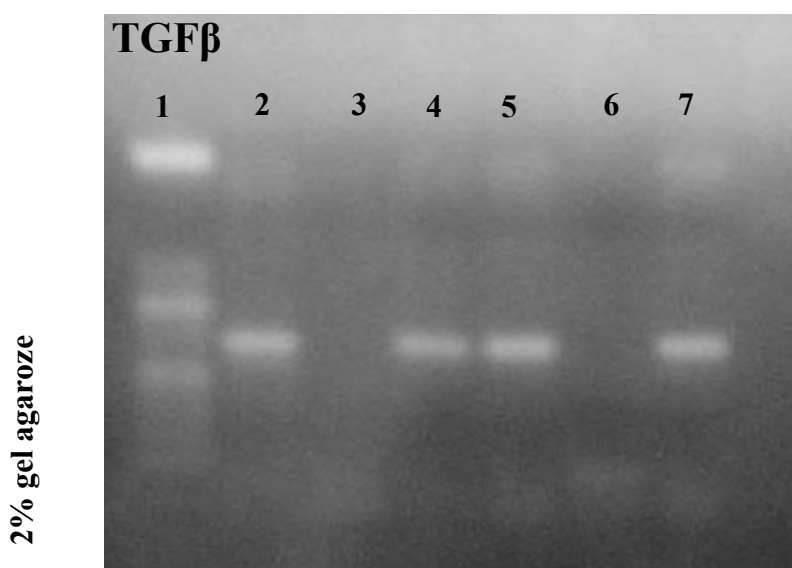


**Slika 11.** Primjer analize polimorfizama u genu *IL-6* metodom RFLP u 17 bolesnika (linija 2-19); gen *IL-6*, veličina odsječka 163bp; restrikcijska endonukleaza BsrB-1. Linija 1: standard DNA V; Linija 9: heterozigot tipa GC ; Linija10 -18: homozigot tipa CC ; Linija 19: homozigot tipa GG ; Linija 20: standard DNA X.

#### 8.7.2.5. Analiza polimorfizma u genu *TGF-β1* metodom PCR

Polimorfizam kodirajućeg područja 29 *TGF-β1* ne stvara odnosno ne briše restrikcijsko mjesto. Stoga se ovaj polimorfizam otkriva korištenjem početnih oligonukleotida čija zadnja veza na 3' kraju "pokriva" polimorfno mjesto (tablica 3). U

ovom slučaju, polimorfni nukleotidi u genomskoj DNA su A i G. Stoga su početni nukleotidi konstruirani tako da se na njihovim 3' krajevima nalaze nukleotidi T i C. Ako se amplifikat dobije s obadva uzvodna početna oligonukleotida, osoba se smatra heterozigotom. Ako se amplifikat dobije samo s početnim oligonukleotidom "A", onda je osoba homozigot tipa A/A. Ako se amplifikat dobije samo s početnim oligonukleotidom "B", onda je osoba homozigot tipa G/G (slika 12).



**Slika 12.** Primjer analize polimorfizma u genu *TGF-β1* metodom PCR napravljena u tri bolesnika. Gen *TGF-β1*; veličina odsječka 346bp. Linija 1: standard DNA XIII; Prvi ispitanik je homozigot tipa AA (linija 2 je kombinacija oligonukleotida A/C, a linija 3 je kombinacija oligonukleotida B/C i amplifikat nije prisutan). Drugi ispitanik je heterozigot tipa A/G (linija 4 je kombinacija oligonukleotida A/C, a linija 5 je kombinacija oligonukleotida B/C). Treći ispitanik je homozigot tipa GG (linija 6 je kombinacija oligonukleotida A i C i amplifikat nije prisutan, a linija 7 je kombinacija oligonukleotida B/C).



## **9. STATISTIČKA ANALIZA**

Svi ishodi, mjereni u ovom istraživanju, sažeto su prikazani odgovarajućim metodama opisne statistike. Učestalost pojedinih polimorfizama prikazana je kao distribucija frekvencija. Svaka endoproteza smatrana je nezavisnim slučajem (30).

### **9.1. Primarni ishod**

#### ***9.1.1. Opisna metoda***

Za opis primarnog ishoda konstruirana je “tablica života“ (“life table“). U tu svrhu, podaci o vremenu proteklom od ugradnje endoproteze razvrstani su kao cenzurirani (“censored data“) ili kao događaj (“failure data“). Cenzuriranima su smatrani podaci gdje, tijekom vremena praćenja, nije dijagnosticirana aseptička nestabilnost endoproteze, tj. gdje je “zaključnom evaluacijom“ potvrđen izostanak znakova aseptičke nestabilnosti (tzv. lijevo cenzurirani podaci, “left censored“), a proteklo vrijeme je vrijeme od ugradnje endoproteze do “zaključne evaluacije“. Događajem su smatrani podaci gdje je, tijekom praćenja ili tijekom “zaključne evaluacije“, postavljena dijagnoza aseptičke nestabilnosti endoproteze, a proteklo vrijeme je vrijeme od ugradnje endoproteze do dijagnoze aseptičke nestabilnosti.

#### ***9.1.2. Analiza primarnog ishoda***

Primaran ishod analiziran je Cox regresijskom metodom. Analiza primarnog ishoda provedena je u dva stadija – kao primarna analiza i kao sekundarna analiza.

##### ***9.1.2.1. Primarna analiza***

Svrha primarne analize primarnog ishoda bila je procjena mogućeg utjecaja polimorfizma (genotipova) na svakom od analiziranih položaja, uz “kontrolu“ utjecaja preostalih položaja te utjecaja drugih čimbenika, za koje postojeći literaturni navodi

ukazuju na važnost u “preživljenju“ totalne endoproteze zgloba kuka do aseptičke nestabilnosti. Stoga su kao nezavisni čimbenici (prediktori), u ovaj regresijski model, koji je označen kao glavni model, uključeni sljedeći čimbenici: a) genotipovi na 4 analizirana položaja, od kojih svaki predstavlja po jedan “nezavisni čimbenik“, a svaki ima 3 razine: GG, GA ili AA na položaju –597 u promotor području gena *IL-6*; GG, GC ili CC na položaju –572 u promotor području gena *IL-6*; GG, GA ili AA na položaju –308 u promotor području gena *TNF- $\alpha$ 1* i TT, TC ili CC na položaju 29 u kodirajućem području gena *TGF- $\beta$ 1*; b) dob ispitanika u vrijeme ugradnje endoproteze. Ovaj čimbenik tretiran je kao dihotomna varijabla (<46 ili  $\geq$ 46 godina), sukladno literaturnim podacima o mogućem utjecaju dobi na “preživljenje” endoproteze, gdje je upravo dob od 46 godina naznačena kao “granična” vrijednost (57,58); c) razlog koji je doveo do ugradnje endoproteze. Ovaj čimbenik tretiran je kao dihotomna varijabla (DDH ili drugi uzrok), sukladno literaturnim podacima da “preživljenje” endoproteze ugrađene zbog posljedica razvojnih poremećaja zgloba kuka (DDH) može biti drugačije, nego kada se radi o drugim razlozima (45); d) inklinacijski kut acetabuluma postignut operacijom. Ovaj čimbenik tretiran je kao dihotomna varijable (kut “dobar” tj. od 41 do 49 stupnjeva, ili “loš” - u svim ostalim slučajevima), sukladno literaturnim podacima da “loš” inklinacijski kut može nepovoljno utjecati na “preživljenje” endoproteze (61,62,63); e) spol (muški ili ženski), sukladno literaturnim podacima da spol može utjecati na “preživljenje” endoproteze (15); f) indeks tjelesne mase (BMI). Ovaj čimbenik je tretiran kao dihotomna varijabla (<26 ili  $\geq$ 26), sukladno literaturnim podacima da visok indeks tjelesne mase (>25) može nepovoljno utjecati na “preživljenje” endoproteze (59).

### 9.1.2.2. Sekundarna analiza

S obzirom da je broj nezavisnih varijabli u glavnom modelu razmjerno velik, a analizirana skupina razmjerno mala, što može narušiti sposobnost modela da “otkrije” možda i relevantne utjecaje pojedinih nezavisnih varijabli, u sekundarnoj analizi konstruirano je 5 “alternativnih” modela s manjim brojem nezavisnih varijabli.

#### **Model 1**

Pri konstrukciji ovog modela vodili smo se načelom da se oni “prediktori” koji zanemarivo malo, tj. <1%, doprinose objašnjenju varijabilnosti zavisne varijable, mogu isključiti iz modela. Stupanj “doprinosa” objašnjenju varijabilnosti zavisne varijable ocijenjen je na temelju promjene vrijednosti  $R^2$ , koju “inducira” uključenje varijable u model (iz regresijske analize) – granična vrijednost  $R^2 = 0,01$ . Početni model u ovom postupku bio je glavni model. U njemu je jedino varijabla, “inklinacijski kut” imala promjenu  $R^2 < 0,01$  te je isključena iz modela. U novonastalom modelu, varijabla “spol” imala je promjenu  $R^2$  manju od 0,01 pa je i ona isključena iz analize. Na taj su način i po navedenom kriteriju, iz sukcesivnih modela isključene, redom, i varijable “osnovna bolest” i “indeks tjelesne mase”. Dobiven je model s 5 nezavisnih varijabli - dob u vrijeme operacije (<46 godina ili  $\geq 46$  godina), gen *TNF- $\alpha$ 1* položaj -308, gen *TGF- $\beta$ 1* položaj 29, gen *IL-6* položaj -597 i gen *IL-6* položaj -572, gdje je svaka nezavisna varijabla imala vrijednost promjene  $R^2 \geq 0,01$ .

#### **Model 2**

U literaturi o polimorfizmu **TGF- $\beta$ 1** (29T→C), povezanost s određenim ishodima nerijetko je izražena za T/T genotip u odnosu na genotipove koji uključuju C-

alel (T/C i C/C, tzv. C-allele carriage) (131). Stoga je oformljen model sa svim istim nezavisnim varijablama kao i glavni model, s tom razlikom da su genotipovi na položaju 29 *TGF-β1* svrstani u dvije kategorije: jednu čini genotip T/T, a drugu genotipovi T/C i C/C (C-allele carriage).

### **Model 3**

U promotorskom području *IL-6* više je polimorfnih položaja (vidi: Uvod). Određena kombinacija genotipova na trima od tih položaja (položaji -597, -572, -174, genotipovi G/G-G/G-G/G), u odnosu na sve druge kombinacije, združena je sa smanjenim rizikom odbacivanja bubrežnog transplantata (172). Stoga je za ovaj model planirano da sadrži sve iste nezavisne varijable kao i glavni model, s tom razlikom da umjesto varijabli “*IL-6* položaj -597“ i “*IL-6* položaj -572“ sadrži jednu varijablu – “kombinacija genotipova na položajima -597 / -572“ – koja bi imala dvije razine: jedna bi bila najčešća kombinacija genotipova, a druga sve ostale kombinacije.

### **Model 4**

Ovaj je model zamišljen kao kombinacija Modela 2 i Modela 3: nezavisne varijable su jednake kao u glavnom modelu, s tim da uključuje varijablu “kombinacija genotipova -597 / -572 u genu *IL-6*“ s dvije razine i varijablu “*TGF-β1* položaj 29“ s dvije razine.

### **Model 5**

Ovaj model je kombinacija modela 1, 2 i 3, tj. razlikuje se od glavnog modela utoliko što sadrži nezavisnu varijablu “*IL-6* kombinacija genotipova -597/-572“ (umjesto

dvaju varijabli za ta dva položaja) s dvije razine: najčešća kombinacija i ostale kombinacije; varijabla “*TGF-β1* položaj 29“ ima dvije, umjesto tri razine, a ostale nezavisne varijable su “*TNF-α1* položaj -308“ i “dob u vrijeme operacije“.

## 9.2. Sekundarni ishod

Istraživanje moguće združenosti pojedinih genotipova na analiziranim polimorfnim položajima i razvojnog poremećaja zgloba kuka označeno je kao sekundarni cilj, tj. kao posve preliminarno istraživanje (ili “proof of the concept“ istraživanje). Željeli smo ispitati moguću združenost genotipova na svakom pojedinom od istraživanih položaja, uz kontrolu za “učinak“ preostalih položaja i spol, budući da je spol jedini jasno definiran faktor rizika za nastanak razvojnog poremećaja kuka. Stoga smo za analizu koristili binarnu logističku regresiju, gdje je zavisna varijabla bila prisustvo DDH (da ili ne), a genotipovi na 4 istraživana položaja i spol su tretirani kao nezavisne varijable (prediktori). Konstruirana su 3 alternativna modela.

Istraživanje združenosti SNP na određenom položaju i neke bolesti podrazumijeva da se na dovoljno velikom i reprezentativnom uzorku “opće zdrave populacije” odredi “pojavnost” istraživanog polimorizma, odnosno prevalencija mogućih genotipova ili pak prevalencija određenog alela – tzv. “pozadinska” ili background prevalencija. Tipično, najzastupljeniji genotip (npr. 1 od 3 moguća), ili prisustvo ili odsustvo određenog alela (“prisutan” ili “odsutan”) definiraju se tada kao “referentna vrijednost”. Zatim se kroz usporedbu prevalencije određenog genotipa, ili prisustva ili odsustva određenog alela između “zdravih” i “bolesnih” ispitanika zaključuje od združenosti bolesti i određenog genotipa ili određenog alela. U ovom preliminarnom istraživanju skupina “zdravih” ispitanika je mala, tj. nedovoljno velika za

pouzdanu određivanje “pozadinske” prevalencije određenih genotipova (ili prisustva/odsustva određenih alela) na istraživanim položajima. Posljedično, nije bilo moguće za pojedini položaj odrediti jedan “referentni genotip” ili “referentno prisustvo alela”, već je analizirano više inačica modela gdje je svaki put, kao “referentna vrijednost” na nekom položaju, određen drugi genotip.

### **Model 1**

Nezavisne varijable u ovom modelu bile su “spol”, te “*IL-6* položaj -597“, “*IL-6* položaj -572“, “*TNF- $\alpha$ 1* položaj -308“ i “*TGF- $\beta$ 1* položaj 29“, svaki s po tri razine. U prvoj “inačici“, kao referentne vrijednosti za svaki od položaja, planirani su “netrazicijski homozigotni genotipovi“, a u drugoj – “tranzicijski homozigotni genotipovi“.

### **Model 2**

Nezavisne varijable u ovom modelu bile su “spol”, te “kombinacija genotipova *IL-6* položaj -597 / -572“ s dvije razine (“najčešća kombinacija“ nasuprot “svih ostalih kombinacija“), i “*TNF- $\alpha$ 1* položaj -308“ i “*TGF- $\beta$ 1* položaj 29“, svaki s po tri razine. U prvoj “inačici“, kao referentne vrijednosti za “*TNF- $\alpha$ 1* položaj -308“ i “*TGF- $\beta$ 1* položaj 29“, planirani su “netranzicijski homozigotni genotipovi“, a u drugoj – “tranzicijski homozigotni genotipovi“.

### **Model 3**

U ovom modelu su, uz “spol“, uključene nezavisne varijable “*TNF- $\alpha$ 1* položaj -308“ s 3 razine (3 moguća genotipa), “*TGF- $\beta$ 1* položaj 29“ s dvije razine – genotip T/T

ili genotip koji uključuje C-alel (T/C ili C/C, C-allele carriage) te varijabla “kombinacija genotipova na položajima -597 i -572 u promotorskom području *IL-6*“ sa dvije razine: “najčešća kombinacija“ i “sve ostale kombinacije”. U prvoj “inačici” modela, kao “referenti” genotip na položaju -308 u promotorskom području *TNF- $\alpha$ 1*, određen je genotip G/G, a u drugoj “inačici” genotip A/A.

Za statističku analizu rabljen je komercijalno dostupan računalni program NCSS 2005 (NCSS, Kaysvile, UT, SAD)

## 10. REZULTATI

Rezultati su prikazani odvojeno za primarni cilj, tj. ocjenu združenosti “preživljenja” totalnih endoproteza kuka do pojave aseptičke nestabilnosti i polimorfizama u analiziranih gena, i za sekundarni cilj, tj. ocjenu združenosti razvojne displazije zgloba kuka (DDH, od engl. developmental dysplasia of the hip) i polimorfizama u analiziranih gena.

### **10.1. “Preživljenje“ totalnih endoproteza kuka do pojave aseptičke nestabilnosti i polimorfizmi analiziranih gena: TGF- $\beta$ 1 položaj 29, TNF- $\alpha$ 1 položaj -308 te IL-6 na položajima -597 i -572**

#### ***10.1.1 . Opća svojstva ispitanika i analiziranih endoproteza kuka***

Glavna svojstva ispitanika i analiziranih endoproteza zgloba kuka sažeta su u tablici 4. U istraživanje je uključen 41 ispitanik (ukupno 45 totalnih endoproteza -dva muškarca i dvije žene imali su obostrane endoproteze). Kako je navedeno u odsječku Ispitanici i metode, sve su proteze bile istog tipa, sačinjene od istih materijala, a ugradio ih je isti operater. U vrijeme ugradnje endoproteze ispitanici su bili u dobi od 26 do 58 godina, pri čemu su samo jedan muškarac (58 godina) i jedna žena (57 godina) bili stariji od 55 godina. Ukupno, 27/45 endoproteza ugrađeno je osobama mlađim od 46 godina, a glavni razlog za ugradnju endoproteze bile su posljedice razvojnih poremećaja zgloba kuka (tablica 4). Vrijeme praćenja bolesnika/endoproteza (vrijeme od ugradnje do pojave aseptičke nestabilnosti ili do “zadnje evaluacije” u prosincu 2003. godine, ovisno koji događaj je prvi uslijedio) iznosilo je od 5 do 18 godina (medijan 15 godina). Tijekom tog vremenskog perioda, aseptička nestabilnost uočena je kod 22/45 endoproteza (stopa događaja 48,9%). U svim slučajevima radilo se o nestabilnosti



polietilenskog acetabularnog dijela proteze, a u 7 slučajeva uočena je i istodobna nestabilnost femoralnog dijela proteze (tablica 4). U skladu s kriterijima uključivanja u studiju, nije bilo drugih uzroka nestabilnosti endoproteze.

**Tablica 4.** Glavna svojstva ispitanika i analiziranih endoproteza zgloba kuka. Ukoliko nije drugačije naznačeno, vrijednosti u tablici su brojevi, aritmetičke sredine  $\pm$  standardna devijacija, odnosno medijani i kvartile.

Broj ispitanika; spol (M/Ž)	41 (13/28)
Broj endoproteza ukupno i po spolu (M/Ž)	45 (15/30)
Dob (godine) u vrijeme operacije (prema kuku)	44,2 $\pm$ 6,7 (raspon 26-58)
Poddioba po dobi u vrijeme operacije (prema kuku):	
< 46 godina	27
$\geq$ 46 godina	18
Postoperativni inklinacijski kut (stupnjevi) (prema kuku)	40 (40-45)
Endoproteze s inklinacijskim kutem 41-49 stupnjeva	17
Indeks tjelesne mase u vrijeme operacije (prema kuku)	25 (23,5-26,4)
Razdioba vrijednosti indeksa tjelesne mase: do 25	24
26-30	18
>30	3
Razlozi za artroplastiku kuka (prema kuku):	
- koksartroza zbog razvojnog poremećaja zgloba kuka	31
- idiopatska aseptička nekroza glave bedrene kosti	6
- trauma (lom, epifizeoliza)	4
- Morbus Bechterew	4
Vrijeme praćenja (godine) (prema kuku)	15
	(raspon 5-18)
Broj endoproteza kod kojih je nastala aseptička nestabilnost	22
Aseptička nestabilnost samo acetabularnog dijela	15
Aseptička nestabilnost i acetabularnog i femoralnog dijela	7

### ***10.1.2. “Preživljenje” endoproteza zgloba kuka i polimorfizmi u analiziranim genima – opisni podaci***

Podaci o vremenu, proteklom od ugradnje proteze do pojave aseptičke nestabilnosti (ili “zadnje evaluacije”, ovisno koji je događaj uslijedio prvi), sažeti su temeljem analize “tablice života” (engl. life-table analysis) (tablica 5). Vrijeme proteklo od operacije prikazano je u obliku jednogodišnjih intervala, sukladno tipičnim vremenskim razmacima kontrolnih pregleda. Prikazan je broj endoproteza koje su na početku svakog takvog intervala bile “izložene riziku”, tj. još uvijek su bile u postupku praćenja, broj endoproteza za koje je u predmetnom intervalu ustanovljena aseptička nestabilnost (nestabilne), broj endoproteza za koje je u predmetnom intervalu izvršena “zadnja evaluacija” i ocijenjene su stabilnima (cenzurirane), te kumulativno “preživljenje” endoproteza do predmetnog intervala, odnosno kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti u tom intervalu s 95% granicama pouzdanosti (GP) (tablica 5).

Na početku 5. godine postoperativnog razdoblja (interval 4 do 5 godina), svih 45 endoproteza još je uvijek bilo stabilno, kumulativno preživljenje iznosilo je 100%, a tijekom predmetnog intervala niti za jednu protezu nije ustanovljena aseptička nestabilnost, niti je ijedna “cenzurirana”. Kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti bio je 0. Prva endoproteza za koju je ustanovljena aseptička nestabilnost uočena je u sljedećem jednogodišnjem intervalu, tj. nakon što je proteklo  $>5$ , a  $<6$  godina postoperativnog praćenja (tablica 5). U 10. godinu postoperativnog praćenja (interval 9 do 10 godina) “ušlo” je 43 proteze (dvije su u prethodnim razdobljima ocijenjene kao nestabilne), pa je do početka tog razdoblja kumulativno preživljenje iznosilo 95,6%.

Tijekom predmetnog intervala niti jedna endoproteza nije “cenzurirana”, a za dvije je ustanovljena aseptička nestabilnost pa je kumulativni rizik aseptičke

nestabilnosti u 10. godini praćenja iznosio 0,091 ili 9,1% (tablica 5). U 15. godinu postoperativnog praćenja (interval 14 do 15 godina) “ušlo” je 29 endoproteza (za ostale je u prethodnim razdobljima ili ustanovljena aseptička nestabilnost ili su “cenzurirane”), a kumulativno preživljenje iznosilo je 66,6%. Tijekom predmetnog intervala aseptička nestabilnost ustanovljena je za jednu protezu, a pet ih je “cenzurirano”. Kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti iznosio je 0,429.

**Tablica 5.** “Tablica života” za 45 praćenih endoproteza zgloba kuka.

Nakon operacije (godine)	Izložene riziku (n)	Nestabilne (n)	Cenzurirane (n)	Kumulativno preživljenje	Kumulativni rizik (95% GP)
0 do 1	45	0	0	1	0
1 do 2	45	0	0	1	0
2 do 3	45	0	0	1	0
3 do 4	45	0	0	1	0
4 do 5	45	0	0	1	0
5 do 6	45	1	0	1	0,022 (0,003 do 0,158)
6 do 7	44	0	0	0,978	0,022 (0,003 do 0,158)
7 do 8	44	1	0	0,978	0,045 (0,011 do 0,180)
8 do 9	43	0	0	0,956	0,045 (0,011 do 0,180)
9 do 10	43	2	0	0,956	0,091 (0,034 do 0,244)
10 do 11	41	3	0	0,911	0,165 (0,078 do 0,345)
11 do 12	38	1	0	0,844	0,191 (0,095 do 0,382)
12 do 13	37	4	0	0,822	0,299 (0,170 do 0,527)
13 do 14	33	3	1	0,733	0,391 (0,235 do 0,651)
14 do 15	29	1	5	0,666	0,429 (0,262 do 0,704)
15 do 16	23	2	5	0,641	0,527 (0,326 do 0,850)
16 do 17	16	1	2	0,578	0,593 (0,368 do 0,957)
17 do 18	13	1	8	0,539	0,704 (0,424 do 1,170)
18 +	4	2	2	0,480	1,371 (0,666 do 2,842)

Vrijeme proteklo od operacije prikazano je u vidu jednogodišnjih intervala, sukladno razmacima kontrolnih pregleda; Izložene riziku= proteze koje “ulaze” u predmetni interval (nisu prethodno “cenzurirane” i nije uočena aseptička nestabilnost); Nestabilne= proteze za koje je u predmetnom intervalu utvrđena aseptička nestabilnost; Cenzurirane= proteze za koje je u predmetnom intervalu izvršena “zadnja evaluacija” i ocijenjene su stabilnima. GP= granice pouzdanosti.

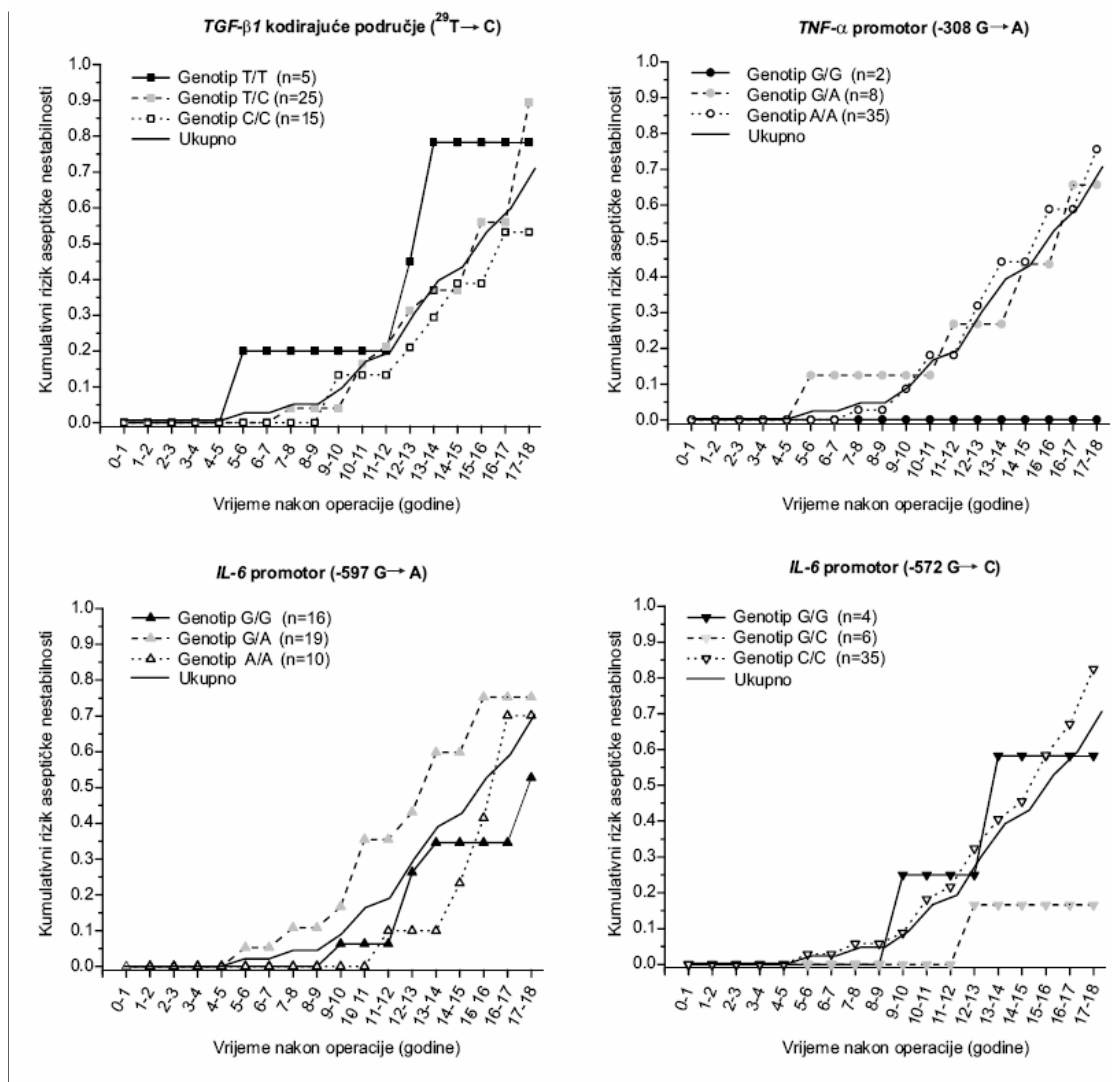
Najčešći genotip na položaju 29 u kodonu *TGF-β1* bio je T/C, najčešći genotip na položaju -308 u promotorskom području *TNF-α1* je bio A/A, najčešći genotip na položaju -597 u promotorskom području *IL-6* je bio G/A, a najčešći genotip na položaju -572 u promotorskom području *IL-6* je bio C/C (Tablica 6).

**Tablica 6.** Poddioba ispitanika i endoproteza prema genotipu na 4 analizirana položaja.

Položaj /Genotip	Ispitanici (N= 41)	Endoproteze (N=45)
<i>TGF-β1</i> 29 (T→C)		
T/T	5	5
T/C	23	25
C/C	13	15
<i>TNF-α1</i> -308 (G→A)		
G/G	2	2
G/A	8	8
A/A	31	35
<i>IL-6</i> -597 (G→A)		
G/G	14	16
G/A	18	19
A/A	9	10
<i>IL-6</i> -572 (G→C)		
G/G	3	4
G/C	6	6
C/C	32	35

Kako je naznačeno na slici 13, kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti (iz analize “tablice života”) tijekom vremena praćenja donekle se razlikovao za ispitanike/endoproteze s različitim genotipovima na pojedinim položajima. Primjerice, s obzirom na položaj *TGF-β1* (29T→C), kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti je s

vremenom, nakon operacije nešto brže rastao uz genotip T/T nego uz druga dva genotipa na tom položaju (slika 13). Što se tiče položaja *TNF- $\alpha$ 1* -308 (G→A), kumulativni rizik uz genotipove G/A i A/A bio je podjednak, dok je uz genotip G/G kontinuirano iznosio 0 –, no samo 2 ispitanika (2 endoproteze) su imala taj genotip, te su u oba slučaja endoproteze u 17. postoperativnoj godini, kada je izvršena “zadnja evaluacija”, bile stabilne (“cenzurirane”). Što se tiče položaja -597 u promotorskom području *IL-6*, kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti tijekom vremena praćenja nešto je brže rastao uz genotip G/A nego uz druga dva genotipa na tom položaju (slika 10). Kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti nešto je sporije rastao uz genotip C/C na položaju -572 u promotorskom području *IL-6* nego uz druga dva genotipa na tom položaju (slika 13).



**Slika 13.** Kumulativni rizik (iz analize “tablice života”) aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka prema genotipu na ispitivanim položajima.

### 10.1.3. Procjena združenosti “preživljenja” endoproteze zgloba kuka i genotipova na analiziranim položajima

Za procjenu združenosti “preživljenja” endoproteze kuka i genotipova na analiziranim položajima provedena je Coxova regresijska analiza mjerene (zavisne) varijable – vremena proteklog od postavljanja proteze do pojave aseptičke nestabilnosti

(ili “zadnje evaluacije”, ovisno koji je događaj uslijedio prvi). Iako se u regresijskoj analizi nezavisne varijable nazivaju i “prediktori” (ishoda zavisne varijable), ona ne prejudicira uzročno-posljedičnu vezu između nezavisne i zavisne varijable, već “otkriva” združenost između određenih vrijednosti nezavisne varijable i određenih vrijednosti zavisne varijable. Za tu “združenost” uobičajeno je koristiti izraz “učinak” (effect) (nezavisne na zavisnu varijablu). Regresijska analiza provedena je u dva koraka, kao primarna i sekundarna analiza. U primarnoj su analizi, kao nezavisni čimbenici (“prediktori”), u regresijski model uključeni: a) dob ispitanika u doba operacije. Ovaj čimbenik tretiran je kao dihotomna varijabla ( $<46$  ili  $\geq 46$  godina), sukladno literaturnim podacima o mogućem utjecaju dobi na “preživljenje” endoproteze, gdje je upravo dob od 46 godina naznačena kao “granična” vrijednosti; b) razlog koj je doveo do ugradnje endoproteze. Ovaj čimbenik tretiran je kao dihotomna varijabla (DDH ili drugi uzrok), sukladno literaturnim podacima da “preživljenje” endoproteze, ugrađene zbog posljedica razvojnih poremećaja zgloba kuka (DDH), može biti drugačije nego kada se radi o drugim razlozima; c) inklinacijski kut acetabuluma postignut operacijom. Ovaj čimbenik tretiran je kao dihotomna varijable (kut “dobar”, tj. od 41 do 49 stupnjeva, ili “loš” - u svim ostalim slučajevima), sukladno literaturnim podacima da “loš” inklinacijski kut može nepovoljno utjecati na “preživljenje” endoproteze; d) spol (muški ili ženski), sukladno literaturnim podacima da spol može utjecati na “preživljenje” endoproteze; e) indeks tjelesne mase (BMI). Ovaj se čimbenik tretira kao dihotomna varijabla ( $<26$  ili  $\geq 26$ ), sukladno literaturnim podacima da visok indeks tjelesne mase ( $>25$ ) može nepovoljno utjecati na “preživljenje” endoproteze; f) genotip na svakom od 4 analizirana položaja, što ukupno čini 4 dodatna nezavisna čimbenika, od kojih svaki ima tri “razine” (tri moguća genotipa na svakom položaju). Taj regresijski model označen je kao glavni.



Svrha mu je procijeniti učinak genotipa na pojedinim položajima na “preživljenje” endoproteze kuka uz “korekciju” za učinak ostalih položaja, odnosno za učinak čimbenika koji su u literaturi naznačeni kao mogući važni za preživljenje endoproteze. S obzirom da je broj nezavisnih varijabli u glavnom modelu razmjerno velik, a analizirana skupina razmjerno mala, što može narušiti sposobnost modela u “otkrivanju” učinaka pojedinih nezavisnih varijabli, u sekundarnoj analizi konstruirano je nekoliko “alternativnih” modela s manjim brojem nezavisnih varijabli. Način i kriteriji po kojima su ti modeli oblikovani, objašnjeni su sukcesivno u daljnjem tekstu.

#### *10.1.3.1. Primarna analiza*

Tablica 7 sažima glavne učinke nezavisnih čimbenika na zavisnu varijablu u glavnom regresijskom modelu. To je sažetak tablice analize devijance ili testa omjera vjerojatnosti koji se temelji na  $\chi^2$  statistici, a analogan je analizi (ko)varijance za kontinuirane zavisne varijable s normalnom raspodjelom. U tablici 5 navedena je i vrijednost “promjena R<sup>2</sup>” koja, analogno koeficijentu determinacije (R<sup>2</sup>) u linearnoj regresiji, ilustrira relativni udio pojedine nezavisne varijable u objašnjenju varijabilnosti zavisne varijable.

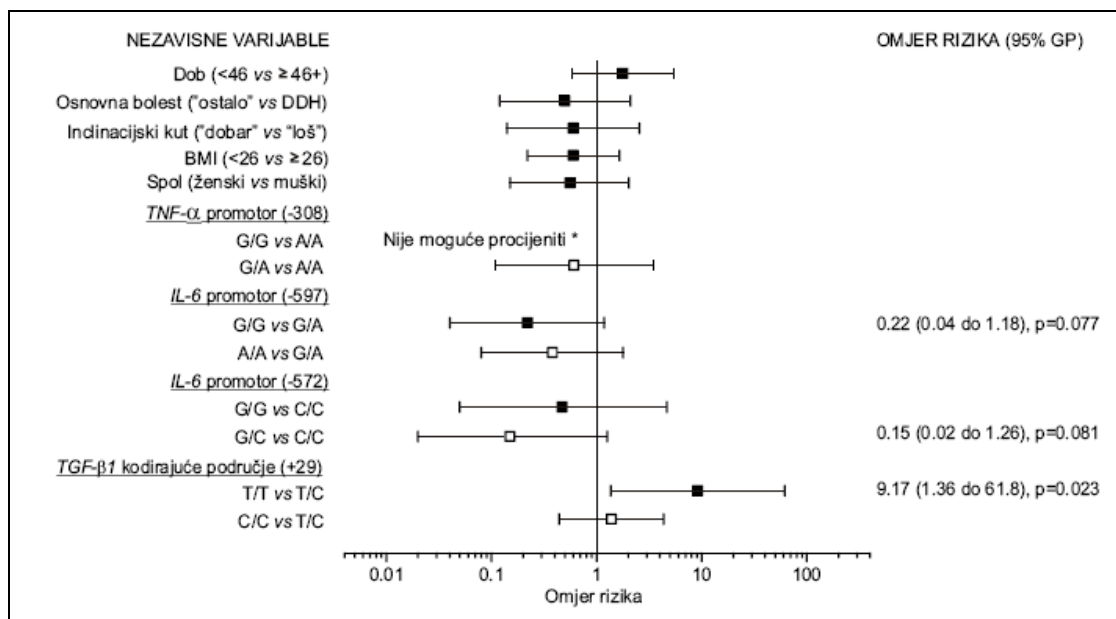
Vrijednost R<sup>2</sup> pokazuje da je glavni model objasnio ukupno 34.6% varijabilnosti zavisne varijable (tablica 7). Prema tim vrijednostima (veća vrijednost = veći “doprinos”), najveći “doprinos” objašnjenju varijabilnosti “vremena do aseptičke nestabilnosti” imao je čimbenik “položaj -308 u promotorskom području *TNF- $\alpha$ 1*” (tablica 7). Učinak ovog čimbenika na zavisnu varijablu bio je statistički značajan na razini alfa 0,05 (p vrijednost= 0.016) (tablica 7). Nezvisni čimbenici “položaj 29 u kodonu *TGF- $\beta$ 1*”, “položaj -597 u promotorskom području *IL-6*” i “položaj -572 u promotorskom području *IL-6*” u manjoj su mjeri doprinijeli objašnjenju varijabilnosti

vremena do aseptičke nestabilnosti endoproteze, a učinci su im, uz “korekciju” za učinke drugih nezavisnih čimbenika, u ovom modelu i u danoj skupini, bili granične statističke značajnosti (p vrijednosti od 0,09 do 0,1) (tablica 7 i slika 14).

**Tablica 7.** Tablica analize devijance tj. testa omjera vjerojatnosti i promjene R2 vrijednosti iz Coxove regresijske analize “preživljenja” endoproteza kuka do aseptičke nestabilnosti u glavnom modelu (N=45)

Nezavisne varijable (ispuštene)	Test omjera vjerojatnosti		
	d.f.	P	Promjena R2
Sve	13	0.121	0,346
Dob u vrijeme operacije (<46 ili ≥46 godina)	1	0.296	0,016
Osnovna bolest (DDH ili “drugo”)	1	0.336	0,014
Inklinacijski kut (“dobar” ili “loš”)	1	0.491	0,007
Spol (muški ili ženski)	1	0.374	0,012
BMI (<26 ili ≥26)	1	0.332	0,014
<i>IL-6</i> promotorsko područje položaj –597	2	0.102	0,070
<i>IL-6</i> promotorsko područje položaj –572	2	0.090	0,074
<i>TGF-β1</i> kodon položaj 29	2	0.093	0,073
<i>TNF-α1</i> promotorsko područje položaj –308	2	0.016	0,132
Niti jedna (model)	13		0,000

DDH = razvojni poremećaj zgloba kuka (od developmental dysplasia of the hip); BMI= indeks tjelesne mase (od body mass index); d.f.= broj stupnjeva slobode (od degrees of freedom).



**Slika 14.** Omjeri rizika (s 95% granicama pouzdanosti, GP) za aseptičku nestabilnost endoproteze zgloba kuka iz Coxove regresijske analize u modelu iz tablice 5. Uz svaku nezavisnu varijablu definirano je koja razina varijable je u brojniku, a koja u nazivniku omjera. Za genske položaje, u nazivniku je uvijek genotip koji je na tom položaju bio najčešći u ovoj skupini ispitanika. Omjeri >1 kazuju da je rizik aseptičke nestabilnosti združen s razinom nezavisne varijable navedenom u brojniku veći od rizika združenog s razinom navedenom u nazivniku, a omjeri <1 imaju obrnuto značenje. Svaka točka= omjer rizika; horizontalne crte= 95% raspon pouzdanosti procjene omjera (raspon između 95% granica pouzdanosti); okomita crta naznačuje omjer rizika koji iznosi 1. Posebno su navedeni statistički značajni ili granično značajni omjeri rizika i pridružene p-vrijednosti.

\* Omjer rizika za genotip G/G u odnosu na genotip A/A na ovom položaju nije bilo moguće procijeniti, budući da su samo dva ispitanika (dvije endoproteze) imala genotip A/A. U oba slučaja proteze su “cenzurirane” u 17. godini praćenja.

Slika 14 prikazuje omjere rizika aseptičke nestabilnosti određene na temelju regresijske analize u modelu iz tablice 8. Omjer rizika (relativni rizik) za nominalne nezavisne varijable govori o relativnoj razlici rizika aseptičke nestabilnosti endoproteze između jedne “razine” nominalne varijable u odnosu na neku referentnu “razinu”. Primjerice, nezavisna varijabla “dob u vrijeme operacije” ima dvije razine, <46 godina ili ≥46 godina. Ako se razina ≥46 godina uzme kao “referentna”, omjer rizika (relativni rizik) od oko 1,8 (Slika 14) kazuje da je rizik aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka kod osoba operiranih u dobi <46 godina bio oko 80% veći nego kod osoba operiranih u dobi ≥46 godina, odnosno na početku svakog vremenskog intervala praćenja (koji je u ovoj studiji iznosio oko godinu dana), rizik da u predmetnom intervalu nastane aseptička nestabilnost endoproteze bio je oko 80% veći za osobe operirane u dobi <46 godina nego za osobe operirane u dobi ≥46 godina. U ovoj skupini ispitanika i u ovom modelu taj učinak dobi na “preživljenje” endoproteze nije bio statistički značajan na razini alfa 0,05 (95% granice pouzdanosti omjera rizika protežu se od 0,6 do 4,0) (slika 14). Kako pokazuje Slika 14, rizik aseptičke nestabilnosti endoproteze bio je od oko 30% do oko 60% manji kada je razlog za endoprotezu bio neko drugo stanje, a ne DDH (u odnosu na DDH), uz “dobar” inklinacijski kut (u odnosu na “loš”), uz indeks tjelesne mase <26 (u odnosu na ≥26) i kod žena (u odnosu na muškarce). U ovoj skupini ispitanika i u ovom modelu, niti jedan od ovih omjera rizika nije bio statistički značajan na razini alfa 0.05 (ilustrirano 95% granicama pouzdanosti koje se za sve navedene omjere rizika protežu od ispod 1 do iznad 1) (slika 14). Za čimbenike - genske položaje “referentna” razina uvijek je bio genotip koji je u analiziranoj skupini bio najčešći (slika 14). Za nezavisnu varijablu “*TNF-α*1 promotorsko područje položaj -308” (p= 0,016 u testu “glavnog učinka”, tablica 7) nije bilo moguće procijeniti omjer rizika za genotip G/G u odnosu na

genotip A/A, a omjer rizika G/A spram A/A iznosio je oko 0,8 i u ovoj skupini ispitanika te u ovom modelu nije bio statistički značajan (slika 14). Za dvije nezavisne varijable, koje se odnose na položaje u promotorskom području IL-6, i za koje su nađeni statistički granično značajni “glavni učinci” (tablica 7), nađeni su i statistički granično značajni omjeri rizika. Na položaju -597 omjer rizika za genotip G/G u odnosu na G/A iznosio je 0,22 (4,5 puta manji rizik aseptičke nestabilnosti združen s G/G genotipom) ( $p=0,077$ ), dok je omjer rizika za genotip A/A u odnosu na G/A iznosio oko 0,35 (slika 11). Na položaju -572, omjer rizika za genotip G/C u odnosu na C/C iznosio je 0,22 (6,5 puta manji rizik) ( $p=0,081$ ), a za genotip G/G u odnosu na G/C iznosio je oko 0,5 (slika 14).

Za nezavisni čimbenik “*TGF- $\beta$ 1* kodon položaj 29”, koji je imao statistički granično značajan “glavni učinak”, uočen je statistički značajan omjer rizika: za genotip T/T u odnosu na T/C iznosio je 9,17 (9,17 puta veći rizik aseptičke nestabilnosti združen s genotipom T/T) ( $p=0,023$ ). Omjer rizika za genotip C/C u odnosu na T/C iznosio je oko 1,3 (slika 14).

Prikazani rezultati ukazali su na sljedeće:

- a) Broj ispitanika relativno je malen u odnosu na broj nezavisnih varijabli u glavnom modelu, što doprinosi činjenici da su pojedini, po opsegu veliki učinci, statistički tek granično značajni ili neznačajni. Primjerice, cjelokupan model ukupno objašnjava oko 35% varijabilnosti “preživljenja” endoproteze kuka, ali nije statistički značajan ( $p=0,121$ ) (tablica 7), a relativne razlike rizika od oko 4-6 puta tek su granično značajne (Slika 14). Prema tome, skupina ove veličine ima premalu “snagu” za toliki broj nezavisnih varijabli.

- b) Poddioba genotipova na položaju -308 u promotorskom području *TNF- $\alpha$*  nažalost je nepovoljna za analizu rizika aseptičke nestabilnosti združenog uz pojedini genotip, no to ne umanjuje činjenicu da je taj položaj, temeljem glavnog učinka vrlo vjerojatno bitan čimbenik za “preživljenje” endoproteze od aseptičke nestabilnosti.
- c) Što se tiče položaja 29 u kodonu *TGF- $\beta$ 1*, činjenica da je glavni učinak statistički granično značajan donekle otežava interpretaciju statistički značajnog omjera rizika za T/T genotip u odnosu na T/C genotip, no izvjesno je da taj nalaz zavrijeđuje pozornost te ukazuje na važnost genotipa na ovom položaju za pojavnost aseptičke nestabilnosti.
- d) Isto vrijedi i za statistički granično značajne učinke i omjere rizika, nađene za položaj -597 i -572 u promotorskom području *IL-6*.

Stoga je provedena sekundarna analiza zavisne varijable u 5 alternativnih regresijskih modela, od kojih je svaki imao manje nezavisnih varijabli od glavnog modela.

#### *10.1.3.2. Sekundarna analiza*

##### **Model 1**

Najmanju vrijednost “promjene R<sup>2</sup>” u glavnom modelu imala je varijabla “inklinacijski kut” - <0,01 (tablica 7). Stoga je ocijenjena praktično nevažnom te je uklonjena iz modela. U novom modelu varijabla “spol” imala je “promjenu R<sup>2</sup>” manju od 0,01 te je i ona isključena iz modela. Na taj su način, po kriteriju promjene R<sup>2</sup> vrijednosti <0,01, iz sukcesivnih modela isključene, redom, i varijable “osnovna bolest” i “indeks tjelesne mase”. Dobiven je model s 5 nezavisnih varijabli: dob u vrijeme

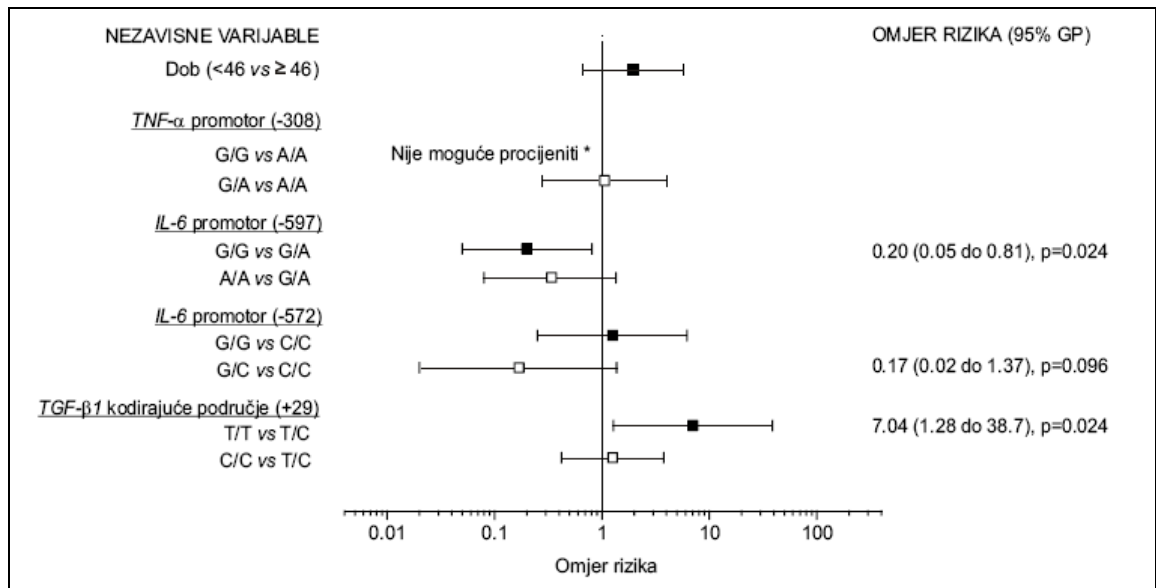
operacije (<46 godina ili ≥46 godina), *TNF-α1* položaj -308, *TGF-β1* položaj 29, *IL-6* položaj -597 i *IL-6* položaj -572.

**Tablica 8.** Tablica analize devijance (test omjera vjerojatnosti) i promjena R2 iz regresijske analize “preživljenja” endoproteza kuka u alternativnom modelu – Model 1 (N=45)

Nezavisne varijable (ispuštene)	Test omjera vjerojatnosti		
	d.f.	P	Promjena R2
Sve	9	0,045	0,318
Dob u vrijeme operacije (<46 ili ≥46 godina)	1	0,209	0,024
<i>IL-6</i> promotorsko područje položaj -597	2	0,033	0,075
<i>IL-6</i> promotorsko područje položaj -572	2	0,078	0,073
<i>TGF-β1</i> kodon položaj 29	2	0,108	0,083
<i>TNF-α1</i> promotorsko područje položaj -308	2	0,014	0,063
Niti jedna (model)	9		0,000

d.f.= broj stupnjeva slobode (od engl. degrees of freedom)

Sve su varijable imale “promjenu R2” >0,01. Model je objasnio 31,8% varijabilnosti zavisne varijable i bio je statistički značajan (p=0,045) (tablica 8). Glavni učinci nezavisnih varijabli “*TNF-α1* -308” i “*IL-6* -597” bili su statistički značajni, a glavni učinci varijabli “*TGF-β1* 29” i “*IL-6* -572” bili su granično statistički značajni (tablica 8), i slični glavnom modelu (tablica 7). Omjeri rizika (slika 15), određeni u odnosu na iste “referentne” vrijednosti kao i u glavnom modelu, bili su kvalitativno i kvantitativno posve slični onima u glavnom modelu (slika 11), s tom razlikom da su u ovom modelu još neki dosegli razinu statističke značajnosti (G/G spram G/A, *IL-6* -597) (slika 15).



Slika 15. Omjeri rizika (s 95% granicama pouzdanosti, GP) za aseptičku nestabilnost endoproteze zgloba kuka iz Coxove regresijske analize u modelu iz tablice 6 (Model 1).

Slika se “čita” na isti način kao i slika 14.

\* Omjer rizika za genotip G/G u odnosu na genotip A/A na ovom položaju nije bilo moguće procijeniti, budući da su samo dva ispitanika (dvije endoproteze) imala genotip A/A. U oba slučaja, proteze su “cenzurirane” u 17. godini praćenja.

## Model 2

U literaturi o polimorfizmu *TGF-β1* (29T→C) povezanost s pojedinim ishodima nerijetko je izražena za T/T genotip u odnosu na genotipove koji uključuju C-alel (T/C i C/C, tzv. C-allele carriage) (130). Stoga je oblikovan model sa potpuno identičnim nezavisnim varijablama kao i glavni model (tablica 7), s tom razlikom da su genotipovi na položaju 29 *TGF-β1* svrstani u dvije kategorije: jednu čini genotip T/T, a drugu genotipovi T/C i C/C (C-allele carriage).

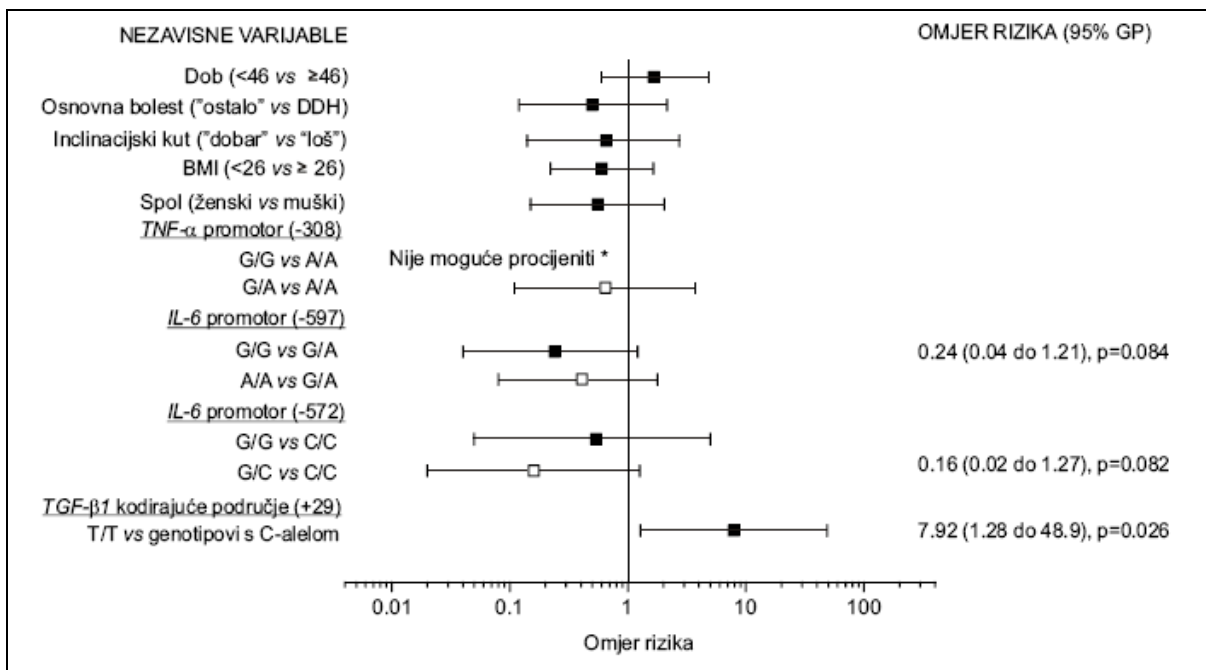


**Tablica 9.** Tablica analize devijance (test omjera vjerojatnosti) i promjena R2 iz regresijske analize “preživljenja” endoproteza kuka u alternativnom modelu – Model 2 (N=45)

Nezavisne varijable (ispuštene)	Test omjera vjerojatnosti		
	d.f.	P	Promjena R2
Sve	12	0,093	0,341
Dob u vrijeme operacije (<46 ili ≥46 godina)	1	0,345	0,022
Osnovna bolest (DDH ili “drugo”)	1	0,354	0,005
Inklinacijski kut (“dobar” ili “loš”)	1	0,563	0,005
Spol (muški ili ženski)	1	0,383	0,008
BMI (<26 ili ≥26)	1	0,342	0,008
<i>IL-6</i> promotorsko područje položaj –597	2	0,116	0,075
<i>IL-6</i> promotorsko područje položaj –572	2	0,093	0,073
<i>TGF-β1</i> kodon položaj 29	1	0,035	0,082
<i>TNF-α1</i> promotorsko područje položaj –308	2	0,018	0,063
Niti jedna (model)	12		0,000

DDH = razvojni poremećaj zgloba kuka (od developmental dysplasia of the hip); BMI= indeks tjelesne mase (od body mass index); d.f.= broj stupnjeva slobode (od degrees of freedom).

Model je objasnio 34,1% varijabilnosti zavisne varijable (slično kao i glavni model) uz graničnu statističku značajnost ( $p=0,093$ ) (tablica 9). Glavni učinci nezavisnih varijabli “*TNF-α1* -308” i “*TGF-β1* 29” bili su statistički značajni (tablica 9).



**Slika 16.** Omjeri rizika (s 95% granicama pouzdanosti, GP) za aseptičku nestabilnost endoproteze zgloba kuka iz Coxove regresijske analize u modelu iz tablice 7 (Model 2). Slika se “čita” kao i slika 14, s tom razlikom da nazivnik omjera rizika za genotipove na položaju 29 u kodonu *TGF-β1* predstavljaju (kumulativno) genotipovi sa C-alelom (T/C i C/C).

\* Omjer rizika za genotip G/G u odnosu na genotip A/A na ovom položaju nije bilo moguće procijeniti, budući da su samo dva ispitanika (dvije endoproteze) imala genotip A/A. U oba slučaja, proteze su “cenzurirane” u 17. godini praćenja.

Rizik aseptičke nestabilnosti združen s genotipom T/T na položaju 29 u kodonu *TGF-β1* bio je oko 8 puta veći od rizika združenog s genotipovima koji uključuju C-alel (T/C ili C/C) ( $p=0,026$ ) (slika 16). Omjeri rizika za ostale nezavisne varijable bili su po iznosu i statističkoj značajnosti (slika 16) praktično isti kao i u glavnom modelu (slika 14).

### Model 3

U promotorskom području *IL-6* više je polimorfnih položaja (vidi: Uvod). Određena kombinacija genotipova na trima od tih položaja (položaji -597, -572, -174, genotipovi G/G-G/G-G/G), u odnosu na sve druge kombinacije, združena je sa smanjenim rizikom odbacivanja bubrežnog transplantata (172). U ovoj studiji našli smo sedam od devet mogućih kombinacija genotipova na položajima -597 i -572. Najčešća je bila kombinacija G/A -597 / C/C -572 (17 kukova). Pojedinačno su ti genotipovi, kako u glavnom (slika 14) tako i u dva alternativna modela (slika 15, slika 16), bili združeni s povećanim rizikom aseptičke nestabilnosti. Stoga je oblikovan model s istim nezavisnim varijablama kao i glavni model, s tim da je umjesto varijabli “*IL-6* položaj -597” i “*IL-6* položaj -572” uvrštena varijabla “*IL-6* kombinacija genotipova -597/-572” s dvije razine (kombinacija G/A / C/C i ostale kombinacije).

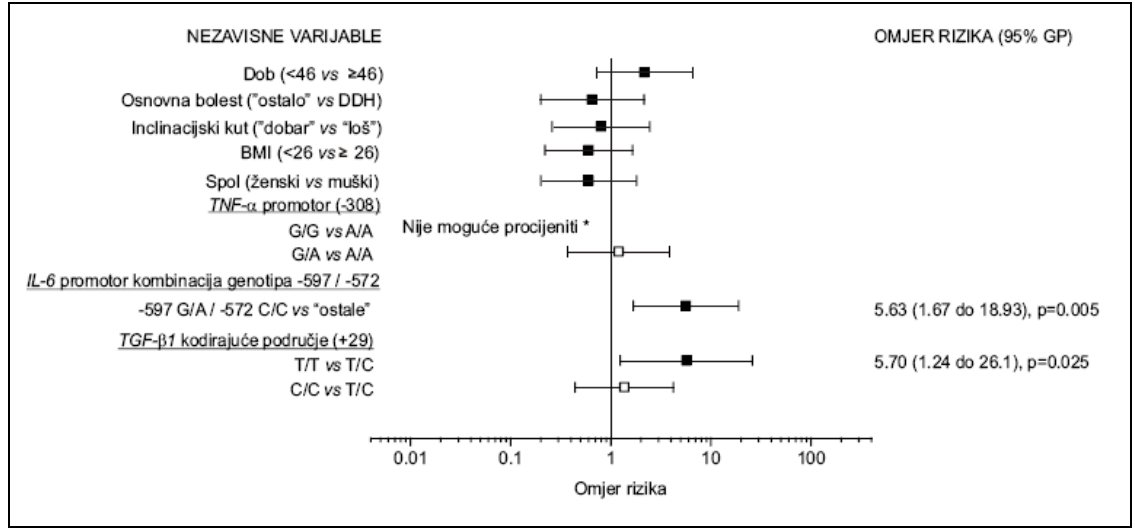
Model je objasnio 32,3% varijabilnosti zavisne varijable (slično kao i glavni model) uz graničnu statističku značajnost ( $p=0,063$ ). Glavni učinci nezavisnih varijabli “*TNF- $\alpha$ 1* -308” i “*IL-6* kombinacija genotipova -597/-572” bili su statistički značajni (tablica 10).

Rizik aseptičke nestabilnosti združen s kombinacijom genotipova G/A / C/C na položajima -597 / -572 u *IL-6* promotorsko područjeu bio je oko 5,6 puta veći nego rizik združen sa ostalim kombinacijama genotipova na tim položajima (kumulativno) ( $p=0,005$ ) (slika 17). Ostali omjeri rizika (slika 17) bili su po iznosu i statističkoj značajnosti slični onima u glavnom modelu (slika 14).

**Tablica 10.** Tablica analize devijance (test omjera vjerojatnosti) i promjena R2 iz regresijske analize “preživljenja” endoproteza kuka u alternativnom modelu – Model 3 (N=45)

Nezavisne varijable (ispuštene)	Test omjera vjerojatnosti		Promjena R2
	d.f.	P	
Sve	10	0,063	0,323
Dob u vrijeme operacije (<46 ili ≥46 godina)	1	0,154	0,061
Osnovna bolest (DDH ili “drugo”)	1	0,462	0,009
Inklinacijski kut (“dobar” ili “loš”)	1	0,705	0,002
Spol (muški ili ženski)	1	0,369	0,004
BMI (<26 ili ≥26)	1	0,347	0,012
<i>IL-6</i> promotorsko područje kombinacija genotipova -597/-572	1	0,004	0,071
<i>TGF-β1</i> kodon položaj 29	2	0,121	0,062
<i>TNF-α1</i> promotorsko područje položaj -308	2	0,018	0,102
Niti jedna (model)	10		0,000

DDH = razvojni poremećaj zgloba kuka (od developmental dysplasia of the hip); BMI= indeks tjelesne mase (od body mass index); d.f.= broj stupnjeva slobode (od degrees of freedom).



**Slika 17.** Omjeri rizika (s 95% granicama pouzdanosti, GP) za aseptičku nestabilnost endoproteze zgloba kuka iz Coxove regresijske analize u modelu iz tablice 8 (Model 3). Slika se “čita” kao i slika 14, s tom razlikom da je umjesto varijabli “*IL-6* promotorsko područje položaj -597” i “*IL-6* promotorsko područje položaj -572” uvrštena varijabla “*IL-6* promotorsko područje kombinacija genotipova -597 / -572”.

\* Omjer rizika za genotip G/G u odnosu na genotip A/A na ovom položaju nije bilo moguće procijeniti, budući da su samo dva ispitanika (dvije endoproteze) imala genotip A/A. U oba slučaja, proteze su “cenzurirane” u 17. godini praćenja.

#### Model 4

Ovaj model je “kombinacija” modela 2 i 3, tj. razlikuje se od glavnog modela utoliko što sadrži nezavisnu varijablu “*IL-6* promotorsko područje kombinacija genotipova -597/ -572” (umjesto dvaju varijabli za ta dva položaja) (s dvije razine: G/A / C/C i “ostale kombinacije”), a varijabla “*TGF-β1* položaj 29” ima dvije, umjesto tri razine.

**Tablica 11.** Tablica analize devijance (test omjera vjerojatnosti) i promjena R2 iz regresijske analize “preživljenja” endoproteza kuka u alternativnom modelu – Model 4 (N=45)

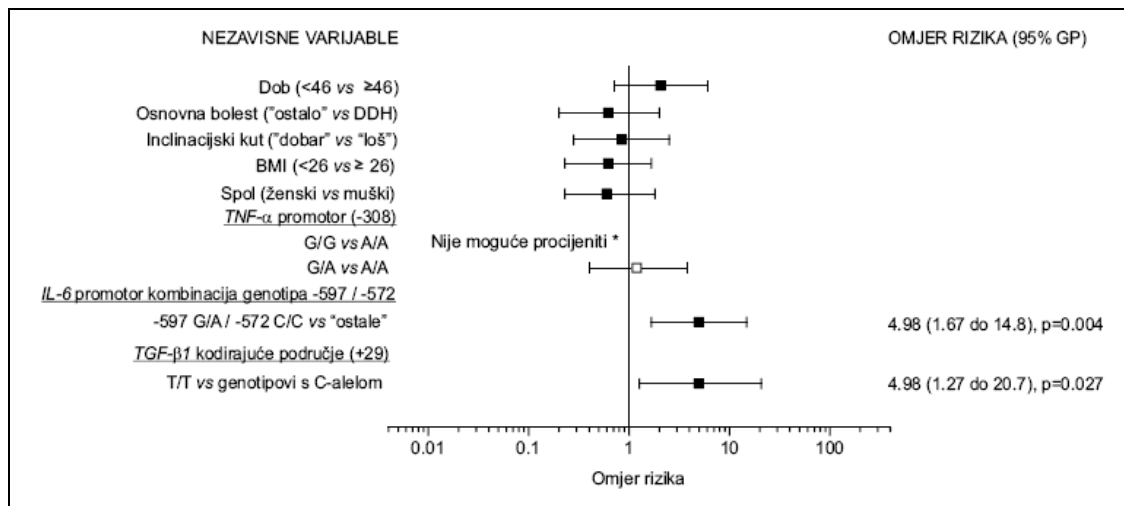
Nezavisne varijable (ispuštene)	Test omjera vjerojatnosti		
	d.f.	P	Promjena R2
Sve	9	0,045	0,319
Dob u vrijeme operacije (<46 ili ≥46 godina)	1	0,173	0,056
Osnovna bolest (DDH ili “drugo”)	1	0,423	0,010
Inklinacijski kut (“dobar” ili “loš”)	1	0,767	0,001
Spol (muški ili ženski)	1	0,361	0,004
BMI (<26 ili ≥26)	1	0,349	0,013
<i>IL-6</i> promotorsko područje kombinacija genotipova -597/-572	1	0,004	0,071
<i>TGF-β1</i> kodon položaj 29	1	0,048	0,062
<i>TNF-α1</i> promotorsko područje položaj -308	2	0,021	0,102
Niti jedna (model)	9		0,000

DDH = razvojni poremećaj zgloba kuka (od developmental dysplasia of the hip); BMI= indeks tjelesne mase (od body mass index); d.f.= broj stupnjeva slobode (od degrees of freedom).

Model je objasnio 31.9% varijabilnosti zavisne varijable (slično kao i glavni model) te je bio statistički značajan (p=0,045). Glavni učinci nezavisnih varijabli “*TNF-α1* -308”, “*IL-6* kombinacija genotipova -597/-572” i “*TGF-β1* kodon položaj 29” bili su statistički značajni (tablica 11).

Rizik aseptičke nestabilnosti združen s kombinacijom genotipova G/A / C/C na položajima -597 / -572 u *IL-6* promotorskom području bio je oko 5 puta veći nego rizik združen sa ostalim kombinacijama genotipova na tim položajima (kumulativno) (p=0,004) (slika 15). Također, rizik aseptičke nestabilnosti združen s genotipom T/T na položaju 29 u kodonu *TGF-β1* bio je oko 5 puta veći nego rizik združen s genotipovima

koji uključuju C-alel ( $p=0,027$ ) (slika 18). Ostali omjeri rizika (slika 18) bili su po iznosu i statističkoj značajnosti slični onima u glavnom modelu (slika 14).



**Slika 18.** Omjeri rizika (s 95% granicama pouzdanosti, GP) za aseptičku nestabilnost endoproteze zgloba kuka iz Coxove regresijske analize u modelu iz tablice 9 (Model 4). Slika se “čita” kao i slika 14, s tom razlikom da je umjesto varijabli “*IL-6* promotorsko područje položaj -597” i “*IL-6* promotorsko područje položaj -572” uvrštena varijabla “*IL-6* promotorsko područje kombinacija genotipova -597 / -572”, a nazivnik omjera rizika za genotipove na položaju 29 u kodonu *TGF-β1* predstavljaju (kumulativno) genotipovi sa C-alelom (T/C i C/C).

\* Omjer rizika za genotip G/G u odnosu na genotip A/A na ovom položaju nije bilo moguće procijeniti, budući da su samo dva ispitanika (dvije endoproteze) imala genotip A/A. U oba slučaja, proteze su “cenzurirane” u 17. godini praćenja.

## Model 5

Ovaj model je “kombinacija” modela 1, 2 i 3, tj. razlikuje se od glavnog modela utoliko što sadrži nezavisnu varijablu “*IL-6* promotorsko područje kombinacija genotipova -597/ -572” (umjesto dvaju varijabli za ta dva položaja) (s dvije razine: G/A / C/C i “ostale kombinacije”), varijabla “*TGF-β1* položaj 29” ima dvije, umjesto tri razine, a ostale nezavisne varijable su “*TNF-α1* promotorsko područje položaj -308” i “dob u vrijeme operacije”.

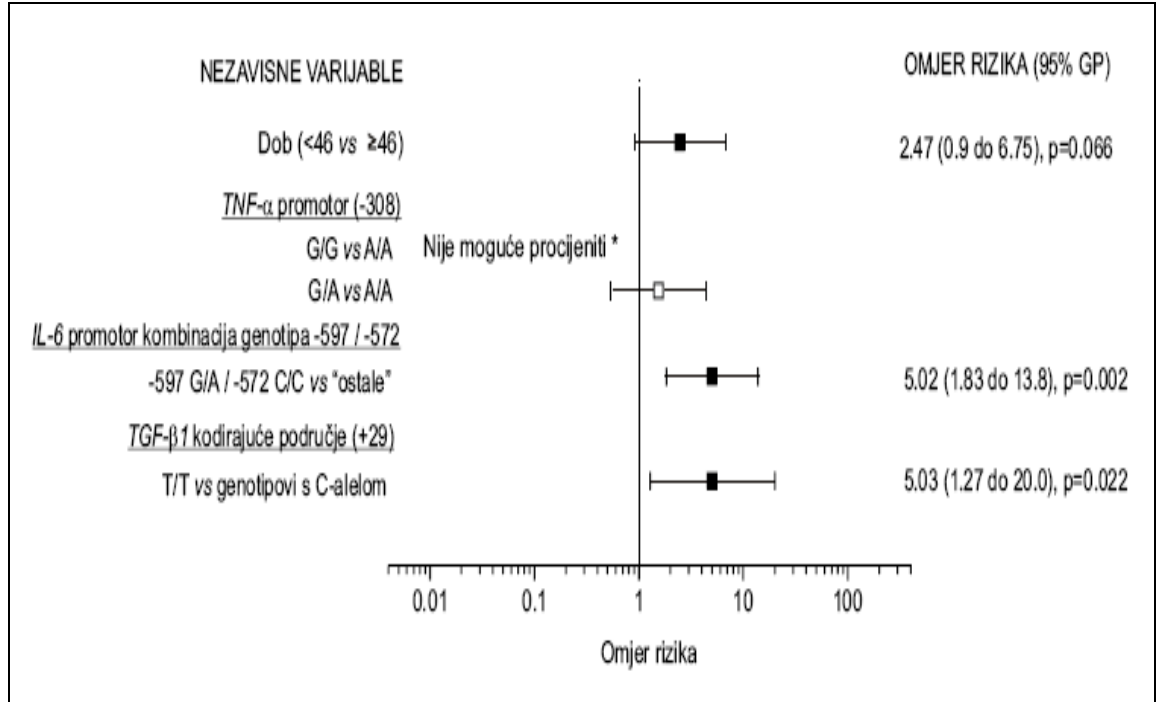
Model je objasnio 29,1% varijabilnosti zavisne varijable te je bio statistički značajan ( $p=0,009$ ). Glavni učinci nezavisnih varijabli “*TNF-α1* -308”, “*IL-6* kombinacija genotipova -597/-572” i “*TGF-β1* kodon položaj 29” bili su statistički značajni (tablica 12). Rizik aseptičke nestabilnosti združen s kombinacijom genotipova G/A / C/C na položajima -597 / -572 u *IL-6* promotorskom području bio je oko 5 puta veći nego rizik združen sa ostalim kombinacijama genotipova na tim položajima (kumulativno), upravo kao i rizik združen s genotipom T/T na položaju 29 u kodonu *TGF-β1* u odnosu na genotipove s C-alelom (slika 19).



**Tablica 12.** Tablica analize devijance (test omjera vjerojatnosti) i promjena R2 iz regresijske analize “preživljenja” endoproteza kuka u alternativnom modelu – Model 5 (N=45)

Nezavisne varijable (ispuštene)	Test omjera vjerojatnosti		
	d.f.	P	Promjena R2
Sve	5	0,009	0,291
Dob u vrijeme operacije (<46 ili ≥46 godina)	1	0,066	0,056
IL-6 promotorsko područje kombinacija genotipova -597/-572	1	0,002	0,071
TGF-β1 kodon položaj 29	1	0,043	0,062
TNF-α promotorsko područje položaj –308	2	0,013	0,102
Niti jedna (model)	5		0,000

d.f.= broj stupnjeva slobode (od degrees of freedom).



**Slika 19.** Omjeri rizika (s 95% granicama pouzdanosti, GP) za aseptičku nestabilnost endoproteze zgloba kuka iz Coxove regresijske analize u modelu iz tablice 10 (Model 5). Slika se “čita” kao i slika 14, s tom razlikom da je umjesto varijabli “*IL-6* promotorsko područje položaj -597” i “*IL-6* promotorsko područje položaj -572” uvrštena varijabla “*IL-6* promotorsko područje kombinacija genotipova -597 / -572”, a nazivnik omjera rizika za genotipove na položaju 29 u kodirajućem području TGF-β1 predstavljaju (kumulativno) genotipovi sa C-alelom (T/C i C/C).

\* Omjer rizika za genotip G/G u odnosu na genotip A/A na ovom položaju nije bilo moguće procijeniti, budući da su samo dva ispitanika (dvije endoproteze) imala genotip A/A. U oba slučaja, proteze su “cenzurirane” u 17. godini praćenja.

Ukupno gledajući, sekundarna analiza “preživljenja” endoproteze do nastupa aseptičke nestabilnosti podupire nalaze primarne analize. U pet “alternativnih” modela konzistentno je:

- a) nađen statistički značajan “glavni učinak” čimbenika “TNF- $\alpha$  u promotorskom području na položaju -308”, no nije bilo moguće procijeniti relativni rizik za genotip G/G u odnosu na prisutvo “A-alela“ zbog relativno malenog broja ispitanika;
- b) nađen statistički značajno veći rizik združen s genotipom T/T na položaju 29 u kodonu TGF- $\beta$ 1 u odnosu na najčešći genotip na tom položaju (T/C), odnosno u odnosu na genotipove koji uključuju “C-alel”;
- c) nađen statistički značajno ili graničano značajno veći rizik združen s genotipoma G/A na položaju -597 u promotorskom području IL-6, odnosno s genotipom C/C na položaju -572 u istoj regiji. Ta su dva genotipa bili najčešći genotipovi na predmetnim položajima.
- d) također, nađen je značajno veći rizik združen s kombinacijom genotipova G/A - 597 / C/C -572 u odnosu na ostale kombinacije genotipova na ta dva položaja.

## **10.2. Razvojni poremećaj zgloba kuka i polimorfizmi analiziranih gena: *TGF- $\beta$ 1* položaj 29, *TNF- $\alpha$ 1* položaj -308 te *IL-6* na položajima -597 i -572**

U osnovi, istraživanje združenosti polimorfizma pojedinačnog nukleotida (single nucleotide polymorphism) na nekom položaju i neke bolesti (ili poremećaja) podrazumijeva da se prvo, na dovoljno velikom i reprezentativnom uzorku “opće zdrave populacije”, odnosno populacije koje ne pati od predmetne bolesti, odredi “pojavnost” istraživanog polimorfizma, odnosno prevalencija mogućih genotipova ili pak

prevalencija određenog alela – tzv. “pozadinska” ili background prevalencija. Tipično, najzastupljeniji genotip (npr. 1 od 3 moguća) ili, također, prisustvo ili odsustvo određenog alela (“prisutan” ili “odsutan”) definiraju se u tom slučaju kao “referentna vrijednost”. Zatim se, kroz usporedbu prevalencije određenog genotipa ili prisustva ili odsustva određenog alela između “zdravih” i “bolesnih” ispitanika, zaključuje od zduženosti bolesti i određenog genotipa ili određenog alela.

U ovom istraživanju, istraživanje zduženosti razvojnog poremećaja zgloba kuka i genotipova na 4 polimorfna položaja definirano je kao “sekundarno”, tj. vrlo preliminarno istraživanje. Stoga, skupina “zdravih” ispitanika i jest mala, tj. nedovoljno velika kako bi se pouzdano odredila “pozadinska” prevalencija određenih genotipova (ili pak prisustva/odsustva određenih alela) na istraživanim položajima. Prema tome, nije bilo moguće za pojedini položaj odrediti jedan “referentni genotip” ili “referentno prisustvo alela”, već je analizirano više inačica, gdje je svaki put kao “referentna vrijednost” na nekom položaju određen drugi genotip.

Glavna svojstva 28 bolesnika s razvojnim poremećajem zgloba kuka i 20 zdravih kontrolnih ispitanika, uključenih u ovaj dio istraživanja, sažeta su u tablici 13.

**Tablica 13.** Glavna svojstva bolesnika s razvojnim poremećajem kuka (DDH) i zdravih kontrolnih ispitanika.

	Zdravi	Bolesni
Broj ispitanika (N)	20	28
Spol (M/Ž)	9/11	5/23
Dob (godine) – medijan (raspon)	21 (20-35)	44 (34-57)
Poddioba prema genotipu		
<i>IL-6 -572G→C</i>		
G/G	3	3
G/C	11	4
C/C	6	21
<i>IL-6 -597G→A</i>		
G/G	8	8
G/A	7	16
A/A	5	4
<i>TGF-β1 29T→C</i>		
T/T	7	3
T/C	12	19
C/C	1	6
<i>TNF-α1 -308G→A</i>		
G/G	3	1
G/A	2	6
A/A	15	21

Zavisna varijabla – razvojni poremećaj kuka “da” (“bolesni”) ili “ne” (“zdravi”) – analizirana je logističkom binarnom regresijom. “Spol” je uvijek uključen u analizu kao jedna od nezavisnih varijabli (“prediktora”), budući je poznato da je učestalost ovog poremećaja veća kod osoba ženskog spola (189,190). Ostale nezavisne varijable u analiziranim modelima bili su istraživani položaji, u različitim kombinacijama, u 3 različita modela.

## Model 1

U ovaj model, uz “spol”, uključene su nezavisne varijable “*IL-6* položaj -597”, “*IL-6* položaj -572”, “*TNF- $\alpha$ 1* položaj -308” i “*TGF- $\beta$ 1* položaj 29”, svaki od njih s tri “razine” (tri moguća genotipa).

Model je objasnio 45.7% varijabilnosti zavisne varijable (vrijednost R<sup>2</sup>) i bio je statistički značajan (p= 0,004). Glavni učinci nezavisnih varijabli “*IL-6* položaj 572 i “*TGF- $\beta$ 1* položaj 29” bili su statistički značajni, dok je učinak varijable “spol” bio granično značajan (tablica 14).

**Tablica 14.** Analiza devijance (test omjera vjerojatnosti) iz binarne logističke regresijske analize ishoda “razvojni poremećaj zgloba kuka da ili ne” (Model 1) (N= 48). Model R<sup>2</sup>= 0,457.

Nezavisne varijable (ispuštene)	d.f.	P
Sve	9	0,004
Spol	1	0,095
<i>IL-6</i> položaj -597	2	0,307
<i>IL-6</i> položaj -572	2	0,045
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i> položaj 29	2	0,045
<i>TNF-<math>\alpha</math>1</i> položaj -308	2	0,288
Niti jedna (model)	9	

d.f.= broj stupnjeva slobode (od degrees of freedom).

U prvoj “inačici” modela, kao “referenti” genotipovi na svakom od 4 položaja označeni su tzv. netranzicijski homozigotni genotipovi, tj. G/G (*IL-6* položaj -597), G/G (*IL-6* položaj -572), T/T (*TGF- $\beta$ 1* položaj 29) i G/G (*TNF- $\alpha$ 1* položaj -308). U drugoj “inačici”, kao “referenti” genotipovi na svakom od 4 položaja označeni su tzv. tranzicijski homozigotni genotipovi, tj. A/A (*IL-6* položaj -597), C/C (*IL-6* položaj -

572), C/C (*TGF-β1* položaj 29) i A/A (*TNF-α1* položaj -308). Naravno, vrijednosti prikazane u tablici 12 iste su za obje inačice modela, budući da se razlikuju samo u definiciji “referentne vrijednosti”. S ove dvije inačice omogućena je usporedba vjerojatnosti prisustva razvojnog poremećaja kuka u 3 moguća “para genotipova” na svakom od položaja, npr. za položaj -597: G/G spram G/A (ili obrnuto), G/G spram A/A (ili obrnuto) i G/A spram A/A (ili obrnuto). Usporedba vjerojatnosti iskazana je kao omjer vjerojatnosti s 95% granicama pouzdanosti (tablica 15). Vjerojatnost razvojnog poremećaja kuka bila je oko 4 puta veća kod žena, što je u ovom uzorku i u ovom modelu imalo graničnu statističku značajnost (tablica 15). Uočena je statistička značajna razlika vjerojatnosti razvojnog poremećaja kuka između genotipova G/C i C/C na položaju -572 u promotorskom području *IL-6* ( $p=0,019$ ), te između genotipova C/C i T/T na položaju 29 u kodonu *TGF-β1* ( $p=0,026$ ), i granično značajna razlika između genotipova T/C i T/T na istom položaju ( $p=0,074$ ) (tablica 15).

**Tablica 15.** Omjeri vjerojatnosti (95% granice pouzdanosti, GP) razvojnog poremećaja kuka na temelju binarne logističke regresije iz tablice 12 (Model 1).

Nezavisne varijable / usporedba	Omjer vjerojatnosti (95% GP)	P
Spol: žene spram muških	4,26 (0,74 do 24,2)	0,102
<i>IL-6</i> -597 G/A spram G/G	2,40 (0,30 do 19,40)	0,412
A/A spram G/G	0,45 (0,04 do 5,06)	0,518
G/A spram A/A	5,32 (0,58 do 48,7)	0,139
<i>IL-6</i> -572 G/C spram G/G	0,32 (0,03 do 3,88)	0,373
C/C spram G/G	3,08 (0,30 do 31,1)	0,341
G/C spram C/C	0,11 (0,02 do 0,69)	0,019
<i>TGF-β1</i> 29 T/C spram T/T	7,13 (0,83 do 61,5)	0,074
C/C spram T/T	30,4 (1,26 do 725,4)	0,036
T/C spram C/C	0,23 (0,02 do 3,43)	0,289
<i>TNF-α1</i> -308 G/A spram G/G	10,9 (0,47 do 256,3)	0,132
A/A spram G/G	3,92 (0,23 do 66,1)	0,343
G/A spram A/A	2,79 (0,27 do 28,6)	0,387

## Model 2

U ovom modelu su, uz “spol”, uključene nezavisne varijable “*TGF-β1* položaj 29” i “*TNF-α1* položaj -308”, svaka sa po 3 razine (3 moguća genotipa), te varijabla “kombinacija genotipova na položajima -597 i -572 u promotorskom području *IL-6*” sa dvije razine: kombinacija G/A -597 / C/C -572 i “sve ostale kombinacije”.

Model je objasnio 61,2% varijabilnosti zavisne varijable, a glavni učinci svih nezavisnih varijabli, osim varijable “*TNF-α1* položaj -308”, bili su statistički značajni (tablica 16).



**Tablica 16.** Analiza devijance (test omjera vjerojatnosti) iz binarne logističke regresijske analize ishoda “razvojni poremećaj zgloba kuka da ili ne” (Model 2) (N=48). Model R<sup>2</sup>= 0,612.

Nezavisne varijable (ispuštene)	d.f.	P
Sve	6	<0,001
Spol	1	0,029
Kombinacija genotipova IL-6 položaj -597 i -572	1	0,002
TGF- $\beta$ 1 položaj 29	2	0,023
TNF- $\alpha$ položaj -308	2	0,118
Niti jedna (model)	6	

d.f.= broj stupnjeva slobode (od degrees of freedom).

U prvom “inačici” modela, kao “referentni” genotipovi određeni su T/T za *TGF- $\beta$ 1* položaj 29 i G/G za *TNF- $\alpha$ 1* položaj -308. U drugom “inačici” referentni genotipovi su bili C/C za *TGF- $\beta$ 1* položaj 29 i A/A za *TNF- $\alpha$ 1* položaj -308.

Vjerojatnost razvojnog poremećaja zgloba kuka bila je oko 6,5 puta veća kod žena nego kod muškaraca (p=0,041) (tablica 17). Vjerojatnost razvojnog poremećaja kuka združena s kombinacijom genotipova G/A -597 / C/C -572 u promotorskom području *IL-6* bila je oko 18 puta veća od vjerojatnosti združene s ostalim kombinacijama genotipova na tim položajima (p=0,016) (tablica 17). Također su uočene statistički značajne razlike vjerojatnosti razvojnog poremećaja kuka između genotipova T/C i T/T na položaju 29 u kodonu *TGF- $\beta$ 1* (p= 0,046), te genotipova C/C i T/T na

istom položaju ( $p= 0,030$ ) (Tablica 17), i granično značajna razlika između genotipova G/A i G/G na položaju -308 u promotorskom području *TNF- $\alpha$ 1* (tablica 17).

**Tablica 17.** Omjeri vjerojatnosti (95% granice pouzdanosti, GP) razvojnog poremećaja kuka na temelju binarne logističke regresije iz tablice 13 (Model 2).

Nezavisne varijable / usporedba	Omjer vjerojatnosti (95% GP)	P
Spol: žene spram muških	6,42 (1,07 do 38,4)	0,041
Kombinacija genotipova <i>IL-6</i> -597 / -572 G/A / C/C spram “ostale”	18,2 (1,73 do 192,2)	0,016
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i> 29 T/C spram T/T	9,63 (1,04 do 89,2)	0,046
C/C spram T/T	38,9 (1,43 do 1055)	0,030
T/C spram C/C	0,25 (0,02 do 3,45)	0,300
<i>TNF-<math>\alpha</math>1</i> -308 G/A spram G/G	25,7 (0,81 do 817)	0,066
A/A spram G/G	3,92 (0,23 do 66,1)	0,343
G/A spram A/A	5,97 (0,32 do 111)	0,229

### Model 3

U ovom modelu su, uz “spol”, uključene nezavisne varijable “*TNF- $\alpha$ 1* položaj -308” s 3 razine (3 moguća genotipa), “*TGF- $\beta$ 1* položaj 29” s dvije razine – genotip T/T ili genotip koji uključuje C-alal (T/C ili C/C, C-allele carriage) te varijabla “kombinacija genotipova na položajima -597 i -572 u promotorskom području *IL-6*” sa dvije razine: kombinacija G/A -597 / C/C -572 i “sve ostale kombinacije”.

Model je objasnio 67.4% varijabilnosti zavisne varijable, a glavni učinci svih nezavisnih varijabli, osim varijable “*TNF- $\alpha$ 1* položaj -308”, bili su statistički značajniji (tablica 18).

**Tablica 18.** Analiza devijance (test omjera vjerojatnosti) iz binarne logističke regresijske analize ishoda “razvojni poremećaj zgloba kuka da ili ne” (Model 3) (N=48). Model R<sup>2</sup>= 0,674.

Nezavisne varijable (ispuštene)	d.f.	P
Sve	5	<0,001
Spol	1	0,035
Kombinacija genotipova <i>IL-6</i> položaj -597 i -572	1	0,002
<i>TGF-β1</i> položaj 29	1	0,012
<i>TNF-α1</i> položaj -308	2	0,077
Niti jedna (model)	5	

d.f.= broj stupnjeva slobode (od degrees of freedom).

U prvoj “inačici” modela, kao “referenti” genotip na položaju -308 u promotorskom području *TNF-α1* određen je genotip G/G, a u drugoj “inačici” genotip A/A.

Vjerojatnost razvojnog poremećaja zgloba kuka bila je oko 5,8 puta veća kod žena nego kod muškaraca (p=0,047) (tablica 19). Vjerojatnost razvojnog poremećaja kuka združena s kombinacijom genotipova G/A -597 / C/C -572 u promotorskom području *IL-6* bila je oko 17 puta veća od vjerojatnosti združene s ostalim kombinacijama genotipova na tim položajima (p=0,016) (tablica 19). Vjerojatnost razvojnog poremećaja zgloba kuka bila je oko 10 puta manja uz genotip T/T na položaju 29 u kodonu *TGF-β1* (p= 0,030) u odnosu na genotipove s “C-alelom” (tablica 19). Uočena je i značajna razlika vjerojatnosti razvojnog poremećaja kuka između genotipova G/A i G/G na položaju -308 u promotorskom području *TNF-α1* (p=0,046) (Slika 16).

**Tablica 19.** Omjeri vjerojatnosti (95% granice pouzdanosti, GP) razvojnog poremećaja kuka na temelju binarne logističke regresije iz tablice 15 (Model 3).

Nezavisne varijable / usporedba	Omjer vjerojatnosti (95% GP)	P
Spol: žene spram muških	5,77 (1,02 do 32,5)	0,047
Kombinacija genotipova <i>IL-6</i> -597 / -572 G/A / C/C spram "ostale"	16,9 (1,68 do 170,2)	0,016
<i>TGF-β1</i> 29 T/T spram "genotip s C- alelom"	0,09 (0,01 do 0,79)	0,030
<i>TNF-α1</i> -308 G/A spram G/G	32,8 (1,07 do 101,0)	0,046
A/A spram G/G	6,66 (0,37 do 120)	0,198
G/A spram A/A	4,93 (0,46 do 53,1)	0,192

Sveukupno gledajući, provedena analiza ukazuje na:

- a) (očekivanu) združenost ženskog spola i razvojnog poremećaja zgloba kuka;
- b) združenost genotipova na nekim od analiziranih položaja i razvojnog poremećaja kuka, i to najizrazitije na manju vjerojatnost ovog poremećaja uz genotip T/T na položaju 29 u kodonu sekvenci *TGF-β1* u odnosu na genotipove koji sadrže "C-alel" (T/C ili C/C).
- c) također, rezultati ukazuju da je genotip C/C na položaju -572 u promotorskom području *IL-6* združen s većom vjerojatnošću razvojnog poremećaja zgloba kuka, pogotovo ako dolazi "u kombinaciji" s genotipom G/A na položaju -597 u istom području.

## 11. RASPRAVA

Ova je disertacija rezultat istraživanja čija je svrha ispitati moguću povezanost genotipova na 4 polimorfna položaja, i to: pozicija -597 (G→A) i -572 (G→C) u promotorskom području *IL-6*, pozicija -308 (G→A) u promotorskom području *TNF-α1* i pozicija 29 u kodirajućem području *TGF-β1* (T→C); i nastanka aseptičke nestabilnosti totalne endoproteze zgloba kuka, odnosno prisustva razvojnog poremećaja zgloba kuka. Mogući mehanizmi takvih povezanosti nisu bili predmet ovog istraživanja.

Prema javno dostupnim literaturnim podacima, istraživanja povezanosti aseptičke nestabilnosti endoproteze kuka, odnosno razvojnog poremećaja zgloba kuka i polimorfizama pojedinačnog nukleotida (SNP), a posebno SNP u genima za citokine koji sudjeluju u patofiziologiji ovih poremećaja, u samom su začetku. Stoga, iako preliminarno (posebno u dijelu koji se odnosi na vezu SNP i razvojnog poremećaja zgloba kuka), ovo istraživanje ima svoju vrijednost, budući da podupire hipotezu o ulozi istraživanih SNP u predmetnim stanjima te ukazuje na mogući smjer daljnjih istraživanja.

### 11.1. Povezanost polimorfizma istraživanih gena i nastanka aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka

Razvoj tehnika totalne endoproteze zgloba kuka, a posebice razvoj materijala za izgradnju endoproteza, uvelike je izmijenio mogućnosti liječenja brojnih stanja koja rezultiraju smanjenom funkcionalnošću zgloba kuka u smislu ograničenja pokretljivosti i bolnosti. Suvremene endoproteze omogućuju dramatično poboljšanje funkcije zgloba, što rezultira boljom radnom sposobnošću i višom kvalitetom života bolesnika. Iako je ugradnja totalne endoproteze zgloba kuka danas visoko uspješan zahvat, ipak su uz njega vezane i određene komplikacije.

Najvažnija kasna komplikacija totalne endoproteze kuka jest pojava aseptičke nestabilnosti (2-5). Kako je prethodno navedeno (vidi:Uvod), ova komplikacija nastaje kao posljedica aseptičke upalne reakcije na čestice koje se oslobađaju u zglob i okolinu zgloba tijekom korištenja endoproteze, s posljedičnom osteolizom i nestabilnošću endoproteze (4,5). U aseptičkom kroničnom upalnom procesu nastalom kao reakcija na strane čestice sudjeluje velik broj posrednika: staničnih i humoralnih. Točna uloga i funkcionalno značenje ovih posrednika u nastanku nestabilnosti endoproteza nisu još u potpunosti poznati, no jasno je da se radi o složenoj interakciji staničnih i humoralnih čimbenika koji podržavaju upalu te, izravno ili neizravno, dovode do resorpcije kosti (5, 12).

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća pokazano je da neki čimbenici povećavaju rizik nastanka aseptičke nestabilnosti, odnosno da se uz njihovo prisustvo aseptička nestabilnost razvija u kraćem vremenskom razdoblju nakon artroplastike: rizik nastanka aseptičke nestabilnosti veći je uz endoproteze određenog tipa/materijala (npr., endoproteze s polietilenskim dijelovima) (43,44); rizik je veći ako je endoproteza ugrađena zbog posljedica razvojnog poremećaja kuka, nego kada je ugrađena zbog drugih razloga (45); rizik je veći ako su osobe u vrijeme ugradnje endoproteze mlađe od 46 godina (57,58); rizik je veći za osobe muškog spola, kao i za osobe koje su izložene većem fizičkom naporu (što je često međusobno povezano) (15,57); rizik je veći ako protezu ugrađuje neiskusni operater (62,64); rizik je veći ako se operacijom ne postigne “dobar” inklinacijski kut acetabuluma (60-63); rizik je veći ako bolesnik ima pretjeranu tjelesnu masu (59). Međutim, svi ovi čimbenici zajedno objašnjavaju samo manji dio varijabilnosti rizika za nastanak aseptičke nestabilnosti. Također, aseptička nestabilnost nastaje uz bilo koji tip endoproteze/materijala, i u starijih i u mlađih bolesnika, u oba

spola, i uz veću i uz manju tjelesnu aktivnost ili indeks tjelesne mase, i kada je operater iskusan itd. (60,62,63). Stoga je prepoznato da, osim navednih čimbenika postoje i neki drugi koji čine tzv. “individualnu sklonost” bolesnika razvoju ove komplikacije.

Proces periprostetičkog gubitka koštane mase koji rezultira aseptičkom nestabilnošću endoproteze zgloba kuka donekle je sličan procesu gubitka koštane mase u postmenopauzalnih žena. Nekoliko je istraživanja ukazalo na združenost SNP u genima *IL-6* (122,158,160), *TNF- $\alpha$ 1* (57,1130) i *TGF- $\beta$ 1* (131,162) i stanja koštane mase postmenopauzalnih žena. Pretpostavlja se da je funkcionalna veza između istraživanih SNP i promjena koštane mase sadržana u učincima koje ti citokini imaju u procesu koštane pregradnje (vidi: Uvod). Istodobno, do sada je objavljena samo jedna studija koja je ukazala na združenost polimorfizma u promotorskom području nekog od citokina uključenog u procese koštane pregradnje i u procese koji rezultiraju aseptičkom nestabilnošću – prisustvo nukleotida “A” na položaju -238 u promotorskom području *TNF- $\alpha$ 1* (57) povećava rizik aseptičke nestabilnosti. Slijedeći logiku da su geni za citokine, poznati kao medijatori procesa koji vode k aseptičkoj nestabilnosti, dobri kandidati za istraživanje “individualne sklonosti” ovoj komplikaciji (57), u ovom smo istraživanju pozornost posvetili SNP u genima *IL-6*, *TNF- $\alpha$ 1* i *TGF- $\beta$ 1*.

#### *11.1.1. Svojstva provedenog istraživanja koja osiguravaju internu validnost*

U metodološkom smislu, u provedenom istraživanju osigurani su sljedeći uvjeti koji procjene združenosti određenih genotipova na istraživanim položajima i “preživljenja endoproteze do aseptičke nestabilnosti“ (“efekte genotipova”) čine prihvatljivo pouzdanima i nepristranima:

- a) U ispitivanje su uključeni konsekutivni ispitanici koji su bili voljni sudjelovati (čime se smanjuje moguća pristranost, uslijed pristrane selekcije ispitanika, tzv. “selection bias”);
- b) Sve endoproteze ugradio je isti operater koji je u vrijeme ugradnje prve od analiziranih endoproteza (1985.godine) već imao iskustvo od više stotina ugrađenih endoproteza (mentor ove dizertacije, D.O.) – time je eliminirana “pristranost” koja može proistći iz razlika između operatera (tzv. “performance bias”);
- c) Sve ugrađene endoproteze bile su iz istog materijala. Time je umanjena mogućnost pristranosti zbog različitog “tretmana” pruženog bolesnicima, tj. eliminirana je “pristranost” koja bi mogla proistći iz razlika tipa/materijala ugrađene endoproteze;
- d) Svi su ispitanici praćeni u redovitim i približno istim vremenskim intervalima, primjenom objektivizirane i standardizirane metodologije. Time je minimalizirana moguća “pristranost” koja bi proistekla iz “pristrane evaluacije” (tzv. “assessment bias”);
- e) Korištene su poznate i publicirane metode genotipizacije;
- f) Statistička analiza provedena je primjerenom metodom, a “efekti” genotipova/položaja procijenjeni su uz kontrolu drugih čimbenika koji utječu na pojavu aseptičke nestabilnosti: dob u vrijeme operacije, spol, indeks tjelesne mase i inklinacijski kut acetabuluma.

### *11.1.2. Nedostaci provedenog istraživanja*

Nedostaci provedenog istraživanja vezani su prvenstveno uz razmjerno mali broj uključenih ispitanika/endoproteza. Iz te činjenice proistječu sljedeće posljedice:

Sve procjene (procjene “efekata”) su razmjerno neprecizne, tj. imaju široke granice pouzdanosti. Primjerice, u glavnom modelu (slika 11) relativni rizik aseptičke



nestabilnosti endoproteze zgloba kuka pridružen genotipu T/T (pozicija 29 u kodonu *TGF-β1*) (u odnosu na genotip T/C) iznosio je 9,17, no 95% granice pouzdanosti procjene protežu se od 1,36 do 61,8. Iako je sama procjena relativnog rizika (“point estimate“) najbolji ilustrator stvarne “populacijske“ vrijednosti relativnog rizika, ipak je raspon, unutar kojeg se s 95% vjerojatnošću treba očekivati populacijsku vrijednost, prilično širok. Ta je činjenica važna jer ograničava ocjenu praktične važnosti procjene (npr. relativni rizik od 1,36 ili relativni rizik od 9,2 ili 61,8 nemaju jednaku praktičnu važnost). Međutim, svrha ovog istraživanja niti nije bila omogućiti konačan zaključak o veličini ili relativnoj važnosti učinaka genotipova na pojedinim položajima, već načelno utvrditi jesu li ili nisu pojedini od istraživanih položaja zanimljivi za daljnja veća istraživanja.

Na malom uzorku nije moguće precizno procijeniti populacijsku prevalenciju pojedinih genotipova – npr. u populaciji bolesnika s ugrađenom endoprotezom, ili u općoj zdravoj populaciji, i tako dalje.

Mali uzorak, u kombinaciji s činjenicom da su svi ispitanici imali ugrađen isti tip endoproteze (što je povoljno za stvaranje uvjeta za “nepristranu procjenu“ razlike rizika združene s pojedinim genotipovima) te da su svi u vrijeme operacije bili razmjerno mladi (tj. mlađi od 58 godina), narušava “eksternu validnost“ studije, tj. onemogućuje generalizaciju zaključaka istraživanja na “cjelokupnu populaciju bolesnika s endoprotezama zgloba kuka“.

### *11.1.3. Glavni rezultati i njihov značaj*

Najkonzistentniji nalazi ovog istraživanja su oni koji ukazuju na važnost SNP-a na poziciji 29 u kodnom području *TGF-β1* za nastanak aseptičke nestabilnosti totalne endoproteze zgloba kuka. U glavnom modelu (tablica 7, slika 14), relativni rizik

aseptičke nestabilnosti pridružen genotipu T/T (u odnosu na referentni genotip T/C) iznosio je 9,17 ( $p < 0,05$ ). U alternativnom Modelu 2 (Tablica 9, Slika 15), gdje je faktor “*TGF-β1* 29T→C“ imao dvije razine, T/T ili genotip sa C-alelom (T/C ili C/C), relativni rizik pridružen genotipu T/T je iznosio 7,92 ( $p < 0,05$ ). Također, u ostalim alternativnim modelima, relativni rizik pridružen genotipu T/T bio je značajno veći od 1. Činjenica da glavni model nije bio statistički značajan na razini alfa 0,05 ( $p = 0,121$ ), vjerojatno je posljedica činjenice da je uključivao razmjerno velik broj nezavisnih varijabli u odnosu na broj praćenih endoproteza. Isto vrijedi i za alternativni Model 2 ( $p = 0,093$ ). Međutim, svi ostali alternativni modeli (Model 1, Model 3-5), s manjim brojem nezavisnih varijabli, bili su statistički značajni, a u njima je također nađen relativni rizik pridružen genotipu T/T koji je značajno veći od 1 (u odnosu na T/C genotip ili na “prisustvo C-alela“). Stoga, uz sva spomenuta ograničenja, prikazani rezultati ukazuju da prisustvu C-alela na ovoj poziciji smanjuje rizik, odnosno da izostanak C-alela povećava rizik aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka. Ovo je prvi izvještaj o povezanosti SNP na poziciji 29 u kodirajućem području *TGF-β1* (29T→C) i aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka.

U istraživanjima koja su proučavala koštanu gustoću minerala (BMD, od engl. bone mineral density), prvenstveno u postmenopauzalnih žena, nađeno je da je prisustvo genotipa T/T na ovoj poziciji združeno s povišenom razinom *TGF-β1* u cirkulaciji, te s povećanom BMD (130). Poznato je da *TGF-β1* ima proosteoblastični učinak (6,9,77,78), te ta činjenica uzročno-posljedično “povezuje“ određeni genotip, razinu cirkulirajućeg citokina i učinak na BMD.

Koja bi bila funkcionalna veza između genotipa T/T na poziciji 29 i nastanka aseptičke nestabilnosti totalne endoproteze zgloba kuka ostaje nerazjašnjeno. Međutim,

uz pretpostavku da se genotip T/T doista može smatrati uzrokom povećane sekrecije *TGF-β1*, prikazani rezultati ukazuju da su inače potencijalno korisni učinci *TGF-β1* na koštani metabolizam, u situaciji kada postoji upalna reakcija na strane čestice, “nadvladani“, nekim drugim (npr. protupalnim) učinkom.

U promotorskom području *IL-6* identificirano je najmanje 4 polimorfna položaja, i to: -597 (G→A), -572(G→C), -373(A→T), te -174 (G→C). Do danas je demonstrirana združenost genotipova na pojedinim od ovih pozicija i različitih bolesti (121,127,157,159,172). U pre- i postmenopauzalnih žena pokazana je združenost prisustva C-alela na poziciji -572 i povećane BMD (122,129). Iako je poznato da *IL-6* sudjeluje u koštanom metabolizmu (135-140), veza između prisustva ili odsustva pojedinog alela na ovoj poziciji i BMD nije razjašnjena. Po analogiji za slučajem *TGF-β1*, moglo bi se pretpostaviti da se prisustvu C-alela odražava na sintezu i otpuštanje *IL-6*. Međutim, regulacijski utjecaj SNP-a u promotorskom području *IL-6* na transkripciju *IL-6* uključuje, kako se čini, vrlo kompleksne interakcije svih četiriju identificiranih polimorfni položaja (172).

U glavnom modelu, Modelu 1 i Modelu 2, gdje je svaka od analiziranih pozicija u promotorskom području *IL-6* (-597, -572) razmatrana kao zaseban “nezavisi čimbenik”, “efekti” ovih dvaju položaja bili su granično statistički značajni ( $0.05 < p < 0.1$ ) (tablica 7, tablica 8 i tablica 9). Najčešći genotipovi na te dvije pozicije bili su G/C, odnosno C/C. U odnosu na “necijepane homozigotne” genotipove na tim položajima (G/G), rizici aseptičke nestabilnosti združeni s najčešćim genotipovima bili su 5-6 puta manji, ali u analiziranim modelima i u ovom uzorku bili su granično statistički značajni (slika 11, slika 12, slika 13). Nedavno je pokazano da je kombinacija genotipova na pozicijama -597, -572 i -174 u promotorskom području *IL-6* prediktivna za preživljenje bubrežnog

transplantata (172). Prema analogiji na taj nalaz, u Modelu 3, Modelu 4 i Modelu 5, koji su svi bili statistički značajni ( $p < 0,05$ ), pozicije -597 i -572 nisu razmatrane kao zasebni prediktori, već je umjesto toga uveden jedan nezavisni čimbenik – kombinacija genotipova na pozicijama -597 i -572. U sva tri modela kombinaciji dvaju najčešćih genotipova na svakom od položaja (-597 G/C i -572 C/C), u odnosu “na sve ostale kombinacije”, bio je pridružen relativni rizik od oko 5.0, koji je bio statistički značajno veći od 1. Ukupno promatrajući, prikazani rezultati jasno ukazuju da su genotipovi na pozicijama -597 i -572 u promotorskom području *IL-6*, a pogotovo ako se razmatraju istodobno, kao kombinacija genotipova, prediktivni za preživljenje endoproteze do pojave aseptičke nestabilnosti. Ovo je prvi izvještaj o utjecaju SNP-a u promotorskom području *IL-6* na pojavu aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka. Funkcionalna veza između prisustva određenih genotipova na analiziranim pozicijama i nastanka aseptičke nestabilnosti ostaje nerazjašnjena.

U nedavnom istraživanju Wilkinsona i suradnika (57), kojim je po prvi put demonstrirana združenost SNP-a u genima koji kodiraju za citokine uključene u mehanizam nastanka aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka (povećan rizik pridružen prisustvu A-alela na poziciji -238 u promotorskom području *TNF- $\alpha$ 1*), ispitana je i združenost prisustva A-alela na poziciji -308 i rizika za razvoj ove komplikacije. Zaključeno je da je identificiran samo “slabi trend” združenosti prisustva ovog alela i aseptičke nestabilnosti (57).

U prikazanom istraživanju, nažalost, samo su dva ispitanika imali genotip G/G na poziciji -308. Stoga, nije bilo moguće procijeniti relativni rizik aseptičke nestabilnosti koji nosi prisustvo A-alela. Međutim, u svim analiziranim modelima glavni “efekt” čimbenika “*TNF- $\alpha$ 1 -308*“ bio je statistički značajan ( $p < 0,05$ ). Vjerojatno je to

posljedica činjenica da su u oba ispitanika endoproteze (dvije) ocijenjene stabilnima i nakon 17 godina praćenja. Wilkinson i suradnici demonstrirali su i to, da između pozicije -238 i pozicije -308 ne postoji nikakva povezanost (“linkage”) te se opaženi “efekt” ne može pripisati utjecaju pozicije -238, već se doista može smatrati “efektom” pozicije -308. Ostaje nerazjašnjeno koja bi bila priroda funkcionalne veze genotipa na ovoj poziciji i pojave aseptičke nestabilnosti. Genotip na poziciji -308 prediktivan je za nastanak različitih upalnih bolesti (191,192,193). Rezultati prikazani u ovoj disertaciji ukazuju da je moguću združenost genotipova na ovoj poziciji i aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka potrebno dodatno istražiti.

## **11.2. Povezanost polimorfizma istraživanih gena i nastanka razvojnog poremećaja zgloba kuka**

Razvojni poremećaj zgloba kuka je glavni čimbenik rizika za nastanak sekundarnog osteoartritisa zgloba kuka, a ujedno i najvažniji čimbenik koji vodi k potrebi ugradnje totalne endoproteze zgloba kuka (190,194). Razvojni poremećaj zgloba kuka češći je kod osoba ženskog spola, no radi se o multifaktorijskom poremećaju koji se može očitovati raznolikom kliničkom slikom.

Prema javno dostupnim izvorima informacija, do sada nema publiciranih istraživanja u kojima bi se ispitala združenost polimorfizama u citokinskim genima, dakle i onima koje smo analizirali u ovoj disertaciji i razvojnog poremećaja zgloba kuka. Pretpostavka da bi između tih polimorfizama i ove bolesti mogla postojati povezanost, a na kojoj smo temeljili svoje istraživanje, zasnovana je na činjenici da su *TGF-β1* (195-197) i *IL-6* (198-202) identificirani kao potencijalno važni medijatori u razvoju osteoartritisa. Pored toga, pokazano je da *TGF-β1* sudjeluje u razvoju koštanog i

hrskavičnog tkiva (203). Slično je pokazano i za *IL-6* – miševi s povećanom cirkulirajućom razinom ovog citokina pokazuju poremećaje u razvoju koštanog sustava (204).

### ***11.2.1. Svojstva provedenog istraživanja i glavni rezultati***

Dio istraživanja koji se odnosi na moguću združenost genotipova na 4 istraživana položaja i postojanje razvojnog poremećaja zgloba kuka zamišljen je kao posve preliminarno istraživanje. Sukladno tome, skupina oboljelih, kao i skupina zdravih dragovoljaca, je mala. Glavni nedostatak koji proistječe iz te činjenice jest da se na temelju malog i nereprezentativnog uzorka ne može zaključiti o stvarnoj populacijskoj prevalenciji (“zdrava opća populacija“) pojedinog genotipa ili alela. Osim toga, svi bolesnici s razvojnim poremećajem kuka imali su i ugrađene endoproteze, tj. kod svih je nastao sekundarni osteoartritis koji je zahtijevao ugradnju endoproteze. Stoga, nije moguće razlučiti je li određena (potencijalna) združenost nekog genotipa/alela doista združenost s postojanjem poremećaja (razvojni poremećaj kuka) ili pak s poremećajem koji rezultira teškim sekundarnim osteoartritisom (za razliku od poremećaja koji ne rezultira osteoartritisom i indikacijom za ugradnju endoproteze). Ipak, slijedeći logiku kako za sada ne postoje niti preliminarne informacije o mogućoj vezi istraživanih gena i razvojnog poremećaja zgloba kuka, zaključili smo da bi eventualni nalaz nekog “značajnog efekta određenog genotipa” i u ovim uvjetima mogao biti indikativan i ukazati na opravdanost daljnjih istraživanja.

Kao najkonzistentniji nalaz u prikazanom istraživanju ističe se združenost prisustva C-alela na poziciji 29 u kodnom području *TGF-β1* i prisustva razvojnog poremećaja zgloba kuka (tablica 14 do tablica 19) – u svim analiziranim modelima ispitanici s razvojnim poremećajem zgloba kuka imali su višestruko veću (i statistički

značajno veću) šansu da imaju C-alel, bilo kao genotip T/C, bilo kao genotip C/C. Taj je nalaz bio konzistentan i kada je faktor “*TGF-β1* pozicija 29” razmatran kao čimbenik s tri razine (T/T, T/C ili C/C), ili kada je razmatran kao čimbenik s dvije razine (T/T vs. prisustvo C-alela). Ovaj nalaz sugerira da, za razliku od nastanka aseptičke nestabilnosti endoproteze zgloba kuka, prisustvo C-alela povećava rizik razvojnog poremećaja zgloba kuka. U tom smislu, nalaz podupire daljnja istraživanja – i ona koja bi konačno odgovorila na pitanje povećava li prisustvo C-alela doista rizik razvojnog poremećaja zgloba kuka, kao i ona koja bi imala za cilj istražiti funkcionalnu podlogu takve povezanosti.

Genotipovi na pozicijama -597 i -572 u promotorskom području *IL-6* nisu, kada su razmatrani zasebno (tablica 14, tablica 15), u ovom uzorku identificirani kao potencijalno relevantni “prediktori” razvojnog poremećaja zgloba kuka. Međutim, kada je u analizu, umjesto svakog pojedinačnog položaja, uveden čimbenik “kombinacija genotipova na poziciji -597 i -572, s dvije razine (G/A | C/C, koja je bila najčešća u skupini oboljelih, naspram “svih ostalih kombinacija”), nađeno je da ispitanici s razvojnim poremećajima imaju višestruko veću (i statistički značajno veću) šansu da na ove dvije pozicije imaju upravo tu kombinaciju genotipova. Uza sva ograničenja i nedostatke ovog istraživanja, smatramo da ovaj nalaz podupire potrebu za daljnjim istraživanjem SNP-a u promotorskom području *IL-6* kao potencijalnog čimbenika rizika (“prediktora”) razvojnog poremećaja zgloba kuka.

Prema prikazanim rezultatima, mala je vjerojatnost da bi SNP, u promotorskom području *TNF-α1* na poziciji -308, mogao biti relevantan čimbenik rizika razvojnog poremećaja zgloba kuka.

Zaključno, ovim istraživanjem dobili smo preliminarne rezultate koji ne osiguravaju generalizaciju, ali nas mogu usmjeravati u daljnjim istraživanjima.



## 12. ZAKLJUČAK

U zaključku, treba istaći kako je ovo retrospektivno prognostičko istraživanje kombinirano s presječnom (“cross-sectional”) analizom genotipa prvo takvog tipa na bolesnicima s ugrađenim endoprotezama zgloba kuka. Preliminarni rezultati ukazuju na potrebu za daljnim istraživanjem, kako bi se, s znatno većim brojem ispitanika, dobila potvrda njih samih. Potvrda ovih preliminarnih rezultata mogla bi uvesti ovu metodu u svrhu otkrivanja eventualne povezanosti određenih genotipa s preživljenjem endoproteze zgloba kuka i povezanosti određenih genotipa s nastankom razvojnog poremećaja kuka.

### 12.1 Zaključci iz primarnog cilja istraživanja

- vrijeme praćenja bolesnika/endoproteza iznosilo je od 5 do 18 godina (medijan 15 godina)
- u desetoj godini postoperativnog praćenja kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti iznosio je 0,091 ili 9,1%, u petnastoj godini postoperativnog praćenja kumulativni rizik aseptičke nestabilnosti iznosio je 0,489 ili 48,9%
- nađen je statistički značajan “glavni učinak“ čimbenika “gen TNF- $\alpha$  na položaju -308“, no nije bilo moguće procijeniti relativni rizik za genotip G/G u odnosu na prisustvo “A-alela“ zbog relativno malenog broja ispitanika;
- nađen je statistički značajno veći rizik združen s genotipom T/T na položaju 29 u genu TGF- $\beta$ 1 u odnosu na najčešći genotip na tom položaju (T/C), odnosno u odnosu na genotipove koji uključuju “C-alel“;
- nađen je statistički značajno ili graničano značajno veći rizik združen s genotipoma G/A na položaju -597 u genu IL-6, odnosno s genotipom C/C na položaju -572 u istom području;

- nađen je značajno veći rizik združen s kombinacijom genotipova G/A - 597 / C/C -572 u genu IL-6 u odnosu na ostale kombinacije genotipova na ta dva položaja
- rizik aseptičke nestabilnosti endoproteze je oko 30% do 60% manji kada je razlog za endoprotezu bilo neko drugo stanje, a ne DDH (u odnosu na DDH), uz “dobar” inklinacijski kut (u odnosu na “loš“), uz indeks tjelesne mase <26 (u odnosu na ≥26) i kod žena (u odnosu na muškarce)

## **12.2 Zaključci iz sekundarnog cilja istraživanja**

- očekivana je združenost ženskog spola i razvojnog poremećaja zgloba kuka;
- nađena je združenost prisustva C-alela (kao T/C ili C/C genotip) na položaju 29 u kodnom području gena za TGF-beta1 i razvojnog poremećaja zgloba kuka;
- na položaju -572 u genu IL-6 genotip C/C je združen s prisustvom razvojnog poremećaja zgloba kuka, osobito ako dolazi “u kombinaciji” s genotipom G/A na položaju -597.

### 13. SAŽETAK

Ovo istraživanje je retrospektivno prognostičko istraživanje kombinirano s presječnom (“cross-sectional”) analizom polimorfizama na položaju -597 u genu *IL-6*, na položaju -572 u genu *IL-6*, na položaju 29 u genu *TGF-β1* te na položaju -308 u genu *TNF-α1*. kod bolesnika kojima je ugrađena endoproteza zgloba kuka.

U istraživanje su bile uključene dvije skupine ispitanika: 41 bolesnik s ukupno 45 endoproteza i 20 zdravih dobrovoljaca.

Primarni parametar istraživanja bilo je vrijeme (izraženo u godinama), od trenutka ugradnje endoproteze zgloba kuka do postavljanja dijagnoze aseptičke nestabilnosti endoproteze s indikacijom za reviziju, odnosno do zaključne procjene, ovisno koji od ta dva događaja nastupi prvi.

Analiza polimorfizama napravljena je na genomskoj DNA ispitanika, korištenjem metode lančane reakcije polimeraze (PCR) i određivanjem različitih restrikcijskih ulomaka (RFLP) s određenim restrikcijskim endonukleazama – *IL-6 Fok1* i *BsrB1*, a *TNF-α1 - Nco1*.

Rezultati istraživanja, u primarnom cilju, ukazuju: da je statistički značajan “glavni učinak” čimbenika “*TNF-α1* položaj -308“, ali nije bilo moguće procijeniti relativni rizik za genotip G/G u odnosu na prisustvo “A-alela“ zbog relativno malenog broja ispitanika; da je statistički značajno veći rizik združen s genotipom T/T na položaju 29 u genu *TGF-β1* u odnosu na najčešći genotip na tom položaju (T/C), odnosno u odnosu na genotipove koji uključuju “C-alel”; statistički značajno ili granično značajno veći rizik združen s genotipom G/A na položaju -597 u genu *IL-6*, odnosno s genotipom C/C na položaju -572 u istom području; nađen je značajno veći rizik združen s kombinacijom

genotipova G/A -597 / C/C -572 u genu *IL-6* u odnosu na ostale kombinacije genotipova na ta dva položaja.

Rezultati istraživanja, također, ukazuju: na združenost prisustva C-alela (kao T/C ili C/C genotip) na položaju 29 u kodirajućem području *TGF-β1* i razvojnog poremećaja zgloba kuka; da je na položaju -572 u genu za *IL-6* genotip C/C združen s razvojnim poremećajem zgloba kuka, osobito ako dolazi “u kombinaciji” s genotipom G/A na položaju -597.

## 14. SUMMARY

This research is a retrospective prognostic research combined with a “cross-sectional” polymorphic analysis on position -597 within the gene *IL-6*, position -572 within the gene *IL-6*, position 29 within the gene *TGF-β1* and position -308 within the gene *TNF-α1* in patients who have had implantation of an endoprosthesis of the hip joint.

There were two groups of respondents included in the research: 41 patients with a total of 45 endoprostheses and 20 healthy volunteers.

The primary research parameter was the time (expressed in years), from the moment when an endoprosthesis of the hip joint was implanted until the diagnosis of aseptic instability of the endoprosthesis with an indication for revision, that is until the final assessment, depending on which of these actions happened first.

The polymorphic analysis was conducted on the genome DNA of respondents by using the method of polymerase (PCR) chain reaction and determining various restriction fragments (RFLP) with distinct restriction endonucleases – *IL-6* with *Fok1* and *BsrB1*, and *TNF-α1* with *Nco1*.

Results of this research, in its primary goal, show that: the “main effect“ of factors in the gene *TNF-α1* on position -308 is statistically relevant, but due to small number of the patients, it was not possible to assess relative risk for genotype G/G comparing to the presence of “A-alel“; statistically, there is much greater risk combined with the genotype T/T on position 29 in the gene *TGF-β1* with respect to the most common genotype on that position (T/C), that is with respect to genotypes that include the “C-allele“; that it is statistically significant or of bordering significance greater risk combined with the genotype G/A on the position -597 within the gene *IL-6*, that is with the genotype C/C on position -572 in the same area; much greater risk has been found in

association with a combination of genotypes G/A -597 / C/C -572 in the gene *IL-6* with respect to other genotype combinations on these two positions.

Results of the research also indicate: a larger incidence of developmental hip joint disorder; that the smallest probability of a combined genotype and developmental hip joint disorder is to be found with the genotype T/T on position 29 in the area coded *TGF-β1* with respect to genotypes containing the “C-allele” (T/C or C/C); that on position -572 in the gene for *IL-6* genotype C/C is associated with a larger probability of developmental hip joint disorder, especially if “combined“ with the genotype G/A on position -597.

**Title: “ASSOCIATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN GENE INTERLEUKIN 6 (*IL-6*), TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA (*TNF-A1*) AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 (*TGF-β1*) WITH STABILITY OF THE TOTAL HIP ENDOPROSTHESIS”**

**Robert Kolundžić, 2006.**

## 15. LITERATURA

1. Orlić D. Aloartroplastika kuka. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1986.
2. Crowther JD, Lachiewicz PF. Survival and polyethylene wear of porous-coated acetabular components in patients less than fifty years old - Results at nine to fourteen years. *J Bone Joint Surg (Am)* 2002;84:729-35.
3. Maloney WJ, Peters P, Engh CA, Chandler H. Severe osteolysis of the pelvic in association with acetabular replacement without cement. *J Bone Joint Surg (Am)* 1993;75:1627-35.
4. Santavirta S, Nordstrom D, Metsarinne K, Konttinen YT. Biocompatibility of polyethylene and host response to loosening of cementless total hip replacement. *Clin Orthop* 1993;297:100-10.
5. Willert HG, Bertram H, Buchholt GH. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip: The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop* 1990;258:95.
6. Editorial. Cytokines and bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 1993;53:293-6.
7. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Cellular mediators secreted by interfacial membranes obtained at revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 1995;10:498-506.
8. Greenfield EM, Bi YM, Ragab AA, Goldberg VM, Van de Motter RR. The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening. *J Orthop Res* 2002;20:1-8.
9. Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KA, Glant TT. The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83:201-11.

10. Chiba J, Maloney WJ, Inoue K, Rubash HE. Biochemical analyses of human macrophages activated by polyethylene particles retrieved from interface membranes after failed total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 2001;16:101-5.
11. Takagi M, Santavirta S, Ida H, Ishii M, Takei I, Niissalo S, Ogino T, Konttinen YT. High-turnover periprosthetic bone remodeling and immature bone formation around loose cemented total hip joints. *J Bone Miner Res* 2001;16:79-88.
12. Gallo J, Kaminek P, Ticha V, Rihakova P, Ditmar R. Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: a review. *Biomed Papers* 2002;146:21-8.
13. Wilkinson MJ, Hamer AJ, Rogers A, Stockley I, Eastell R. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in aseptic loosening after total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 2003;21:691-6.
14. Aamodt A, Nordsletten L, Havelin LI, Indrekvam K, Utvag SE, Hviding K. Documentation of hip prostheses used in Norway: a critical review of the literature from 1996-2000. *Acta Orthop Scand* 2004;75:663-76.
15. Eskelinen A, Remes V, Helenius I, Pulkkinen P, Nevalainen J, Paavolainen P. Total hip arthroplasty for primary osteoarthritis in younger patients in the Finnish arthroplasty register. *Acta Orthop* 2005;76:28-41.
16. Rehn E. Zur Wiederherstellungschirurgie der Gelenke. *Arch. Klin. Chir.* 1934;180:395. Citirano od Morscher EW *Clin. Orthop.* 1983;181:77.
17. Wiles P. 1938, Citirano od Leinbach I S. Personal communication 1982. Citirano od Morscher EW *Clin. Orthop.* 1983;181:77.
18. Judet J, Judet R. The use of artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint. *J Bone Joint Surg (Br)* 1950;32:166.



19. Moore AT. A metal hip joint, a new self-locking Vitallium prosthesis. South. Med J. 1952;45:1015. Citirano od Morscher EW Clin. Orthop. 1983;181:77.
20. Thompson FR. Two and a half years experience with a Vitallium intramedullary hip prosthesis. J Bone Joint Surg (Am) 1954;36:489.
21. McKee GK. Development of total prosthetic replacement of the hip. Clin. Orthop. 1970;72:85.
22. Sivash KM. The development of a total metal prosthesis for the hip joint from a partial joint replacement. Reconstr. Surg. Traumatol. 1969;11:53.
23. Ring PA. Complete replacement arthroplasty of the hip by the Ring prosthesis. J Bone Joint Surg (Br) 1968;50:720.
24. Charnley J. Fractures of femoral prosthesis in total hip replacment: A clinical study. Clin Orthop 1975;111:105-20.
25. Solomon L. Hip replacement. Prosthetic fixation. Current Orthop. 1992;6:154.
26. Charnley J. Acrylic cement in orthopaedic surgery. Edinburgh: Livingstone; 1970.
27. Harris WH, Schillen AL, Schollen JM i sur. Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. J Bone Joint Surg (Am) 1976;58:612-8.
28. Willert HG, Buchhort GH, Semlitsch M. Die Reaktion des Gewebes auf Verschleissprodukte von Gelenkendothesen der oberen Extremitäten. Orthopaede 1980;9:94-107.
29. Griffiths HJ, Burke J, Bonfiglio TA. Granulomatous pseudotumors in total joint replacement. Skeletal Radiol 1987;16:146-52.

30. Willert HG, Semlitsch M. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 1977;11:157-64.
31. Goldring SR, Schiller AL, Roelke M i sur. The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg (Am)* 1983;65:575-84.
32. Goldring SR, Clark CR, Wright TM. The problem in total joint arthroplasty: Aseptic loosening. *J Bone Joint Surg (Am)* 1993;75:799-801.
33. Jasty MJ, Floyd W, Schiller A, Goldring SR, Harris W. Localized osteolysis in stable non-septic total hip replacement. *J Bone Joint Surg (Am)* 1986;68:912-9.
34. Maloney WJ, Jasty M, Rosenberg A, et al. Bone lysis in well fixed cemented femoral components. *J Bone Joint Surg (Br)* 1990;72:966-70.
35. Jasty MJ, Maloney WJ Bragdon CR. The initiation of failure in cemented femoral components of hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg (Br)* 1991;73:551-8.
36. Jones LC, Hungerford DS. Cement disease. *Clin Orthop* 1987;225:192-206.
37. Maloney WJ, Jasty M, Harris WH. Endosteal erosion in association with stable cementless femoral components. *J Bone Joint Surg (Br)* 1990;72:1025-34.
38. Xenos JS, Hopkinson WJ, Calghan JJ i sur. Osteolysis around an uncemented cobalt chrome total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1995;317:29-36.
39. Beauchensne RP, Kukita Y, Knezevich S i sur. Roentgenographic evaluation of the AML porous-coated acetabular component: A six-year minimum follow up study. *Orthopaedic Transaction* 1992;16:749.
40. Cameron HU (urednik). The technique of total hip arthroplasty. *Prosthaesis Selection*. Toronto: Mosby-Year Book; 1992.

41. Rorabeck CH, Bourne RB, Laupacis A i sur. A doubleblind study of 250 cases comparing cemented with cementless total hip arthroplasty: Cost-effectiveness and its impact on health-related quality of life. Clin Orthop 1994;298:156-64.
42. Scmalzried TP, Harris WH. Hybrid total hip replcement: A 6,5-year follow-up study. J Bone Joint Surg (Br) 1993;75:608-15.
43. Charnley J (urednik). Low-friction arthroplasty of the hip. Theory and practice. London: Springer; 1979.
44. Endler M. Theoretische – Experimantelle Grundlagen und erste neuen zementfreien Polyethylenschraubpfanne beim Hüftgelenkersatz. Acta Chir. Aust. 1982;45:1.
45. Furnes O, Lie SA, Espehaug B, Vollset SE, Engesaeter LB, Havelin LI. Hip diseas and the prognosis of total hip replacements. A review of 53698 primary total hip replacements reported to the Norweigian arthroplasty register 1987-99. J Bone Joint Surg (Br) 2001;83:579-86.
46. Schulitz K P, Dustmann H O. Komplikationen der Totalendoprothese. Arch Orthop Unfallchir 1976; 85 (1):33-50.
47. Morrey BF. Instability after total hip arthroplasty. OCNA 1992;23:237-48.
48. Krugluger J, Eyb R. Bone reaction to uncemented threaded polyethylene acetabular components. Int Orthop 1993;17:259-65.
49. Masri BA, Masterson EL, Duncan CP. The clasification and radiographic evaluation of bone loss in revision hip arthroplasty. OCNA 1998;29:219-37.
50. Paprosky WG, Magnus RE. Principles of bone grafting in revision total hip arthroplasty: Acetabular technique. Clin Orthop 1994;298:147-55.

51. Hernandez JR, Keating EM, Faris PM i sur. Polyethylene wear in uncemented acetabular components. *J Bone Joint Surg (Br)* 1994;76:263-6.
52. Garcia-Cimbrelo E, Munuera L. Early and late loosening of the acetabular cup after low-friction arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Am)* 1992;74:1119-29.
53. Schmalzried TP, Jasty M, Harris WH. Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Am)* 1992;74:849-63.
54. Lombardi AV, Mallory TH, Vaugh BK, Drouliiard P. Aseptic loosening in total hip arthroplasty secondary to osteolysis induced by wear debris from titanium-alloy modular femoral heads. *J Bone Joint Surg (Am)* 1989;71:1337-42.
55. Jones LC, Hungerford DS. Cement disease. *Clin. Orthop.* 1987;225:192-206.
56. Murray DW, Rushton N. Macrophages stimulate bone resorption when they phagocyte particles. *J Bone Joint Surg (Br)* 1990;72:988-92.
57. Wilkinson JM, Wilson AG, Stockley I, Scott IR i sur. Variation in the TNF gene promoter and risk of osteolysis after total hip arthroplasty. *J Bone Miner Res* 2003;18:1995-2001.
58. Malchau H, Herberts P, Eisler T, Garellick G, Soderman P. The Swedish total hip replacement register. *J Bone Joint Surg (Am)* 2002;84:Suppl 2:2-20.
59. Smith PN, Ling RSM, Taylor R. The influence of weight-bearing on the measurement of polyethylene wear in THA. *J Bone Joint Surg (Br)* 1999;81:259-65.
60. Kolundžić R, Šulentić M, Smerdelj M, Orlić D, Trkulja V. Stability of endler cementless polyethylene acetabular cup: long-term follow-up. *CMJ* 2005; 46:261-7.

61. Kordelle J, Starker M. Migration analysis of cemented Muller polyethylene acetabular cups versus cementfree Zweymuller screw-attached acetabular cups. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2000;138:46-51.
62. Smabrekke A, Espehaug B, Havelin LI, Furnes O. Operating time and survival of primary total hip replacements. An analysis of 31745 primary cemented and uncemented total hip replacements from local hospitals reported to the Norwegian Arthroplasty Register 1987-2001. *Acta Orthop Scand* 2004;75:524-32.
63. Eskelinen A, Remes V, Helenius I, Pulkkinen P, Nevalainen J, Paavolainen P. Uncemented total hip arthroplasty for primary osteoarthritis in young patients: a mid- to longterm follow-up study from the Finnish Arthroplasty Register. *Acta Orthop.* 2006;77:1:57-70.
64. Puolakka TJS, Pajamäkil KJJ, Halonen PJ, Pulkkinen PO, Paavolainen P, Nevalainen JK. The Finnish Arthroplasty Register Report of the hip register. *Acta Orthop Scand* 2001;72:5: 433–41.
65. Loveridge N. Bone: More than a stick. *J Anim Sci* 1999;77:2:190-6.
66. Turner CH, Pavaiko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanism and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 1998;3:6:346-55.
67. Udagawa N. Mechanism in bone resorption. *Biogerontology* 2002;3:1:2:79-83.
68. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8:147–59.
69. Martinović S. Koštani morfogenetski proteini u diferencijaciji osteoblastičnih stanica MC3T3-E1. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2001.

70. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 2000;21:2:115–37.
71. Bonewald LF. Osteocytes: A proposed multifunctional bone cell. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002;2 :3:239-41.
72. Gregurević L. Karakterizacija koštanih morfogenetskih proteina u biološkim tekućinama. Magistarski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2001.
73. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998;22:591-603.
74. Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three paradigm for the transforming growth factor 6 superfamily. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:878-83.
75. Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Oppermann H. Murine osteogenic protein (OP-1): High levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;179:116-23.
76. Lacey DL, Timms E, Tan HL i sur. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165–76.
77. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N i sur. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1998;95:3597–602.
78. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E i sur. Osteoblastic/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. *Bone* 1999;25:5:517-23.

79. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E i sur. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 2000; 191:2:275-86.
80. Troe BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Experimental Gerontology* 2003;38:605–14.
81. Fox SW, Fuller K, Chambers TJ. Activation of osteoclasts by interleukin-1: divergent responsiveness in osteoclasts formed in vivo and in vitro. *J Cell Physiol* 2000;184:3:334-40.
82. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteocites. *Science* 2000; 289:1504-8.
83. Suda T, Kobayashi K, Jimi E, Udagawa N, Takahashi N. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp* 2001;232:235-50.
84. Koretic-Basic M, Basic-Jukic N. Bone remodeling by osteoclasts: what have we learned from gene knockout studies. *Acta Clin Croat* 2001;40:47-55.
85. Martin TJ. Bone cell physiology. *Endo metabol Clinics North Am* 1989;18:83-5.
86. Marcus R. Endocrine control of bone and mineral metabolism. U: *Metabolic bone and mineral disorders*, urednici: manolagas SC, Olefsky JM, izdavač Churchill Livingstone, New York, 1988.
87. Mundy GR. Immune system and bone remodeling. *Trends Endocrinol Metab.* 1990;1:307-11.
88. Vukičević S, Paralkar VM, Reddi AH. Extracellular matrix and bone morphogenetic proteins in cartilage and bone development and repair. *Adv Mol Cell Biol* 1993;6:207-24.
89. Peck WA, Woods WL. The cells of bone. U: Riggs BL, Melton LJ (urednici). *Osteoporosis*. Raven Press, New York, 1988, str. 1-44.

90. Korchynsky O, ten Dijke P. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation. U: Vukicevic S, Sampath KT (urednici). Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002.
91. Nakao A, Imamura T, Souchelnytski S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Kanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- $\beta$  receptor mediated signalling through Smad 2, Smad 3, and Smad 4. EMBO J 1997; 16: 5353-62.
92. Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. Skeletal progenitor cells and ageing human populations. Clin Sci 1988;94:5:549-55.
93. Hundrić Hašpl Ž. Citokini kao biljeg razgradnje koštanog tkiva nakon ugradnje endoproteza velikih zglobova. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2004.
94. Zergollern Lj (urednik) i sur. Humana genetika. 3. popr. i dop. izdanje izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 1994.
95. Cox TM, Sinclair J (urednici). Molekularna biologija u medicini. 1. hrvatsko izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 2000.
96. Li W-H, Grauer D. Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland MA 1991.
97. <http://www.wellcome.ac.uk/en/genome/thegenome/hg04b005.html>
98. <http://www.wellcome.ac.uk/en/genome/thegenome/hg04b001.html>
99. Jadan M. Otkrivanje i analiza polimorfizama jednog nukleotida tehnologijom lightcycler. Biochemia Medica 2004;14:109-17.



100. Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 1997;278:1580-1.
101. Risch N. The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:733-41.
102. Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past. . . *Nature* 2001;409:821-2.
103. Chakravarti A. Single nucleotide polymorphisms:... to a future of genetic medicine. *Nature* 2001;409:822-3
104. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S i sur. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-33.
105. Venter JC, Adams MD, Myers EW i sur. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
106. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234:177-86.
107. Nachman MW, Bauer VL, Crowell SL, Aquadro CF. DNA variability and recombination rates at X-linked loci in humans. *Genetics* 1998;150:3:1133-41.
108. Clifford RJ, Edmonson MN, Nguyen CU, Scherpbier T i sur. Bioinformatics tools for single nucleotide polymorphism discovery and analysis. *Ann NY Acad Sci* 2004;1020:101-9.
109. Matsuzaki H, Loi H, Dong S i sur. Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a One-Primer Assay on a High-Density Oligonucleotide Array. *Genome Res* 2004;14:414-25.

110. Istrail S, Sutton GG, Florea L i sur. Whole-genome shotgun assembly and comparison of human genome assemblies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1916 – 21.
111. Nakashima Y, Okano K, Kojima K, Shirakura H i sur. Convenient single-nucleotide polymorphism typing from whole blood by probe extension and bioluminescence detection. *Clinical Chemistry* 2004;50:1417-20.
112. [http://www.aid-dagnostika.com/english/kits/GenID/genid\\_e.htm](http://www.aid-dagnostika.com/english/kits/GenID/genid_e.htm)
113. Pavelić J. Lančana reakcija sinteze DNA pomoću DNA polimeraze. U: Pavelić K, Spaventi R. *Molekularna onkologija*. Zagreb: Globus, Nakladni zavod, 1992.
114. Saiki RK. Amplification of genomic DNA. U: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990; 13-20.
115. Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. U: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990; 3-12.
116. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB i sur. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
117. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML i sur. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-65.
118. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD i sur. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-

specific mRNA sequences amplified in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1987;85:5698-702.

119. Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. Mut Res 1988;195:255-71.
120. Begovich AB, Bugawan TL, Nepom BS, Klitz W i sur. A specific HLA-DP beta allele is associated with pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis but not adult rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:9489-93.
121. Jinks DC, Minter M, Tarver Dam Vanderford M, Hejtmancik JF, McCabe ER. Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. Hum Genet 1989;81:363-6.
122. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Duboeuf F i sur. Association between a functional interleukin – 6 gene polymorphism and peak bone mineral density and postmenopausal bone loss in women. The OFELY study. Bone 2002;31:43-50.
123. Um JY, Park JH, Kim HM. Gene polymorphisms in tumor necrosis factor locus and waist-hip ratio in obese Koreans. Clin Chim Acta 2003;338:117-22.
124. Aerssens J, Dequeker J, Peeters J, Breemans S, Boonen S. Lack of association between osteoarthritis of the hip and gene polymorphism of VDR, COL1A1 and COL2A1 in postmenopausal women. Arthritis Rheum 1998;41:1946-50.
125. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T i sur. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. J Hum Genet 2001;46: 267-72.

126. Granchi D, Stea S, Sudanese A, Toni A, Baldini N, Giunti A. Association of two gene polymorphisms with osteoarthritis secondary to hip dysplasia. *Clin Orthop* 2002;403:108-17.
127. Fiorito S, Magrini L, Goalard C. Pro-inflammatory and anti-inflammatory circulating cytokines and periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg (Br)* 2003; 85:1202-6.
128. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrai S i sur. Interleukin-6 gene -174G>C and -572G>C promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1458-63.
129. Chung HW, Seo JS, Hur SE, Kim HL i sur. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women. *Hum Genet* 2003; 48:243-8.
130. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 1999; 66:562-6.
131. Hinke V, Seck T, Clanget C, Scheidt-Nave C, Ziegler R, Pfeilschifter J. Association of transforming growth factor -  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) T29 —C gene polymorphism with bone mineral density (BMD), changes in BMD, and serum concentrations of TGF $\beta$ 1 in a population-based sample of postmenopausal German women. *Calcif Tissue Int* 2001;69:315-20.
132. Thomson AW. *The cytokine handbook*. 2. izd. London: Academic Press,1994.

133. Paraskevas F. Cell interactions in the immune response. U: Lee (urednik): Wintrobe's Clinical Hematology. 10. izd. Philadelphia: Lippincott, Williams i Wilkins, 1999.
134. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T i sur. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324:73-6.
135. Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* 1987;6:2939-45.
136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=147620>  
(21.03.2006)
137. Ming JE, Cernetti C, Steinman RM, Granelli-Piperno A. Interleukin 6 is the principal cytolytic T lymphocyte differentiation factor for thymocytes in human leukocyte conditioned medium. *J Mol Cell Immunol* 1989;4:203-11.
138. Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA i sur. A genetic variation of the inflammatory cytokine IL-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45:666-8.
139. Kikutani H, Taga T, Akira S, Kishi H i sur. Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J Immuno* 1985;134:2:990-5.
140. Raynal MC, Liu ZY, Hirano T, Mayer L i sur. Interleukin 6 induces secretion of IgG1 by coordinated transcriptional activation and differential mRNA accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:8024-8.

141. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T i sur. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1988;232:347-50.
142. Boulanger MJ, Chow D, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 2003;300: 2101-4.
143. Ota N, Hunt SC, Nakajima T, Suzuki T i sur. Linkage of interleukin 6 locus to human osteopenia by sibling pair analysis. *Hum Genet* 1999;105: 253-7.
144. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T i sur. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. *J Hum Genet* 2001;46:267-72.
145. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A i sur. Interleukin 6: a potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 1992;89:46-52.
146. Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Woitge H i sur. Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J Clin Endocr Metab* 2001;86: 2032-42.
147. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984;312:724-9.
148. Kerby JA, Hattersley G, Collins DA, Chambers TJ. Derivation of osteoclasts from hematopoietic colony-forming cell in culture. *J Bone Miner Res* 1992;7:353-62.

149. Fitzgerald AK, Oneil LAJ, Gearing AJH, Callard RE. The cytokine fact Bock. 2 izd London, Academic Press, 2001.
150. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=191160>
151. Ibelgaufs H. Citokine Online Pathfinder Encyclopedia (COPE). <http://copewithcytokines.de/cope.cgi.2222> Version 15.8 (21.03.2006)
152. Abbas AK, Lichtman AH, Pober SY. Cellular and molecular immunology. 2. izd. London, Toronto, W.B.Sounders Company, 1994.
153. Mulcahy B, Waldron-Lynch F, McDermott MF, Adams C i sur. Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 1996;59:676-83.
154. Ota N, Hunt SC, Nakajima T, Suzuki T i sur. Linkage of human tumor necrosis factor-alpha to human osteoporosis by sib-pair analysis. *Genes Immunity* 2000;1:260-4.
155. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=190180>
156. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 1990;63:245-7.
157. Arrick BA, Korc M, Derynck R. Differential regulation of expression of three transforming growth factor beta species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res* 1990;50:299-303.
158. Bategay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 1990;63:515-24.

159. Dickinson ME, Kobrin MS, Silan CM, Kingsley DM i sur. Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. *Genomics* 1990;6:505-20.
160. Qian X, Jin L, Lloyd RV. Expression and regulation of rransforming growth factor  $\beta$ 1 in cultured normal and neoplastic rat pituitary cells. *Endocr Pathol* 1996;7:77-90.
161. Jonson T, Albrechtsson E, Axelson J, Heidenblad M i sur. Altered expression of TGF- $\beta$  receptors and mitogenic effects of TGF-  $\beta$  in pancreatic carcinomas. *Int J Oncol.* 2001;19:1:71-81.
162. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 1986; 4763:532-4.
163. Dodson WC, Schomberg DW. The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1987;120:512-6.
164. Loyd RV. Growth factors. *Endocr Pathol* 1997;8:121-7.
165. <http://www.ebi.uniprot.org>
166. Derynck R, Rhee L, Chen EY, van Tilburg A. Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene. *Nucleic Acids Res* 1987;15:3188-9.
167. Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T i surKishino T. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and its signaling pathway. *J Hum Genet* 2002;47:478-83.



168. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 1986;137:3855-60.
169. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ i sur. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6020-4.
170. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 1986;4763:532-4.
171. Poli F, Piccolo G, Scalamogna M. Genetic polymorphisms influencing therapy and susceptibility to rejection in organ allograft recipients. *BioDrugs* 2002;16:11-7.
172. Muller-Steinhardt M, Fricke L, Muller B, Ebel B, Kirchner H, Harter C. Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant* 2004;4:402-6.
173. Alakulppi NS, Kyllonen LE, Jantti VT, Matinlauri IH i sur. Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 2004;78:1422-8.
174. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998;66:1014-20.

175. Aziz T, Hasleton P, Hann AW, Yonan N, Deiraniya A, Hutchinson IV. Transforming growth factor beta in relation to cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119:700-8.
176. Gourley IS, Denofrio D, Rand W, Desai S, Loh E, Kamoun M. The effect of recipient cytokine gene polymorphism on cardiac transplantation outcome. *Hum Immunol* 2004;65:248-54.
177. Densem CG, Hutchinson IV, Yonan N, Brooks NH. Donor and recipient-transforming growth factor-beta 1 polymorphism and cardiac transplant-related coronary artery disease. *Transpl Immunol* 2004;13:211-7.
178. Campos MI, Godoy dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. *Implant Dent* 2005;14:391-6.
179. Campos MI, dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Early failure of dental implants and TNF-alpha (G-308A) gene polymorphism. *Implant Dent* 2004;13:95-101.
180. Dos Santos MC, Campos MI, Souza AP, Scarel-Caminaga RM, Mazzonetto R, Line SR. Analysis of the transforming growth factor-beta 1 gene promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Implant Dent* 2004;13:262-9.
181. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D i sur. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg (Am)* 1993;75:863-79.

182. Konttinen YT, Xu JW, Waris E, Li TF, Gomez-Barrena E, Nordsletten L, Santavirta S. Interleukin-6 in aseptic loosening of total hip replacement prostheses. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:485-90.
183. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:18138-44.
184. Seck T, Diel I, Bismar H, Ziegler R, Pfeilschifter J. Expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor mRNA in human bone samples from pre- and postmenopausal women. *Bone* 2002;30:217-22.
185. Chung HW, Seo JS, Hur SE, Kim HL i sur. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women. *Hum Genet* 2003;48:243-8.
186. Granchi D, Verri E, Ciapetti G, Stea S, Savarino L, Sudanese A, Mieti M, Rotini R, Dallari D, Zinghi G, Montanaro L. Bone-resorbing cytokines in serum of patients with aseptic loosening of hip prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:912-7.
187. Konttinen YT, Waris V, Xu JW, Jiranek WA, Sorsa T, Virtanen I, Santavirta S. Transforming growth factor-beta 1 and 2 in the synovial-like interface membrane between implant and bone in loosening of total hip arthroplasty. *J Rheumatology* 1997;24:694-701.
188. DeLee JG, Charnley J. Radiological demarcation of cemented sockets in total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res* 1976; 121:20-32.

189. Gabuzda G, Renshaw M, Thomas S. Current Concepts Review. Reduction of congenital dislocation of the hip. *J Bone Joint Surg (Am)* 1992;74:624-31.
190. Hoaglund FT, Healey JH. Osteoarthritis and congenital dysplasia of the hip in family members of children who have congenital dysplasia of the hip. *J Bone Joint Surg (Am)* 1990; 72:1510-8.
191. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:S39-44.
192. Berdeli A, Tabel Y, Celik HA, Ozyurek R, Dogrusoz B, Aydin HH. Lack of association between TNFalpha gene polymorphism at position -308 and risk of acute rheumatic fever in Turkish patients. *Scand J Rheumatol* 2006;35:44-7.
193. Hoaglund FT, Healey JH. Osteoarthritis and congenital dysplasia of the hip in family members of children who have congenital dysplasia of the hip. *J Bone Joint Surg (Am)* 1990;72:1510-8.
194. Felson DT. Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiol Rev* 1988;10:1-28.
195. Zgoda M, Paczek L, Bartlomiejczyk I, Sieminska J, Chmielewski D, Gorecki A. Transforming growth factor-beta1, interleukin-1beta and collagenase activity in subchondral bone of the femur and the severity of osteoarthritis of the hip. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:912.
196. Reddi AH. Aging, osteoarthritis and transforming growth factor-beta signaling in cartilage. *Arthritis Res Ther* 2005;8:101.
197. Kaiser M, Haag J, Soder S, Bau B, Aigner T. Bone morphogenetic protein and transforming growth factor beta inhibitory Smads 6 and 7 are

expressed in human adult normal and osteoarthritic cartilage in vivo and are differentially regulated in vitro by interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 2004;50:3535-40.

198. Verbruggen G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology* 2006;45:129-38.
199. Malesud CJ. Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis. *BioDrugs*. 2004;18:23-35.
200. Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 1999;40:1-11.
201. Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum*. 1996;25:254-72.
202. Sipe JD. Acute-phase proteins in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1995;25:75-86.
203. Roelen BA, Dijke P. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF beta family members. *J Orthop Sci* 2003;740-8.
204. Lieskovska J, Guo D, Derman E. IL-6-overexpression brings about growth impairment potentially through a GH receptor defect. *Growth Horm IGF Res* 2002;12:388-98.

## 16. ŽIVOTOPIS

### Section 1.01 OSOBNI PODACI:

Datum rođenja: 02.03. 1966.  
Mjesto rođenja: Zagreb  
Državljanstvo: Hrvatsko  
Nacionalnost: Hrvat  
Obitelj: supruga Mirna, kćer Petra i sin Vid

### Section 1.02

### Section 1.03 ŠKOLOVANJE:

siječanj 2006. pozitivno ocijenjena tema doktorske disertacije pod naslovom: “Utjecaj polimorfizama u genima za interleukin 6 (*IL-6*), tumor-nekrotizirajući čimbenik alfa 1 (*TNF- $\alpha$ 1*) i transformirajući čimbenik rasta beta 1 (*TGF- $\beta$ 1*) na stabilnost endoproteza zgloba kuka”.

2005. prijavljena tema za doktorsku disertaciju

2002. obranjen magistarski rad: “Utjecaj biomehaničkih činitelja na opseg i učestalost polietilenske bolesti kod endoproteza zgloba kuka”, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dubravka Orlića na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

1998. položio specijalistički ispit iz ortopedije

1995. – 1997. poslijediplomski studij iz ortopedije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

1994. - 1998. specijalizacija iz ortopedije

1992. položio državni ispit za doktora medicine

1991. diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
1985. - 1991. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
1980. - 1984. srednja škola u Zagrebu
1973. - 1980. osnovno školovanje u Zagrebu

#### RADNI STAŽ:

1998. → odjelni liječnik na Odjelu za rekonstruktivnu kirurgiju i traumatologiju Klinike za ortopediju Kliničkog bolničkog centra Zagreb
- 1994.-1998. radni odnos kao specijalizant na Klinici za ortopediju Kliničkog bolničkog centra Zagreb
1991. - 1992. rad u primarnoj zdravstvenoj zaštiti - "Studentska poliklinika"
1991. i 1995. liječnik u ZNG (nositelj Spomenice domovinskog rata 1991.) i liječnik u HV (nositelj medalje "Oluja")

#### DODATNA PROFESIONALNA EDUKACIJA:

2000. "Anica Bitenc" Fellowship, Canada, Edmonton, Calgary, Vancouver
1999. "AO" Fellowship, UK, Leeds
1998. "AO Course Instructor", Zagreb, Hrvatska
1997. "AO Advanced Course", Davos, Switzerland
1997. "EFFORT" Traveling Fellowship, France
1995. "AO Basic Course", Zagreb, Hrvatska

1994. "International Olympic Committee Sports Medicine Course",  
Zagreb, Hrvatska

1994. "AO Basic Course", Davos, Switzerland

#### PUBLIKACIJE:

- autor ili koautor 26 znanstvenih radova, od čega tri rada u CC časopisima, 11 u međunarodnim indeksiranim časopisima, 12 u recenziranim časopisima, knjizi ili zbornicima radova te 32 međunarodna kongresna priopćenja, 2 sažetka rada objavljena u CC časopisima i 27 domaćih kongresnih priopćenja