

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO MILOJEVIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO MILOJEVIĆ

**RAZVOJ METODE ZA MERJENJE IZRAŽANJA miR-21-5p, miR-576-5p IN
let-7a-5p V PLAZMI POMENOPAVZNIH ŽENSK**

**DEVELOPMENT OF THE EXPRESSION ASSAY FOR miR-21-5p, miR-576-5p
AND let-7a-5p IN PLASMA OF POSTMENOPAUSAL WOMEN**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., ki mi je omogočila opravljanje magistrske naloge. Hvala za vodenje in nasvete tekom pisanja naloge. Prav tako se zahvaljujem somentorju asist. dr. Tilnu Kranjcu, mag. farm., za potrpežljivost in pomoč pri eksperimentalnem delu ter vodenje pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo, ki ste mi prijazno pomagali in svetovali tekom eksperimentalnega dela. Zahvala za podporo in spodbudo gre tudi moji družini in prijateljem.

Izjava

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo. Izjavljam, da sem magistrsko nalogo opravil samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Tilna Kranjca, mag. farm.

Marko Milojević

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1.0 UVOD.....	1
1.1 OSTEOPOROZA	1
1.1.1 Diagnoza in spremljanje zdravljenja osteoporoze	2
1.2 KOSTNA PRESNOVA	4
1.3 MikroRNA.....	5
1.3.1 Biogeneza in mehanizem delovanja miRNA.....	5
1.3.2 Regulacija biogeneze miRNA	7
1.4 VLOGA miRNA V KOSTNI PRESNOVI	8
1.4.1 Vloga miRNA v osteoporozi	9
1.5 IZVENCELIČNE miRNA.....	10
1.5.1 Izvencelične miRNA kot biomarkerji	11
1.5.2 Izvencelične miRNA kot biomarkerji osteoporoze	11
1.5.3 miRNA kot terapevtska tarča	14
1.6 VLOGA IZBRANIH miRNA	14
2.0 NAMEN DELA	16
3.0 MATERIALI IN METODE	17
3.1 PREISKOVANCI.....	17
3.2 IZOLACIJA miRNA	17
3.2.1 Postopek izolacije miRNA iz plazme.....	18
3.3 MERJENJE ČISTOTE IN KONCENTRACIJE IZOLIRANE miRNA	19
3.4 REVERZNA TRANSKRIPCIJA	19
3.4.1 Priprava reakcijske zmesi in izvedba reverzne transkripcije.....	19
3.5 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	20
3.5.1 Priprava reakcijske zmesi in izvedba qPCR.....	21
3.6 KVANTIFIKACIJA IZRAŽANJA miR-21-5p, miR-576-5p IN let-7a-5p	22
3.7 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV S PROGRAMOM SPSS.....	23
4.0 REZULTATI	24
4.1 STATISTIČNA ANALIZA POPULACIJE	24
4.2 ANALIZA MERITEV MKG IN TBS.....	29
4.3 MERJENJE HEMOLIZE VZORCEV	33
4.4 KONCENTRACIJA IZOLIRANIH miRNA	33
4.5 MERJENJE NIVOJA miRNA S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	34
5.0 RAZPRAVA.....	39
5.1 ANALIZA PREISKOVANK	39

5.2 MERJENJE HEMOLIZE IN IZOLACIJA miRNA	41
5.3 KVANTIFIKACIJA miR-21-5p, miR-576-5p IN let-7a V PLAZMI POMENOPAVZNIH ŽENSK	42
5.3.1 Plazemski nivo miR-21-5p, miR-21-5p in let-7a v preiskovanih skupinah	42
6.0 SKLEP	48
7.0 LITERATURA	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Opredelitev osteoporoze po merilih SZO.	1
Preglednica 2: Ocena mikroarhitekture kostnih trabekul pri pomenopavznih ženskah glede na vrednosti TBS.	3
Preglednica 3: miRNA vpletene v proces osteoblastogeneze	8
Preglednica 4: Preučevane miRNA v omenjenih študijah, ki bi lahko služile kot novi biološki kazalci osteoporoze.....	13
Preglednica 5: Sestava reakcijske zmesi za prepis miRNA v cDNA.	20
Preglednica 6: Program za prepis miRNA v cDNA.	20
Preglednica 7: Sestava reakcijske zmesi za qPCR.....	22
Preglednica 8: Program za izvedno qPCR.	22
Preglednica 9: Število preiskovank, ki ima za vsako meritev MKG izračunane T-vrednosti normalne, osteopenične ali osteoporozne.	29
Preglednica 10: Razlike v izmerjeni MKG in TBS med skupino zdravih preiskovank in skupino preiskovank z osteoporozo.....	31
Preglednica 11: Razlike v T-vrednosti med skupino zdravih preiskovankin skupino preiskovank z degenerirano mikroarhitekturo kosti.	32
Preglednica 12: Razlike v plazemskih nivojih miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p med skupino zdravih preiskovank in skupino preiskovank z osteoporozo ter razlike v nivojih istih miRNA med skupino zdravih preiskovank in preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva.....	38

KAZALO GRAFIKONOV

Grafikon 1: Grafična primerjava mediane in percentilov starosti zdravih preiskovank (0–levo) in preiskovank z osteoporozo (1–desno).	24
Grafikon 2: Grafična primerjava mediane in percentilov ITM zdravih preiskovank (0–levo) in preiskovank z osteoporozo (1–desno).	26
Grafikon 3: Grafična primerjava mediane in percentilov let mene med zdravimi preiskovankami (0–levo) in preiskovankami z osteoporozo (1–desno).	28
Grafikon 4: Grafična predstavitev mediane in percentilov meritev TBS.	30
Grafikon 5: Grafična predstavitev primerjave median in percentilov izračunanih T-vrednosti na različnih delih skeleta med skupino zdravih preiskovank (0–modro) in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kosti (1–rdeče).	32

Grafikon 6: Grafična predstavitev mediane in percentilov izmerjenih absorbanč vseh vzorcev plazme pri valovni dolžini 414 nm na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.....	33
Grafikon 7: Grafična predstavitev mediane in percentilov izmerjenih koncentracij (ng/ μ L) izoliranih miRNA iz vzorcev plazme preiskovank na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.	34
Grafikon 8: Razlika v plazemskem nivoju miR-21-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank z osteoporozo (1–desno).....	35
Grafikon 9: Razlika v plazemskem nivoju miR-21-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva (1–desno). 35	35
Grafikon 10: Razlika v plazemskem nivoju miR-576-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank z osteoporozo (1–desno).....	36
Grafikon 11: Razlika v plazemskem nivoju miR-576-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva (1–desno). 36	36
Grafikon 12: Razlika v plazemskem nivoju let-7a-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank z osteoporozo (1–desno).....	37
Grafikon 13: Razlika v plazemskem nivoju let-7a-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva (1–desno). 37	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Biogeneza in mehanizem delovanja miRNA.....	7
Slika 2: Vloga miR-21-5p v osteoklastogenezi.	43
Slika 3: Vloga miR-21-5p v osteoblastogenezi.	44

POVZETEK

Osteoporoza je s starostjo povezana sistemska bolezen skeleta, za katero je značilna zmanjšana mineralna kostna gostota in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva, kar vodi do povečane lomljivosti kosti in nizkoenergetskih zlomov. Na njen nastanek vplivajo številni okoljski, genetski in epigenetski dejavniki, med katere uvrščamo tudi mikroRNA. Odkritje, da se stabilne, izvencelične mikroRNA nahajajo v telesnih tekočinah ter da imajo pomembno vlogo v medcelični komunikaciji, je odprlo številne nove možnosti za diagnozo in zdravljenje bolezni. Zato smo se odločili razviti metodo za merjenje koncentracij miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p v plazmi pomenopavznih žensk. Želeli smo ugotoviti ali se nivoji mikroRNA v plazmi razlikujejo med skupino preiskovank z osteoporozo oziroma skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva v primerjavi z zdravimi preiskovankami. V ta namen smo iz plazme 200 pomenopavznih preiskovank izolirali mikroRNA, jih prepisali v komplementarno DNA in z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času izmerili nivoje izbranih mikroRNA. Preiskovanke smo glede na izračunane T-vrednosti razdelili v skupino preiskovank z osteoporozo (N=63) in skupino zdravih preiskovank (N=91) ter glede na izmerjene vrednosti ocene kvalitete kostnih trabekul na skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva (N=26) in zdrave preiskovanke (N=128). Ugotovili smo, da ni signifikantne razlike v nivojih miR-21-5p ($p=0,252$), miR-576-5p ($p=0,898$) in let-7a-5p ($p=0,538$) v plazmi preiskovank z osteoporozo in zdravimi preiskovankami. Prav tako smo ugotovili, da se nivoji miR-21-5p ($p=0,239$), miR-576-5p ($p=0,511$) in let-7a-5p ($p=0,310$) v plazmi preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva in zdravimi preiskovankami signifikantno ne razlikujejo.

KLJUČNE BESEDE: osteoporoza, mikroRNA, mineralna kostna gostota, TBS

ABSTRACT

Osteoporosis is an age related, systemic skeletal disease associated with low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue and is characterized by increased risk of bone fracture due to fragility. It is a multifactorial disease resulting from complex interactions between environmental, genetic and epigenetic factors, among which are also microRNAs. The discovery that stable, extracellular microRNAs are found in bodily fluids and play an important role in intercellular communication, has opened many new possibilities for diagnosis and treatment of the disease. Therefore, we decided to develop the expression assay for miR-21-5p, miR-576-5p and let-7a-5p in plasma of postmenopausal women. The aim was to determine whether the plasma levels of microRNAs differ between the group of subjects with osteoporosis and the group of subjects with degraded bone microarchitecture compared to healthy individuals. For this purpose, we isolated microRNAs from the plasma of 200 postmenopausal women, transcribed them to complementary DNA and assessed the level of selected microRNAs by real-time quantitative polymerase chain reaction. Participants were divided into groups of subjects with osteoporosis (N=63) and healthy individuals (N=91) according to the T-score as well as in relation to the trabecular bone score into groups of subjects with degraded bone microarchitecture (N=26) and healthy controls (N=128). We have found that there is no significant difference in the levels of miR-21-5p ($p=0,252$), miR-576-5p ($p=0,898$) and let-7a-5p ($p=0,538$) in the plasma of subjects with osteoporosis compared to healthy individuals. We also concluded that the levels of miR-21-5p ($p=0,239$), miR-576-5p ($p=0,511$) and let-7a-5p ($p=0,310$) in the plasma of subjects with degraded bone microarchitecture compared to healthy controls did not differ significantly.

KEY WORDS: osteoporosis, microRNA, bone mineral density, TBS

SEZNAM OKRAJŠAV

AGO	protein iz družine argonavtov
cDNA	komplementarna DNA
Cq	kvantifikacijski cikel
DXA	dvoenergijska rentgenska absorpciometrija
FRAX	orodje za izračun tveganja za osteoporozni zlom (Fracture Risk Assessment Tool)
ITM	indeks telesne mase
mRNA	informacijska RNA
miRNA	mikroRNA
MKG	mineralna kostna gostota
MSC	mezenhimske matične celice
OPG	osteoprotegrin
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
PTH	paratiroidni hormon
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RISC	z RNA inducirani utiševalni kompleks
RUNX2	z Runt povezan transkripcijski dejavnik 2
SD	standardna deviacija glede na najvišjo MKG zdrave osebe v zgodnji odrasli dobi
Spike-in	eksogena sintetična kontrola
T	T vrednost: razlika med izmerjeno in pričakovano MKG pri mladi, zdravi osebi, deljeno s SD v populaciji
TBS	ocena kvalitete kostnih trabekul
UTR	neprevedljiva regija

1.0 UVOD

1.1 OSTEOPOROZA

Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je leta 2003 definirala osteoporozo kot sistemsko skeletno bolezen, ki je karakterizirana z zmanjšano mineralno kostno gostoto (MKG) in porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva, kar vodi do povečane lomljivosti kosti in osteoporoznih zlomov. Kriteriji SZO za diagnozo osteoporoze temeljijo na podlagi merjenja MKG. Osteoporozo potrdimo, če je zmanjšanje MKG za 2,5 ali več SD od pričakovane največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso (Preglednica 1). (1)

Preglednica 1: Opredelitev osteoporoze po merilih SZO. (1)

MKG	Opredelitev
$T \geq -1 \text{ SD}$	Ni osteoporoze
$-2,5 \text{ SD} < T < -1 \text{ SD}$	Osteopenija
$T \leq -2,5 \text{ SD}$	Osteoporozna
$T \leq -2,5 \text{ SD}$ in zlom	Huda osteoporozna

* T vrednost: razlika med izmerjeno in pričakovano MKG pri mladi, zdravi osebi, deljeno s SD v populaciji; SD: standardna deviacija glede na najvišjo MKG zdrave osebe v zgodnji odrasli dobi

Osteoporozna je najpogostejša metabolična bolezen kosti, ki prizadene več kot 75 milijonov ljudi v Evropi, ZDA in na Japonskem. (1) Po kriterijih SZO ima v Sloveniji osteoporozo 12,4% žensk v starosti 50–59 let, 27,6% v starosti 70–79 let in kar 48,5% v starosti nad 80 let. (2) Osteoporozna predstavlja velik zdravstveni ter socialno-ekonomski problem zaradi osteoporoznih zlomov ter njihovih posledic. Samo v Evropi in ZDA je bilo z osteoporozo povezanih kar 2,3 milijona zlomov. (1) Skupni letni strošek zdravljenja osteoporoznih zlomov v Evropi znaša kar 27 milijard evrov. Najpogostejši so zlomi vretenc, ki jih lahko povzroči že lastna teža, sledijo jim zlomi zapestja in zlomi kolka. Slednji skoraj vedno zahtevajo hospitalizacijo pacienta in so tako glavni vzrok za morbidnost in povišano smrtnost bolnikov. (3) Ker starejša populacija predstavlja najhitreje rastočo starostno skupino, strokovnjaki ocenjujejo, da se bo letno število zlomov kolka iz 1,7 milijona od leta 1990 dvignilo na kar 6,3–8,2 milijona do leta 2050. (4)

Osteoporozo delimo na primarno in sekundarno. Primarna je pogostejša, prizadene predvsem ženske in nastane v starosti oziroma po menopavzi. Med primarno uvrščamo pomenopavzalno, senilno, juvenilno in nosečniško osteoporozo. Pomenopavzalna osteoporozo se pojavlja pri ženskah med 50. in 70. letom starosti, vzrok zanjo pa je pomanjkanje estrogenov, ki so močni zaviralci resorpcije kosti. Senilna osteoporozo se pojavlja v starosti nad 70 let, prizadene tudi moške, nastane pa zaradi manjše resorpcije kalcija iz črevesja in zmanjšane tvorbe aktivne oblike kalcitriola v ledvicah. Vzrok za nastanek juvenilne osteoporoze ni znan, nastane v dobi odraščanja in po 2–4 letih spontano izgine. Nosečniška osteoporozo je najverjetneje posledica slabše prilagoditve kalciotropnih hormonov, ki zaščitijo okostje matere v času nosečnosti. Vzrok za nastanek sekundarne osteoporoze so različne endokrine bolezni, bolezni prebavil in kostnega mozga ter uporaba zdravil. (2) Med glavne dejavnike tveganja za osteoporozo štejemo starost, spol, raso in pomanjkanje estrogena zaradi menopavze, nizko telesno maso, predhodne osteoporozne zlome ter zlome pri bližnjih sorodnikih. Z nižjo kostno maso in višjim tveganjem za zlom je povezano tudi kajenje, pitje alkohola, telesna neaktivnost, različne kronične bolezni, jemanje glukokortikoidov in pomanjkanje kalcija v prehrani (<0,5 g/dan). (1, 2)

1.1.1 Diagnoza in spremljanje zdravljenja osteoporoze

MKG je najpomembnejši pokazatelj tveganja za zlom, zato ima merjenje MKG osrednjo vlogo pri diagnostiki osteoporoze. Metoda dvoenergijske rentgenske absorpciometrije (DXA) trenutno predstavlja “zlati standard”, saj omogoča hitro, zanesljivo in natančno merjenje MKG. Meritev opravimo največkrat na področju ledvene hrbtenice in kolka. Z izmerjeno MKG lahko ocenimo verjetnost zloma, izberemo najprimernejšo terapijo ter spremljamo spremembe MKG tekom zdravljenja. (5)

Pri osteoporozni ne pride do zloma samo zaradi količinskega zmanjšanja kostnine, ampak tudi zaradi strukturnih kostnih sprememb. Kostne trabekule se tanjšajo, fenestrirajo, prostori med trabekulami pa se večajo. Z metodo ocene kvalitete kostnih trabekul lahko na podlagi analize DXA posnetka področja ledvene hrbtenice zaznamo gostoto trabekul in morebitne spremembe v kostni mikroarhitekturi le-teh. Ocena kvalitete kostnih trabekul (TBS) se uporablja hkrati z MKG za boljšo oceno tveganja za osteoporozne zlome. (2)

Preglednica 2: Ocena mikroarhitekture kostnih trabekul pri pomenopavznih ženskah glede na vrednosti TBS. (2)

TBS	Ocena
$TBS \geq 1,350$	Normalno
$1,200 < TBS < 1,350$	Delno degradirana mikroarhitektura
$TBS \leq 1,200$	Degradirana mikroarhitektura

Novejša dognanja iz klinične prakse pa so pokazala, da samo z upoštevanjem meritev MKG in TBS ne upoštevamo številnih že omenjenih dejavnikov tveganja za zlome in tako spregledamo velik del bolnikov, ki bodo utrpeli zlom. Skupni vpliv dejavnikov tveganja in verjetnost, da bo prišlo do zloma ovrednotimo s pomočjo računalniškega modela FRAX (angl. Fracture Risk Assessment Tool). FRAX je orodje, s katerim na podlagi meritve MKG in upoštevanjem dejavnikov tveganja kot so starost, spol, telesna teža, telesna višina, predhodni zlomi pri preiskovancu, zlom kolka pri starših, kajenje, količina zaužitega alkohola, kronično zdravljenje z glukokortikoidi, prisotnost revmatoidnega artritisa in drugih vzrokov za sekundarno osteoporozo napovemo 10-letno tveganje za klinični zlom. (6) Ne glede na meritve MKG, TBS ter izračunano tveganje po FRAX-u pa osteoporozni zlom kolka ali vretenca že zadoščata za postavitve diagnoze. (6)

Pri zdravljenju osteoporoze spremljamo spremembe MKG z metodo DXA, vendar jih zaznamo šele po več kot enem letu zdravljenja. Zato pri zdravljenju spremljamo tudi označevalce kostne remodelacije. To so biokemijski produkti kostne presnove, ki jih ponavadi merimo v serumu ali urinu in odražajo metabolno aktivnost kosti. Razdelimo jih na označevalce kostne gradnje in razgradnje. Leta 2010 sta strokovni združenji IOF/IFCC izdali priporočilo, da se kot referenčni označevalec gradnje kosti uporablja N-terminalni propeptid prokolagena I (P1NP), za razgradnjo kosti pa C-terminalni telopeptid kolagena tipa I (CTX I). Prav tako lahko povišane označevalce kostne razgradnje uporabimo kot neodvisne napovednike osteoporoznih zlomov, vendar pa je njihova uporaba v klinični praksi omejena zaradi pomanjkanja mednarodnih referenčnih standardov. (7)

1.2 KOSTNA PRESNOVA

Poznavanje mehanizmov in uravnavanja kostne preнове ni pomembno samo za razumevanje nastanka osteoporoze, ampak tudi predstavlja osnovo za iskanje novih učinkovin in terapevtskih tarč za zdravljenje bolezni. V kosteh celo življenje poteka intenziven proces kostne remodelacije, v katerem se izmenjujeta procesa izgradnje in razgradnje kosti. Osrednjo vlogo pri razgradnji kosti imajo večjedrne celice osteoklasti, ponovno sintezo kostnine pa omogočajo osteoblasti. Diferenciacija osteoblastov in osteoklastov iz prekurzorskih celic je ključen del kostne premene in je pod nadzorom transkripcijskega regulatorja RUNX2. RUNX2 negativno ali pozitivno vpliva na izražanje osteoblastno specifičnih genov preko interakcij s transkripcijskimi aktivatorji, represorji in koregulatornimi proteini. Celoten proces kostne preнове poteka v več fazah. V fazi aktivacije se neaktivni osteoblasti razmaknejo, razgali se kostna površina, ki privabi osteoklaste. Ti kost razgradijo, v fazi preobrata se razmaknejo, lakuno pa očistijo mononuklearni fagociti, ki izgradijo cementno plast. Sproščene snovi med razgradnjo privabijo osteoblaste, ki se pričnejo diferencirati, se aktivirajo in na novo sintetizirajo kostni matriks, ki se nato mineralizira. Intenzivnost procesa se uravnava sistemsko ali lokalno, vsi dejavniki pa uravnavajo intenzivnost tako, da vplivajo na aktivnost in število osteoblastov in osteoklastov. Med sistemske regulatorje štejemo različne hormone (estrogene, PTH, rastni hormoni, kalcitriol, kortikosteroidi, ščitnični hormoni), pomembnejši lokalni regulatorji pa so številni osteoklastogeni (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, TNF- α) in anti-osteklastogeni citokini (IL-4, IL-10, IL-13, IL-18, IFN- γ , IFN- β) ter rastni in diferenciacijski dejavniki (CSF-1, RANKL, TGF- β in drugi). (2, 8)

Estrogeni uravnavajo kostno presnovo preko vezave na estrogenska receptorja ER α in ER β , njihovi glavni učinki na kosti pa so: 1) zaviranje nastanka kostnih remodelacijskih enot, 2) zaviranje diferenciacije in pospeševanje apoptoze osteoklastov, 3) usmerjanje mezenhimskih matičnih celic (MSC) v razvoj osteoblastov in spodbujanje njihove diferenciacije in preprečevanje apoptoze. (8, 9)

Glavni signalni sistem, ki regulira kostno presnovo je RANKL/RANK/OPG sistem. Osteoblasti izločajo transmembransko in topno obliko RANKL, ki se veže na receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANK) na membrani osteoklastov. Vezava RANKL na RANK sproži izražanje osteoklastogenih genov. OPG tekmuje z RANKL za vezavo na RANK ter tako zavira delovanje RANKL in osteoklastogenezo. RANKL je ob prisotnosti zadostne količine makrofagnega kolonije stimulirajočega dejavnika (M-CSF) zadosten

dejavnik za diferenciacijo osteoklastov, prav tako pa stimulira njihovo preživetje, aktivacijo in upočasnjuje njihovo apoptozo. (8, 10, 11)

Za ustrezen potek kostne preнове je natančna regulacija intenzitete, jakosti in časa aktivacije Wnt signalne poti ključnega pomena. Za povečanje kostne mase je najpomembnejša WNT/ β -kateninska pot, ki sproži izražanje genov (OPG, RUNX2) in inducira osteoblastogenezo, poveča proliferacijo proosteoblastov, prepreči apoptozo osteoblastov in osteocitov, ter zavira nastajanje osteoklastov. (8, 11)

1.3 MikroRNA

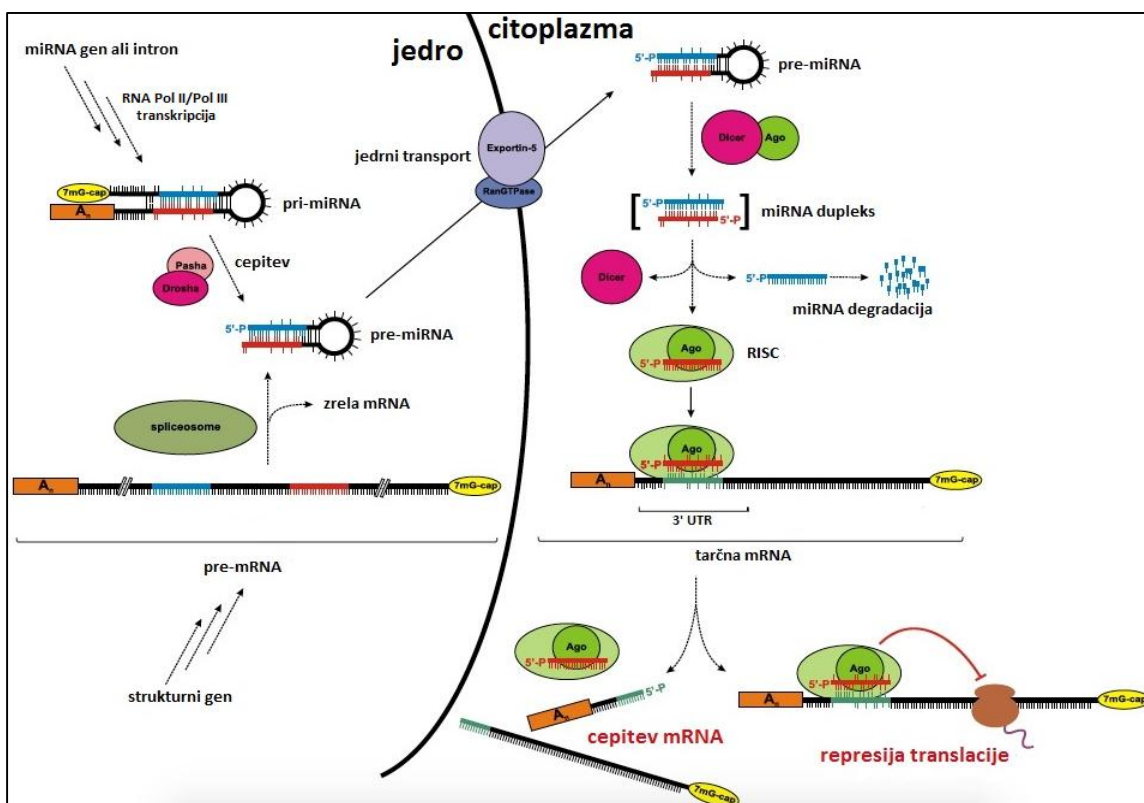
MikroRNA (miRNA) so 17–25 nukleotidov dolge, enoverižne, endogene, nekodirajoče RNA, ki uravnavajo izražanje genov na posttranskripcijski ravni. Prvo miRNA so odkrili leta 1993, ko so namesto pričakovanega proteina, ki naj bi ga kodiral gen *lin-4* iz črva *C. elegans*, izolirali kratko RNA dolgo približno 22 nukleotidov. (12, 13) Danes poznamo preko 28645 različnih miRNA iz več kot 50 organizmov, od tega so jih je več kot 2500 prisotnih v človeških celicah. (13, 14) MiRNA so pomembni posttranskripcijski regulatorji izražanja genov, saj so vpletene v skoraj vse celične biološke procese, kot so proliferacija, rast, diferenciacija in apoptoza. MiRNA so ključni regulatorji osteoblastogeneze in osteoklastogeneze, s tem pa vplivajo na kostno presnovo. (15) Poleg tega so miRNA vpletene tudi v različne patološke procese kot so nastanek in napredovanje več vrst raka, kardiovaskularne bolezni, vnetne in imunske bolezni, nevrodegenerativne bolezni in osteoporozo. (12, 13, 16) Mutacije miRNA in spremembe v izražanju le-teh so povezane z nastankom in napredovanjem osteoporoze. (11, 15) Leta 2008 so prvič odkrili cirkulirajoče miRNA v krvi. (12) Izvencelične cirkulirajoče miRNA vstopajo v druge celice, s tem pa vplivajo na njihovo delovanje, zato bi jih lahko uporabili kot tarčne zdravilne učinkovine za povečanje kostne mase pri bolnikih z osteoporozo. (16, 17) Prav tako miRNA lahko predstavljajo nove, neinvazivne biokemične kazalce za številne bolezni, vključujoč osteoporozo. Lahko jih uporabimo za postavitev diagnoze, nadzorovanje napredovanja številnih bolezni in spremljanje odziva na zdravljenje. (11, 12)

1.3.1 Biogeneza in mehanizem delovanja miRNA

Zapisi za miRNA se nahajajo na vseh kromosomih razen kromosoma Y. Pri ljudeh najdemo okoli 50% zapisov v skupkih, kar pomeni, da se prepisujejo kot policistronski primarni transkript. Takšna genomska organizacija omogoča sočasno ekspresijo podobnih

miRNA, kar vodi do sinergističnega učinka. MiRNA geni se nahajajo v intronih in eksonih kodirajočih in nekodirajočih genov, približno polovica pa ima lastne promotorje. (18) Biosinteza miRNA (Slika 1) se začne v jedru s prepisom miRNA genov in nastankom primarne miRNA (pri-miRNA), ki je lahko dolga več kilobaz. Sintezo pri-miRNA v večini primerov katalizira encim RNA polimeraza II, redkeje tudi RNA polimeraza III. Ekspresija izbranih miRNA je največkrat pod kontrolo transkripcijskih faktorjev c-Myc in p53, ali pa je odvisna od metilacije promotorskega zaporedja. (19) Pri-miRNA vsebuje eno ali več stebelnih zank, na 3' koncu ima poli-A rep in na 5' koncu 7-metilgvanozinsko kapo. Iz ene pri-miRNA lahko nastane več funkcionalnih miRNA. (18) Od tukaj naprej zorenje miRNA poteka po kanonični ali nekanonični poti, pri čemer slednja predstavlja pot, po kateri nastane samo 1% zrelih miRNA. Po kanonični poti naslednji korak katalizira mikroprocesorski kompleks, sestavljen iz encima Drosha (encim RNaza III z endonukleazno aktivnostjo) in kofaktorja DGCR8 (angl. DiGeorge syndrome critical region gene) imenovan tudi Pasha, ki veže dvovertične RNA molekule. DGCR8 prepozna nesparjene konce na pri-miRNA in služi kot ravnilo, tako da Drosha cepi 11 baznih parov od začetka stebra, pri tem pa nastane 70 nukleotidov dolga prekurzorska miRNA (pre-miRNA). Je v obliki zanke, na 5' koncu ima fosfatno skupino, na 3' koncu pa dvonukleotidni podaljšek, kar je tipično za produkte katalizirane z RNazo III. Jedernocitoplazemski prenašalni protein Ekspartin 5 prepozna dvonukleotidni podaljšek na 3' koncu pre-miRNA in jo preko Ran-GTP odvisnega mehanizma prenese v citoplazmo celice, kjer jo encim Dicer (encim RNaza III) s pomočjo katalitičnega partnerja TRBP (angl. trans-aktivator RNA-binding protein) cepi blizu terminalne zanke. Nastane približno 22 nukleotidov dolg miRNA dupleks. (18, 19) MiRNA-dupleks sestoji iz funkcionalne miRNA (vodilna veriga) in delno komplementarne spremljevalne verige. Funkcionalna veriga ima 5' konec manj stabilno sparjen, kar predstavlja termodinamsko ugodnejšo strukturo. (12) MiRNA-dupleks se s funkcionalno verigo poveže s proteinom AGO in tvori aktiven RISC kompleks (z RNA inducirani utiševalni kompleks). Katalitično aktiven AGO2 protein služi kot funkcionalna komponenta RISC kompleksa. Iz RISC kompleksa se odstrani termodinamsko manj ugodna spremljevalna miRNA veriga, ki jo razgradijo celične nukleaze, vodilna veriga pa služi kot šablona za prepoznavo tarčnih mRNA. (12, 18–20). miRNA, vezana v RISC kompleks, se z 2–8 baznih parov dolgo regijo na 5' koncu pari s 3'UTR (neprevedljivo regijo) na tarčni mRNA in glede na stopnjo komplementarnosti ustavi translacijo ali povzroči, da se tarčna mRNA cepi oziroma

razgradi. Dovoljena nepopolna komplementarnost med miRNA in tarčnimi mRNA omogoča, da ena miRNA simultano zavira izražanje več različnih mRNA. Pri visoki stopnji komplementarnosti AGO2 s svojo endonukleazno aktivnostjo cepi tarčno mRNA. Pri nižji stopnji komplementarnosti miRNA povzročijo destabilizacijo tarčne mRNA z odstranitvijo njene 5' kape in poli-A repa, translacijo pa lahko zaustavijo tudi z upočasnitvijo ali zaustavitvijo ribosomov in razgradnjo novo sintetiziranega peptida. (21–23)



Slika 1: Biogeneza in mehanizem delovanja miRNA. Prirejeno po (20).

Biogeneza miRNA se prične v jedru s prepisom miRNA genov in nastankom pri-mRNA. Drosha in Pasha v jedru tvorita mikroprocesorski kompleks in cepita pri-mRNA. Nastalo pre-miRNA v citoplazmo preko Ran-GTP odvisnega mehanizma prenese prenašalni protein Eksportin 5, kjer jo encim Dicer cepi blizu terminalne zanke. Nastane miRNA dupleks, ki je sestavljen iz vodilne in spremljevalne verige. Spremljevalna veriga se razgradi, vodilna pa se poveže s proteinom AGO in tvori aktiven RISC kompleks, kjer služi kot šablona za prepoznavo tarčnih mRNA. miRNA, vezana v RISC kompleks, se pari s 3'UTR na tarčni mRNA in glede na stopnjo komplementarnosti ustavi translacijo ali povzroči, da se tarčna mRNA cepi.

1.3.2 Regulacija biogeneze miRNA

Ker so miRNA ključni posttranskripcijski regulatorji izražanja genov in so vključene v pomembne celične procese, je za ohranitev normalnih celičnih funkcij kritično, da sta

njihova biogeneza in raven v celicah natančno uravnana. Nepravilnosti v biogenezi miRNA vodijo do napačnega razmerja izražanja proteinov in posledično v patološka stanja. Biogeneza miRNA je regulirana na transkripcijski in posttranskripcijski ravni ter na ravni povratnih zank. Na transkripcijski ravni je izražanje miRNA pod kontrolo več transkripcijskih dejavnikov, kot so tumorsupresorski p53, onkogeni c-Myc ter PU.1 in MEF2. Tudi epigenetski dejavniki (histonske modifikacije in metilacija DNA) vplivajo na izražanje miRNA genov in posledično profil izraženih miRNA znotraj celice. Na posttranskripcijski ravni so miRNA uravnane preko regulacije procesiranja encima Droshe, hitrosti nastajanja in razgradnje miRNA ter urejevanja baz v miRNA. V proces biogeneze miRNA so vključene enojno ali dvojno negativne povratne zanke, ki vključujejo interakcije med transkripcijskimi faktorji, encimi, miRNA in tarčnimi mRNA. (18, 19)

1.4 VLOGA miRNA V KOSTNI PRESNOVI

MiRNA so pomembne za normalno delovanje kostnih celic, hkrati pa imajo ključno regulatorno vlogo v procesu osteoblastogeneze in osteoklastogeneze. (15) Več različnih miRNA (Preglednica 3) zavira diferenciacijo osteoblastov tako, da vplivajo na osteogeni transkripcijski faktor RUNX2. (11)

Preglednica 3: miRNA vpletene v proces osteoblastogeneze. (11, 15)

miRNA	Vpliv miRNA
miR-23a, miR-30a-d, miR-34c, miR-133a, miR-135a, miR-137, miR-204, miR-205, miR-211, miR-217, miR-335, miR-338, miR-433, miR-3077-5p	Vplivajo na RUNX2.
miR-2861, miR-3960	Zavirata HDAC5 in HOXA2.
miR-29a, miR-218, miR-335-5p	Zavirajo antagoniste WNT-ja.

Tudi miR-2861 in miR-3960 lahko vplivata na diferenciacijo osteoblastov, tako da z zaviranjem HDAC5 in HOXA2 posredno stimulirata izražanje RUNX2, prav tako pa lahko RUNX2 pozitivno ali negativno regulira izražanje nekaterih miRNA. (11) MiR-29a, miR-218 in miR-335-5p povečajo diferenciacijo osteoblastov, tako da zavrejo antagoniste WNT-ja, s tem pa okrepijo WNT/ β -kateninsko pot. (11, 15)

V primerjavi z miRNA vpletene v osteoblastogenezo, so miRNA vpletene v osteoklastogenezo manj raziskane. Najbolje poznamo vloge miR-21, miR-155 in miR-223.

Slednja se skoraj izključno izraža v kostnem tkivu. Prekomerno izražanje pre-miR-223 in inhibitorjev miR-223 zavira osteoklastogenezo, kar kaže, da prenizek ali previsok nivo te miRNA ni optimalen za učinkovito diferenciacijo osteoklastov. MiR-21 je vpletena v z RANKL inducirano osteoklastogenezo. Preko dvojno negativne povratne zanke poveča diferenciacijo osteoklastov in jih hkrati zaščiti pred apoptozo. Prav tako ima pomembno vlogo tudi v od estrogena odvisni osteoklastogenezi. Estrogen inhibira diferenciacijo osteoklastov in inducira njihovo apoptozo tako, da zavira biogenezo miR-21. Z zaviranjem miR-21 se posledično dvigne nivo FasL, ki je tarča miR-21 in inducira apoptozo osteoklastov. MiR-155 se specifično izraža v hematopoetičnih celicah in je tudi pomemben regulator osteoklastogeneze, njena tarča pa je transkripcijski dejavnik MITF in vnetni citokin TNF- α . (11, 24)

1.4.1 Vloga miRNA v osteoporozi

Li in sodelavci so v klinični študiji dokazali, da lahko miRNA prispevajo k nastanku osteoporoze. Homozigotsko mutacijo v genu za miR-2861 so povezali z redko obliko družinske osteoporoze. Povečano izražanje miR-2861 zavira izražanje epigenetskega regulatorja HDAC5. Zmanjšano izražanje HDAC5 vodi do povečanega izražanja RUNX2, ki spodbuja osteoblastogenezo. Utišanje miR-2861 *in vivo* v miših je vodilo v zavrtu gradnjo kosti in znižano MKG. (25) Lei in sodelavci so povezali tri polimorfizme znotraj gena za FGF2 s spremembami v MKG vratu stegenice. Polimorfizmi ležijo znotraj 3'-UTR mRNA, ki nosi zapis za FGF2, in so tarčno vezavno mesto za devet miRNA (miR-25, miR-32, miR-92, miR-92b, miR-146a, miR-146b, miR-363, miR-367 in miR-545). (26) Polimorfizem znotraj mRNA zmanjša učinkovitost vezave miRNA, kar povzroči povišano izražanje FGF2, posledično se poveča razgradnja kosti in zniža MKG. (11) Transgene miši, ki so jim v osteoblastih selektivno izrazili miR-34c, so kazale napake v proliferaciji osteoblastov in mineralizaciji kosti, ki so tipične za osteoporozne spremembe pri starih miših. To ni presenetljivo, saj je njena tarča RUNX2 in tumor supresorski dejavnik p53, direktno pa je vpletena tudi v diferenciacijo osteoblastov in osteoklastov. (15)

Dve študiji sta preučevali izražanje miRNA v mononuklearnih celicah periferne krvi pomenopavznih žensk z nizko in visoko MKG, tretja študija pa se je osredotočila na premenopavzne ženske z sistemskim lupusom in nizko MKG. Ugotovili so, da je bilo izražanje miR-503 močno znižano, medtem ko je bilo izražanje miR-133a signifikantno

zvišano. Kot direktno tarčo miR-503 so identificirali RANK. *In vivo* eksperiment na miših je pokazal, da utišanje izražanja miR-503 poveča kostno resorpcijo in zniža kostno maso. Funkcija miR-133 še ni poznana, *in silico* testi pa so predvideli, da so njene tarče geni CXCL11, CXCR3 in SLC39A1. MiR-148a so povezali z nizko MKG pri bolnicah z lupusom. Tako *in vitro* kot *in vivo* testi so dokazali, da miR-148a spodbuja osteoklastogenezo, saj je njena tarča MAFB, ki je negativni regulator transkripcijskih faktorjev NFATC1, C-FOS in MITF. Ker so vse tri miRNA prisotne v krvi, bi lahko služile kot potencialni biomarker osteoporoze in povečane kostne resorpcije. (11) Tudi povišano izražanje miR-214 v kostnem tkivu starejših ljudi z večimi zlomi je koreliralo z zmanjšano kostno tvorbo. Njena tarča je AFT4, ki spodbuja izražanje osteoblastno specifičnih genov, privzem aminokislin in sintezo kolagena tipa I. (11, 27)

1.5 IZVENCELICNE miRNA

Leta 2008 so prvič odkrili izvencelične miRNA v krvi, kasneje pa so ugotovili, da se nahajajo tudi v vseh drugih telesnih tekočinah. Dejstvo, da so te miRNA stabilne, je presenetljivo, saj serum in druge telesne tekočine vsebujejo ribonukleaze, kar kaže na to, da so miRNA pred njimi zavarovane. (28) Stabilnost izvenceličnih miRNA je posledica vključenosti v eksosome, mikrovezikle, apoptotska telesca, lipoproteinske komplekse ali pa so vezane na RNA-vezoče proteine. Poleg veziklov se miRNA lahko po krvi prenaša tudi vezana na delce HDL, redkeje tudi LDL. (29) Leta 2011 sta dve neodvisni raziskovalni skupini dokazali, da se kar 90–99% izvenceličnih miRNA ne prenaša po krvi v veziklih, ampak so vezane na RNA-vezoče proteine. *In vivo* so najpogosteje vezane na protein AGO2, redkeje na AGO1, *in vitro* pa se vežejo tudi na NPM1. Velika stabilnost AGO2 je elegantno razložila odpornost miRNA na nukleaze v bioloških tekočinah. (29, 30) Dejstvo, da se profil in nivo izraženih miRNA v veziklih razlikujeta od izvorne celice, kaže, da niso odpadni produkti celic, ampak imajo tudi funkcionalno vlogo v medcelični komunikaciji. (29 – 31) Po tem, ko se vezikel, ki vsebuje aktivne miRNA, izloči iz celice, ga lahko privzame druga celica, s tem pa miRNA spremeni transkriptom prejemniške celice. (32, 33) Trenutno poznamo štiri mehanizme, kako izvencelične miRNA vstopajo in vplivajo na tarčne celice:

- tarčne celice z endocitozo privzamejo izvencelične vezikle,
- izvencelični vezikli se zlijejo z membrano tarčne celice,

- vezikli imajo na svoji membrani specifične proteine, ki prepoznajo receptorje na tarčnih celicah, to pa spremeni celično signalizacijo v tarčni celici,
- na AGO2 vezane miRNA s pomočjo mediatorjev (transmembranski kanalček SID1, membranski receptor NRP1) vstopajo v prejemniške celice. (30, 32)

Ekström in sodelavci so prvi dokazali, da imajo izvencelične miRNA vlogo tudi v komunikaciji med osteoblasti in osteoklasti ter spodbujajo osteogenezo, tako da po privzemu v tarčni celici povečajo izražanje RUNX2 in BMP-2. (34)

1.5.1 Izvencelične miRNA kot biomarkerji

MiRNA bi lahko predstavljale nove, manj invazivne biokemične kazalce za diagnozo in spremljanje zdravljenja osteoporoze. Poleg minimalne invazivnosti in lahkega dostopa, imajo izvencelične miRNA veliko lastnosti idealnega biomarkerja. V telesnih tekočinah so obstojne tudi po štiriindvajsetih urah na sobni temperaturi, na njihovo integriteto ne vpliva sprememba pH in večkratno zamrzovanje in odmrzovanje vzorca. Prav tako so določene miRNA specifične glede na tip in razvojno stopnjo tkiva in celice. Čeprav se izvencelične miRNA v krvi nahajajo v precej majhnih količinah, jih lahko pomnožimo in tako ojačamo signal z različnimi metodami, kot je qPCR. (28)

Vendar na področju uporabe izvenceličnih miRNA ostaja nekaj težav. Prvo težavo predstavlja velika inter-individualna variacija v izvenceličnih miRNA glede na vpliv različnih dejavnikov, kot so številne bolezni, življenjski stil, cirkadiani ritmi. Veliko težavo predstavljata tudi nizka korelacija med platformami za kvantifikacijo miRNA in neenotnost pri normalizaciji rezultatov. Ponovljivost rezultatov lahko izboljšamo z razvojem boljših reagentov, standardizacijo postopkov in razvojem natančnejših metod za oceno kvantitete in kvalitete miRNA. (28, 32)

1.5.2 Izvencelične miRNA kot biomarkerji osteoporoze

Leta 2013 so Seeliger in sodelavci prvi iskali biomarkerske, cirkulirajoče miRNA v serumu pacientov z osteoporoznimi zlomi. Odkrili so devet miRNA (Preglednica 4) s povišanim izražanjem v primerjavi z zdravimi. Hkrati so odkrili povečano izražanje sedmih miRNA tudi v kostnem tkivu bolnikov z osteoporozo. Skupno pet miRNA kaže povečano izražanje hkrati v serumu in kostnem tkivu bolnikov ter tako predstavlja najboljšo možnost za uporabo v diagnostiki osteoporoze. (35) Podobno študijo so leta 2015 opravili Panach in sodelavci. Odkrili so samo tri miRNA (Preglednica 4), ki so kazale

povišano izražanje v serumu pacientov z osteoporoznimi zlomi v primerjavi s kontrolo. (36) Istega leta so Weilner in sodelavci v serumu pomenopavznih žensk z nedavnimi osteoporoznimi zlomi identificirali šest cirkulirajočih miRNA (Preglednica 4), ki so bile drugače izražene v primerjavi z zdravimi ženskami. Dodatni *in vitro* testi so pokazali, da kar pet od teh miRNA vpliva na osteogenično diferenciacijo MSC. (17) Meng in sodelavci so v vzorcih polne krvi osteopeničnih in osteoporoznih pomenopavznih žensk iskali potencialne biomarkerske miRNA. Identificirali so pet miRNA (Preglednica 4), ki so kazale razlike v izražanju med skupinami, vendar je samo povečano izražanje miR-194-5p negativno koreliralo z MKG. Dodatne analize so potrdile, da je samo miR-194-5p vpletena v patogenezo osteoporoze, saj ima vlogo v diferenciaciji osteoblastov in sodeluje v regulaciji Wnt signalne poti. (37) Li in sodelavci so preučevali korelacijo med tremi miRNA (Preglednica 4) v plazmi in MKG pri bolnikih z osteoporozo, osteopenijo in zdravih ljudeh. V primerjavi z zdravimi so bile vrednosti miR-21 pri bolnikih z osteoporozo in osteopenijo znižane, vrednosti miR-133a pa povišane. Plazemske koncentracije miR-21 in miR-133a so korelirale z MKG in bi jih lahko uporabili za razlikovanje med zdravimi in bolniki z osteoporozo. (38) Novejšo študijo so leta 2016 opravili Kocijan in sodelavci, v kateri so želeli odkriti cirkulirajoče miRNA, na podlagi katerih bi lahko ločili paciente z idiopatskimi nizkoenergetskimi zlomi in zdravimi brez zlomov. Prav tako so želeli analizirati razlike v izražanju miRNA med skupinami bolnikov z moško idiopatično osteoporozo (MIO), premenopavzno in pomenopavzno osteoporozo ter oceniti korelacijo teh miRNA z označevalci kostne remodelacije in MKG. Identificirali so 19 skupnih miRNA (Preglednica 4), ki so kazale razlike v izražanju v vseh skupinah v primerjavi s kontrolno. 8 izmed njih se jih je izkazalo za odlične diskriminatorje med skupino z nizkoenergetskimi zlomi in zdravimi, ne glede na spol in starost. Prav tako so ugotovili signifikantno korelacijo med miR-29b-3p in P1NP, med miR-140-5p in ITM, med miR-320a in iPTH in ITM, med miR-320a in ITM in P1NP ter med miR-19b-3p, miR-324-3p, miR-532-5p in MKG področja ledvene hrbtenice. (39) Istega leta so Heilmeyer in sodelavci analizirali ekspresijo izvenceličnih miRNA pri bolnicah z diabetesom tipa 2 in pomenopavznih ženskah z osteoporozo. Želeli so identificirati set miRNA, s katerimi bi lahko v klinični praksi ločili med osteoporoznimi zlomi in zlomi povezanimi z diabetesom. 23 miRNA (Preglednica 4) je bilo drugače izraženih pri pomenopavznih ženskah z osteoporoznimi zlomi v primerjavi s skupino brez zlomov. Za miRNA, ki so bile najboljši diskriminatorji med skupinama, so opravili *in vitro*

funkcionalne študije in ugotovili, da miR-382-3p signifikantno okrepi osteogenično diferenciacijo, medtem ko jo miR-550a-5p zavre. (40) Prav tako leta 2016 so Chen in sodelavci želeli odkriti referenčno, serumsko miRNA za normalizacijo rezultatov ter nove biomarkerske miRNA za diagnostiko osteoporoze. Za ustrezno referenčno miRNA so izbrali miR-25-3p, ki ni kazala razlik v izražanju med skupino pacientk z osteoporozo in zdravimi, prav tako pa je bila stabilno izražena med diferenciacijo osteoblastov in osteoklastov. Odkrili so 15 miRNA (Preglednica 4), ki so bile drugače izražene v primerjavi s kontrolno skupino, med njimi je bila miR-30b-5p signifikantno manj izražena v pomenopavznih ženskah z osteoporozo in osteopenijo, miR-103-3p, miR-142-3p, miR-328-3p pa so bile signifikantno manj izražene samo pri pacientkah z osteoporozo. Vse miRNA so pozitivno korelirale z MKG. (41) Bedene in sodelavci so leta 2016 v sklopu projekta Katedre za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo želeli v plazmi pomenopavznih žensk identificirati izvencelične miRNA, ki bi služile kot biološki označevalci osteoporoze. Izmed devetih merjenih miRNA je izražanje miR-148a-3p v plazmi osteoporoznih preiskovank bilo signifikantno povišano v primerjavi z zdravimi. Dodatna analiza je pokazala, da je miR-148a-3p pozitiven regulator diferenciacije osteoklastov. Poleg tega je miR-126-3p pozitivno korelirala z MKG distalne tretjine koželjnice, miR-423-5p pa je negativno korelirala z 10-letnim tveganjem za osteoporozni zlom. (42) Najnovejšo študijo, objavljeno leta 2017, so opravili Yavropoulou in sodelavci, ki so v serumu pomenopavznih žensk z nizko MKG in vretenčnimi zlomi iskali miRNA, ki regulirajo kostno presnovo. Odkrili so 5 miRNA (Preglednica 4), ki so bile drugače izražene v primerjavi s pomenopavznimi ženskami z normalnim MKG. (43)

Preglednica 4: Preučevane miRNA v omenjenih študijah, ki bi lahko služile kot novi biološki kazalci osteoporoze.

Avtor študije	Preučevane miRNA
Seeliger et al. (35)	V serumu: miR-21, miR-23a, miR-24, miR-93, miR-100, miR-122a, miR-124a, miR-125b, miR-148a V kostnem tkivu: miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100, miR-125b
Panach et al. (36)	miR-122-5p, miR-125b-5p, miR-21-5p
Weilner et al. (17)	miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-133b, miR-22-3p, miR-328-3p, let-7g-5p
Meng et al. (37)	miR-130b-3p, miR-151a-3p, miR-151b, miR-194-5p, miR-590-5p
Li et al. (38)	miR-21, miR-133a, miR-146a
Kocijan et al.	miR-152-3p, miR-30e-5p, miR-140-5p, miR-324-3p, miR-19b-3p,

(39)	miR-335-5p, miR-19a-3p, miR-550a-3p, miR-186-5p, miR-532-5p, miR-93-5p, miR-378a-5p, miR-320a, miR-16-5p, miR-215-5p, let-7b-5p, miR-29b-3p, miR-7-5p, miR-365a-3p
Heilmeyer et al. (40)	miR-382-3p, miR-181a-3p, miR-188-3p, miR-942, miR-642a-5p, miR-127-3p, miR-582-3p, miR-542-5p, miR-502-5p, miR-576-3p, miR-190a, miR-378a-5p, miR-1908, miR-155-5p, miR-342-5p, miR-377-3p, miR-369-3p, miR-495-3p, miR-500a-5p, miR-330-3p, miR-203a, miR-181d, miR-550a-5p
Chen et al. (41)	miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30e-5p, miR-425-5p, miR-142-3p, miR-191a-3p, miR-215, miR-29b-3p, miR-30b-5p, miR-26a-5p, miR-345-5p, miR-361-5p, miR-185-5p, miR-103-3p, miR-328-3p
Bedene et al. (42)	miR-148a-3p
Yavropoulou et al. (43)	miR-21-5p, miR-23a, miR-29a-3p, miR-124-3p, miR-2861

1.5.3 miRNA kot terapevtska tarča

Ugotovitev, da napake v izražanju in mutacije v miRNA vodijo v različna patološka stanja, je odprla možnosti za razvoj novih terapevtskih pristopov in iskanje novih terapevtskih tarč s ciljnim delovanjem. Terapije temeljijo na zaviranju miRNA s povečanim izražanjem ter nadomeščanju ali spodbujanju izražanja miRNA z znižanim izražanjem. (16, 20) Raziskave na področju uporabe miRNA za zdravljenje osteoporoze so še v povojih. Pri bolnikih z osteoporozo bi bilo smiselno zavirati miRNA, ki pospešujejo razgradnjo kosti in spodbuditi izražanje miRNA, ki zavirajo kostno razgradnjo in pospešujejo sintezo nove kostnine. (44 – 46)

1.6 VLOGA IZBRANIH miRNA

miR-21-5p

Zapis za miR-21-5p se nahaja na kromosomu 17q23.1, njeno izražanje pa je najvišje v ledvicah, manjše pa tudi srcu, testisih in možganih. (47) Spremenjeno izražanje miR-21 so povezali z večimi vrstami raka ter srčnim popuščanjem. (16) Močno se izraža v prekurzorjih osteoklastov, njeno izražanje pa se poveča med z RANKL inducirano osteoklastogenezo. Hkrati spodbuja osteoklastogenezo in zavira apoptozo osteoklastov. Transkripcijo miR-21-5p sprožijo transkripcijski faktorji za osteoklastogenezo c-Fos in PU.1. MiR-21-5p zavira izražanje PDCD4 ter tako zmanjša njegov zaviralni učinek na c-Fos, hkrati pa z RANKL inducirani c-Fos poveča izražanje miR-21-5p. c-Fos, miR-21-5p in PDCD4 tako ustvarijo pozitivno povratno zanko in spodbujajo osteoklastogenezo. miR-21-5p ima tudi ključno vlogo v osteoklastogenezi odvisni od estrogena. Estrogen zavira izražanje miR-21-5p, posledično pa se poveča izražanje FasL, ki je tarča miR-21-5p, kar

inducira apoptozo osteoklastov. (46) Izražanje miR-21 zavira tudi vnetni citokin TNF- α , ki ima ključno vlogo v osteoporozi, inducirani s pomanjkanjem estrogena. (48) MiR-21 zavira izražanje gena *Spry1*, ki je negativni regulator FGF in MAPK signalnih poti, tako pa okrepi diferenciacijo osteoblastov in tvorbo kosti. (11, 48)

miR-576-5p

Zapis za miR-576-5p se nahaja na kromosomu 4q25. Največ se izraža v ledvicah in srcu, nekoliko manj pa v testisih, možganih ter v malih možganih. (49) Njena vloga v kostnem tkivu še ni dobro poznana vendar so spremenjeno izražanje miR-576-5p povezali s kolorektalnim rakom in glioblastomom, kar nakazuje da ima pomembno vlogo v rasti in proliferaciji celic rakastih celic. (50, 51) miR-576-5p zavira izražanje proteina ITGBL1, tako pa posredno okrepi WNT/PCP signalno pot, ki ima ključno vlogo pri migraciji in invaziji rakastih celic. (52) Prado-Diaz in sodelavci so odkrili spremenjeno izražanje miR-576-5p v hondrocitih bolnikov z osteoartrozo v primerjavi z zdravimi. Z *in silico* analizo so predvideli, da je miR-576-5p vpletena v TGF β , MAPK, Wnt in mTOR signalne poti. (53)

let-7a-5p

Let-7a-5p spada v let-7 miRNA naddružino, zapis zanjo pa se nahaja na kromosomu 9q22.32. Njeno izražanje je najvišje v malih možganih, manjše v možganih in srcu, v manjšem obsegu pa se izraža v ledvicah in testisih. (54, 55) Let-7a je vpletena v rast in diferenciacijo matičnih celic, ker zavira izražanje *Cdc34*, *RAS* in *E2F5*, ki so ključni modulatorji njihove funkcije. Njena tarča so tudi *LIN28*, *HMGA2* in *MYC*, ki so vpleteni v vzdrževanje pluripotentnosti matičnih celic. *In silico* analiza je kot tarčo let-7a-5p identificirala 3' UTR mRNA za *Fas* in *FasL*. Prav tako je let-7a-5p vpletena v staranje in tumorogenezo. Zmanjšano izražanje let-7a so povezali z rastjo in razvojem osteosarkoma. (56, 57) Wei in kolegi so dokazali da miRNA iz družine let-7 spodbudijo osteogenezo in zavirajo adipogenezo MSC, ter spodbudijo gradnjo kosti *in vitro*, tako pa predstavljajo potencialno terapevtsko tarčo pri zdravljenju osteoporoze. (58) Predvidene tarče let-7a-5p so geni *MAP3K1*, *MAP4K4*, *FZD4*, *ACVR2A*, *USP32*, *USP6*, *USP44*, *NLK*, *UBE2G2* in *TRIOBP*. Let-7a zavira izražanje *NLK*, ki je inhibitor Wnt signalne poti, prav tako pa vpliva na MAPK in TGF β signalno pot. (59)

2.0 NAMEN DELA

Prevalenca osteoporoze se zaradi vedno daljše življenjske dobe povečuje, zaradi z njo povezanih osteoporoznih zlomov pa predstavlja velik zdravstveni ter socialno-ekonomski problem. Je multifaktorska bolezen, na njen nastanek pa vplivajo številni okoljski, genetski in epigenetski dejavniki, med katere uvrščamo tudi miRNA. Ti epigenetski dejavniki igrajo pomembno vlogo pri razvoju številnih kroničnih bolezni, tudi osteoporoze. Trenutni pristopi, ki se uporabljajo za diagnozo in spremljanje zdravljenja bolezni, imajo številne pomanjkljivosti, odkritje, da se stabilne, izvencelične miRNA nahajajo v telesnih tekočinah, pa je odprlo številne nove možnosti. MiRNA tako predstavljajo nove, manj invazivne biokemične kazalce za diagnozo in spremljanje zdravljenja osteoporoze, kot tudi tarčne zdravilne učinkovine.

Ker je uporaba miRNA kot bioloških označevalcev še v povojih in ostaja na tem področju še veliko težav, smo se odločili razviti metodo za merjenje izražanja miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p v plazmi pomenopavznih žensk. V ta namen bomo:

- zbrali in statistično analizirali podatke o preiskovankah (meritve MKG, meritve TBS, izpolnjen vprašalnik FRAX, anamnetični podatki, biokemijske preiskave),
- optimizirali postopek izolacije miRNA iz plazme,
- izolirali miRNA iz 200 vzorcev plazme pomenopavznih preiskovank in ocenili njihovo čistoto in koncentracijo,
- izvedli reverzno transkripcijo in z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazno v realnem času izmerili nivo miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p,
- z uporabo statističnih metod ugotovili ali se plazemski nivoji teh miRNA signifikantno razlikujejo med skupinama, ki smo jih glede na izračunane T-vrednosti ločili na skupino zdravih preiskovank in preiskovank z osteoporozo,
- z uporabo statističnih metod ugotovili ali se plazemski nivoji teh miRNA signifikantno razlikujejo med skupinama, ki smo jih glede na izmerjene vrednosti TBS ločili na skupino zdravih preiskovank in preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kosti.

3.0 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V študijo smo vključili 200 preiskovank v pomenopavznem obdobju, starih od 45 do 86 let. Opravili smo jim osnovne biokemijske in hematološke teste ter analizo urina in serumskih proteinov. Osteoporozo smo jim diagnosticirali na podlagi anamneze, družinske anamneze, merjenja MKG in TBS. Z metodo DXA smo jim izmerili MKG vratu stegenice, MKG trohantera, MKG intertrohantera, MKG kolka, MKG ledvene hrbtenice, MKG podlahtnice in MKG distalne tretjine koželjnice, za vsako pa smo jim izračunali tudi T vrednost. Preiskovanke so izpolnile FRAX vprašalnik, na podlagi katerega smo ovrednotili dejavnike tveganja za nastanek osteoporoze. Pred izolacijo miRNA smo v vseh vzorcih plazme na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) merili stopnjo hemolize pri valovni dolžini 414 nm.

V nadaljevanju smo iz študije izključili preiskovanke, ki so ustrezale naslednjim izključitvenim kriterijem:

- trenutno prejemajo ali so v preteklosti prejemale hormonsko nadomestno terapijo,
- prejemajo zdravila za zdravljenje osteoporoze (ne vključuje preventivno jemanje kalcija in vitamina D),
- v preteklosti so se več kot 3 mesece zdravile s sistemskimi glukokortikoidi,
- imajo sistemske ali druge presnovne bolezni, ki lahko vplivajo na kosti,
- vzorci plazme so bili hemolitični ($A_{414} > 0,2$) ali lipemični.

3.2 IZOLACIJA miRNA

Izolacijo smo izvedli s pomočjo miRNeasy Mini (Qiagen[®]) reagenčnega kompleta, saj je več študij dokazalo, da je izkoristek izolirane miRNA s tem kompletom največji. (60–62) Komplet združuje organsko ekstrakcijo in čiščenje RNA s silikatnimi membranami. Kot lizni reagent smo uporabili QIAzol[®], ki je enofazna raztopina fenola in gvanidin tiocianata ter inhibira ribonukleaze. Po dodatku kloroforma in centrifugiranju pride do ločitve vzorca na spodnjo organsko fazo, belo interfazo in zgornjo, brezbarvno vodno fazo, ki vsebuje RNA. Z organsko ekstrakcijo iz vzorca odstranimo celično DNA in proteine. Po tem, ko vodno fazo odstranimo, ji dodamo 100% etanol, ki zagotovi ustrezne pogoje za vezavo miRNA na kolono. Fenol in druge nečistote speremo s spiralnimi pufri. Na koncu na kolono dodamo vodo brez ribonukleaz in tako eluiramo miRNA s kolone. (63) Ker plazma

vsebuje nizke koncentracije miRNA, jih je težko učinkovito izolirati. Z namenom, da dodatno povečamo izkoristek ekstrakcije, smo tekom izolacije dodali koprecipitant glikogen. Dodatek glikogena signifikantno poveča izkoristek in ponovljivost ekstrakcije cirkulirajočih miRNA. (60, 64)

3.2.1 Postopek izolacije miRNA iz plazme

Izolacijo smo izvedli v komori DNA/RNA UV-CLEAR, UVC/T-M-AR (Biosan), ki smo jo predhodno očistili z RNaz-up (Sigma-Aldrich) in 15 minut osvetljevali z UV lučko. Uporabili smo optimiziran postopek izolacije miRNA, ki temelji na protokolu v priročniku miRNeasy Mini Handbook. (63)

1. Vzorce plazme, ki smo jih hranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo odtajali na sobni temperaturi ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$), jih premešali s pipetiranjem in nato prenesli $200\text{ }\mu\text{L}$ plazme v nove $1,5\text{ mL}$ epruvete.
2. V epruveti smo pripravili raztopino glikogena (iz *Mytilus edulis* 20 mg/mL ; Sigma-Aldrich) in QIAzol[®] liznega reagenta. V $750\text{ }\mu\text{L}$ liznega reagenta smo dodali $2,55\text{ }\mu\text{L}$ glikogena s koncentracijo $20\text{ }\mu\text{g/mL}$.
3. Raztopini glikogena in QIAzol[®] liznega reagenta smo dodali $1\text{ }\mu\text{L}$ sintetične kontrole UniSp4 in dobro premešali s pipetiranjem in vorteksiranjem.
4. Razdeljenim (aliquotiranim) vzorcem plazme smo dodali $750\text{ }\mu\text{L}$ pripravljene mešanice liznega reagenta, glikogena in UniSp4. Epruvete s homogenatom smo nato 5 minut inkubirali na sobni temperaturi.
5. Po končani inkubaciji smo v epruvete dodali $150\text{ }\mu\text{L}$ kloroforma, jih dobro zaprli, in močno vorteksirali 15 sekund , nato pa $2\text{--}3\text{ minute}$ inkubirali na sobni temperaturi.
6. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 minut na $12000 \times g$ pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugiranju se vzorec loči na tri faze.
7. Previdno smo prenesli $500\text{ }\mu\text{L}$ zgornje faze v nove epruvete in dodali $750\text{ }\mu\text{L}$ $100\text{ }\%$ etanola ter nato dobro premešali s pipetiranjem.
8. $700\text{ }\mu\text{L}$ vzorca smo prenesli na RNeasy[®] Mini membranske kolone, ki so v 2 mL zbiralnih epruveh. Zaprli smo pokrov kolone in jih pri sobni temperaturi 15 sekund centrifugirali na $8000 \times g$. Eluat smo zavrgli in ponovili korak, dokler ni zmanjkalo vzorca.
9. Na kolone smo nato dodali $700\text{ }\mu\text{L}$ spiralnega pufra RWT, zaprli pokrov in centrifugirali 15 sekund na $8000 \times g$. Eluat smo ponovno zavrgli.
10. V naslednjem koraku smo na kolone dodali spiralni pufer RPE ter ponovno centrifugirali 15 sekund na $8000 \times g$. Spiranje kolone s pufrom RPE smo ponovili še

enkrat, po drugem centrifugiranju pa smo zbiralne epruvete zavrgli ter RNeasy[®] Mini membranske kolone prenesli v nove 2 mL zbiralne epruvete. Stare zbiralne epruvete z eluatom smo zavrgli.

11. Kolone smo posušili tako, da smo jih pri polni hitrosti centrifugirali 2 minuti. Po centrifugiranju smo RNeasy[®] Mini membranske kolone prenesli v nove 1,5 mL zbiralne epruvete.

12. Za eluacijo miRNA smo na membrano kolone pipetirali 30 μ L vode brez ribonukleaz, zaprli pokrov in 1 minuto centrifugirali na $8000 \times g$. Kolone smo zavrgli, izolirane vzorce pa shranili na $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 MERJENJE ČISTOTE IN KONCENTRACIJE IZOLIRANE miRNA

Čistoto in koncentracijo izoliranih vzorcev smo merili s pomočjo spektrofotometra NanoDrop ND-1000. Na spektrofotometer smo nanесли 1,5 μ L vzorca in absorbanco merili pri valovnih dolžinah 230 nm, 260 nm in 280 nm. Nukleinske kisline imajo absorpcijski maksimum pri 260 nm, proteini pa pri 280 nm. S pomočjo razmerij A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230} smo ocenili čistoto izoliranih RNA. Pričakovana vrednost A_{260}/A_{280} za čiste RNA je ~ 2 , vrednost A_{260}/A_{230} pa 1,8 – 2,2. Spremembe v razmerjih lahko kažejo na napake v izolaciji in kontaminacijo s proteini, fenolom in glikogenom. (65)

3.4 REVERZNA TRANSKRIPCIJA

Reverzna transkripcija je sinteza cDNA na osnovi enoverižne RNA. (66) Prepis miRNA v cDNA smo izvedli z uporabo miRCURY LNA[™] Universal RT microRNA PCR – Universal cDNA synthesis kit (Exiqon). Reakcija se prične s prileganjem poli-A repa na zrelo miRNA. Na poli-A rep se komplementarno vežejo oligo-dT začetni oligonukleotidi s 3' degeneriranimi sidrom in 5' univerzalnim repom. Encim reverzna transkriptaza nato sintetizira cDNA. Pri tem nastane DNA:RNA dupleks, iz katerega Rnaza H odstrani RNA. (66, 67)

3.4.1 Priprava reakcijske zmesi in izvedba reverzne transkripcije

Pred izvedbo reverzne transkripcije smo odtajali vzorce in reagente na sobni temperaturi ter jih nato shranili na ledu. Spike-in smo pripravili tako, da smo mu dodali 80 μ L vode in ga močno vorteksirali ter ga pustili 15 minut na ledu. Encimsko mešanico smo iz hladilnika vzeli tik pred uporabo. Reakcije smo izvedli na MicroAmp[®] miktrotirski plošči s

96 vdolbinami (Applied Biosystems®) po navodilih proizvajalca. (65) Vzorcev nismo redčili, v reakcijsko zmes (Preglednica 5) pa zaradi nizkih koncentracij miRNA nismo dodali vode, ampak smo namesto 2 µL dodali 6,5 µL vzorca. Znotraj ene plošče smo vključili tudi dve pozitivni kontroli, izolirani iz dveh kontrolnih vzorcev plazme. Reakcijo smo izvedli v cikličnem termostatu Termocycler Primus 96 (Peqlab) po programu, ki je prikazan v Preglednici 6. Inkubacija je potekala 60 minut na 42 °C, sledila je inaktivacija reverzne transkriptaze 5 minut na 95 °C, nato pa se je zmes ohladila na 4 °C.

Preglednica 5: Sestava reakcijske zmesi za prepis miRNA v cDNA.

Reagenti	Volumen (µL)
5x reakcijski pufer	2
Voda brez nukleaz	/
Encimska mešanica	1
Spike-in UniSp6	0,5
Vzorci z miRNA	6,5
Skupni volumen	10

Preglednica 6: Program za prepis miRNA v cDNA.

	Inkubacija	Inaktivacija	Shranitev
Temperatura	42 °C	95 °C	4 °C
Čas	60 min	5 min	∞

3.5 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-qPCR) je zanesljiva in enostavna tehnika pomnoževanja nukleinskih kislin, ki med samo reakcijo omogoča sočasno kvantifikacijo produkta v vsakem ciklu. Temelji na PCR, torej poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanja. Sprva pri visoki temperaturi razklenemo verige DNA, nato pri nižani temperaturi pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov, v zadnjem koraku pa pri optimalni temperaturi termostabilna DNA-polimeraza v smeri 5' proti 3' izgradi komplementarno verigo DNA. Pri qPCR detekcijo dosežemo z uporabo fluorescenčnih barvil. Poznamo specifičen in nespecifičen način detekcije. V našem primeru smo uporabili

nespecifičen način detekcije s fluorescenčnim barvilom SYBR[®] Green, ki se reverzibilno vrine v dvovertično DNA. Prosto barvilo ima nezaznavno fluorescenco, vezano v DNA pa ob ekscitaciji močno fluorescira. Kinetika PCR vključuje eksponentno in linearno fazo ter plato, vendar lahko samo v eksponentni fazi iz količine PCR produkta zanesljivo sklepamo o začetnem številu kopij matrice v vzorcu. Na eksponentnem delu krivulje označimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja mejo, kjer je intenziteta fluorescence signifikantno večja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo kvantifikacijski cikel (C_q), ko ta prag preseže. Morebitno prisotnost nespecifičnih produktov preverimo s talilno analizo. Po zaključku pomnoževanja zmes postopoma segrevamo in sproti merimo fluorescenco. Pri T_m zaznamo največji padec fluorescence, kar predstavlja vrh na grafu odvisnosti prvega negativnega odvoda fluorescence po temperaturi (-dF/dT) od temperature. Kadar je prisoten samo en vrh, lahko sklepamo na odsotnost nespecifičnih produktov. (68)

3.5.1 Priprava reakcijske zmesi in izvedba qPCR

qPCR smo izvedli po navodilih proizvajalca (67) s pomočjo miRCURY LNA[™] Universal RT microRNA PCR – ExiLENT SYBR[®] Green master mix (Exiqon) reagenčnega kompleta. Pred izvedbo smo cDNA, vodo brez nukleaz in osnovno zmes za PCR odtajali na ledu. Osnovno zmes za PCR smo zaščitili pred svetlobo, vse reagente pa pred uporabo dobro premešali. Vzorce cDNA smo redčili 40× z vodo brez nukleaz, reakcijsko zmes pa smo pripravili, kot je prikazano v Preglednici 7. Vzorce smo normalizirali glede na volumen in ne glede na koncentracijo RNA. Vso pipetiranje v mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinicami (Starstedt) smo izvedli z robotom QIAgility (Qiagen[®]). Reakcije smo izvedli v duplikatih, vključili pa smo tudi negativno kontrolo. Po tem, ko smo v vdolbinice mikrotitrne ploščice reagentom dodali vzorce cDNA, smo ploščico prekrili s samolepilno folijo (Starstedt) in jo centrifugirali 1 minuto na 1500 × g, da se znebimo mehurčkov. Reakcijo smo izvedli v cikličnem termostatu LightCycler[®] 480II (Roche) po programu v Preglednici 8.

Preglednica 7: Sestava reakcijske zmesi za qPCR.

Reagenti	Volumen (μL)
PCR osnovna zmes	5
PCR zmes oligonukleotidnih začetnikov	1
40 \times redčen vzorec cDNA	4
Skupni volumen	10

Preglednica 8: Program za izvedno qPCR.

	Temperatura	Čas	Sprememba temperature
Denaturacija / aktivacija polimeraze	95 °C	10 min	/
Pomnoževanje (45 ciklov)	95 °C	10 s	1.6 °C/s
	60 °C	1 min	

3.6 KVANTIFIKACIJA IZRAŽANJA miR-21-5p, miR-576-5p IN let-7a-5p

Izvedli smo relativno kvantifikacijo z $\Delta\Delta\text{Cq}$ metodo, kjer smo primerjali vrednosti ΔCq tarčne miRNA in ΔCq eksterne sintetične kontrole UniSp4. Iz analize smo izključili PCR reakcije, ki so imele pri analizi talilne krivulje več kot en vrh. Reakcije smo izvedli v duplikatih, zato smo za vsak vzorec, endogeno sintetično kontrolo UniSp4 in pozitivne kontrolne vzorce sprva izračunali povprečne vrednosti Cq in standardne odklone meritev. Izražanje miRNA smo kvantificirali po enačbi 1:

$$\begin{aligned} \Delta\text{Cq}(\text{vz}) &= \text{Cq}(\text{poz. kontrole}) - \text{Cq}(\text{vz}); \text{ in} \\ \Delta\text{Cq}(\text{UniSp4}) &= \text{Cq}(\text{poz. kontrole}) - \text{Cq}(\text{UniSp4}); \text{ tako da je} \\ \Delta\Delta\text{Cq}(\text{vz}) &= \Delta\text{Cq}(\text{UniSp4}) - \Delta\text{Cq}(\text{vz}) \end{aligned} \tag{1}$$

Pri tem je $\text{Cq}(\text{vz})$ povprečni kvantifikacijski cikel tarčne miRNA, $\text{Cq}(\text{UniSp4})$ povprečni kvantifikacijski cikel eksterne sintetične kontrole in $\text{Cq}(\text{poz. kontrole})$ je povprečni kvantifikacijski cikel pozitivnega kontrolnega vzorca.

3.7 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV S PROGRAMOM SPSS

Statistično analizo podatkov smo opravili s pomočjo računalniškega programa SPSS Statistics 24.0 (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Preiskovanke smo razdelili v skupine glede na dva kriterija. Prvi kriterij razdelitve je bila T-vrednost, pri čemer smo preiskovanke, ki so imele vsaj eno izmed izmerjenih T-vrednosti manjšo ali enako -2,5, razvrstili v skupino preiskovank z osteoporozo (N=63), ostale pa v kontrolno skupino zdravih preiskovank (N=91). Iste preiskovanke smo nato razdelili še glede na meritve TBS. Preiskovanke, katerim smo izmerili TBS manjši ali enak 1,2, smo razvrstili v skupino preiskovank s porušeno kostno mikroarhitekturo (N=26), ostale smo razvrstili v kontrolno skupino (N=128).

Podatke o kvantifikacijskih ciklih miRNA in podatke o preiskovancih smo uvozili v program in opravili naslednje statistične teste:

- Shapiro-Wilk test, s katerim smo preverili normalnost porazdeljevanja vnesenih podatkov,
- Levenov test homogenosti varianc,
- t-test za neodvisne vzorce, s katerim smo ugotavljali, ali se merjeni parametri, podatki o preiskovankah in izražanje miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p signifikantno razlikujejo med skupinami.

Vrednosti statistične analize (p), ki so manjše kot 0,050, smo opredelili kot statistično značilno razliko.

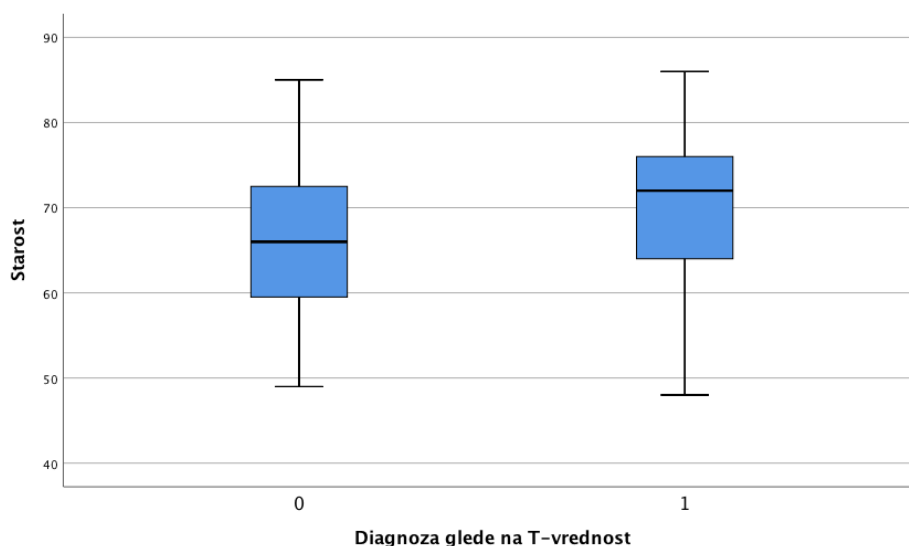
4.0 REZULTATI

4.1 STATISTIČNA ANALIZA POPULACIJE

Statistična analiza FRAX

Skupni vpliv poglavitnih dejavnikov tveganja za razvoj osteoporoze smo ovrednotili s pomočjo računalniškega modela FRAX, ki smo ga statistično analizirali. V vprašalnik so bili vključeni podatki o starosti, telesni masi in višini, predhodnih zlomih pri pacientih in bližnjih sorodnikih, jemanju glukokortikoidov, kajenju, količini zaužitega alkohola ter prisotnosti bolezni, ki vplivajo na kosti.

Povprečna starost zdravih preiskovank je 65,9 let \pm 8,2 let, povprečna starost preiskovank z osteoporozo pa 69,9 let \pm 8,3 let (Grafikon 1). Razlika v starosti med skupinama je signifikantna ($p=0,004$), in sicer so preiskovanke z osteoporozo so v povprečju starejše od zdravih preiskovank.



Grafikon 1: Grafična primerjava mediane in percentilov starosti zdravih preiskovank (0–levo) in preiskovank z osteoporozo (1–desno).

21,6 % preiskovank je že doživelo predhodne spontane oziroma nizkoenergetske zlome, 10,3 % preiskovank pa je navedlo, da so njihovi starši doživeli zlom kolka (Diagram 1, 2). Kadi 12,3 % preiskovank, 5 preiskovank pa trenutno prejema peroralne glukokortikoide oziroma so jim v preteklosti bile izpostavljene več kot 3 mesece (Diagram 3, 4). 2 preiskovanki imata potrjen revmatoidni artritis, prav tako imata 2 preiskovanki sekundarno osteoporozo (Diagram 5, 6). Več kot 3 dl alkohola na dan pa popije 1 preiskovanka (Diagram 7).

Diagram 1: predhodni zlomi

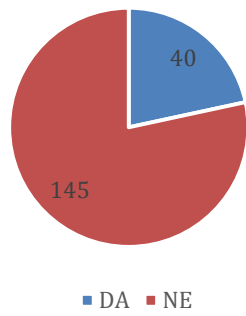


Diagram 2: zlom kolka pri starših

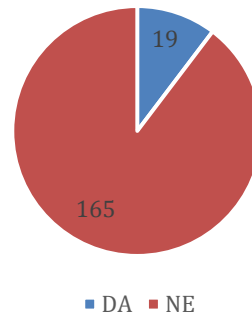


Diagram 3: kajenje sedaj

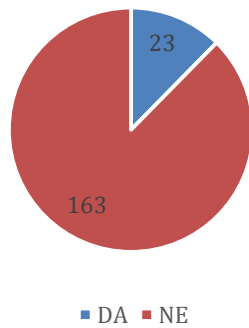


Diagram 4: glukokortikoidi

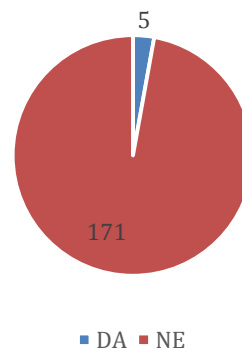


Diagram 5: revmatoidni artritis

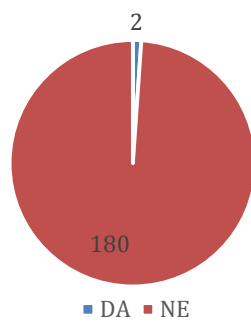


Diagram 6: sekundarna osteoporoza

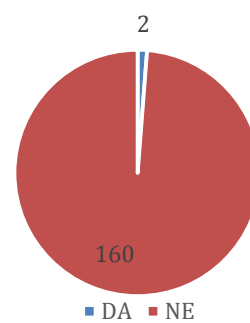
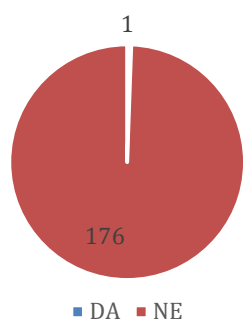
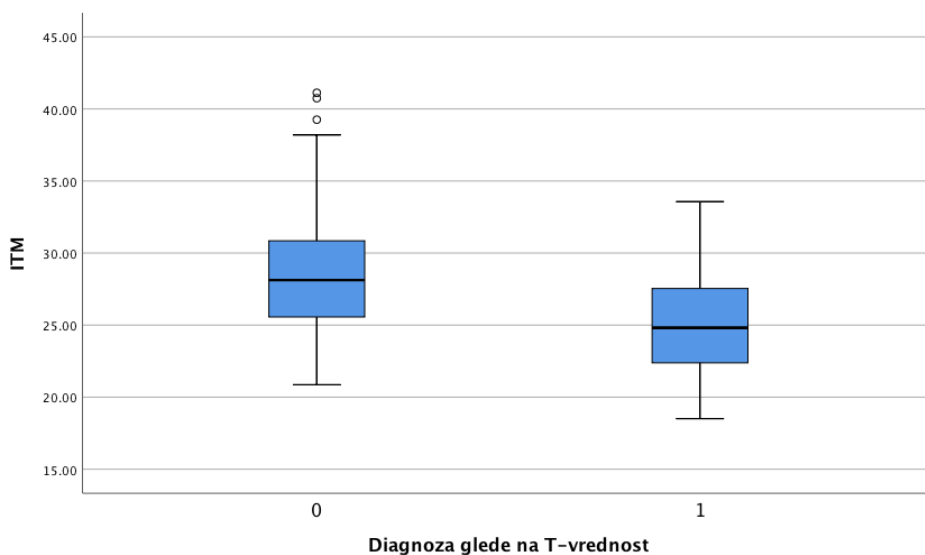


Diagram 7: alkohol > 3 dl/dan



Povprečna telesna teža vseh preiskovank je $69,7 \text{ kg} \pm 11,4 \text{ kg}$, povprečna telesna višina pa $160,1 \text{ cm} \pm 6,3 \text{ cm}$. Povprečna telesna teža zdravih preiskovank je $74,2 \text{ kg} \pm 10,7 \text{ kg}$, povprečna teža preiskovank z osteoporozo pa $63,2 \text{ kg} \pm 8,9 \text{ kg}$. Povprečna telesna višina zdravih je $160,1 \text{ cm} \pm 6,4 \text{ cm}$, povprečna višina osteoporoznih preiskovank pa $159,1 \text{ cm} \pm 6,2 \text{ cm}$. Na podlagi telesne teže in višine smo izračunali ITM preiskovank. Povprečen ITM preiskovank brez osteoporoze je $28,7 \text{ kg/m}^2 \pm 4,4 \text{ kg/m}^2$, povprečen ITM preiskovank z osteoporozo pa $24,9 \text{ kg/m}^2 \pm 3,2 \text{ kg/m}^2$ (Grafikon 2). Skupini se signifikantno razlikujeta v telesni teži ($p < 0,001$), ne pa tudi v telesni višini ($p = 0,98$). Med skupinama se razlikuje tudi ITM preiskovank, tiste z osteoporozo imajo signifikantno nižji ITM ($p < 0,001$).



Grafikon 2: Grafična primerjava mediane in percentilov ITM zdravih preiskovank (0–levo) in preiskovank z osteoporozo (1–desno).

Statistična analiza anamnetičnih podatkov preiskovank

Pri postavitvi diagnoze osteoporoze nam je pomagala tudi podrobna anamneza bolnikov. V vprašalnik, ki smo ga statistično analizirali, so bili vključeni podatki o dejavnikih tveganja za razvoj osteoporoze, kot so: kronične bolezni ledvic, ščitnice, jeter, nevrološke motnje, srčno-žilne bolezni in diabetes tipa I.

4 preiskovanke so že doživele predhodni zlom kolka, diabetes pa jih ima 6,9 % (Diagram 8, 9). 50,5 % preiskovank ima povišan krvni tlak, 9 pa jih je že doživelo srčni infarkt (Diagram 10, 11). 5 preiskovank je doživelo možgansko kap, 22 jih je prebolelo ali trenutno ima raka, 19,2 % preiskovank pa ima diagnosticirane bolezni ščitnice (Diagram 12, 13, 14).

Diagram 8: zlom kolka

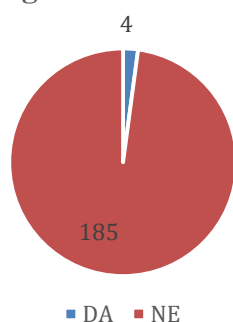


Diagram 9: diabetes

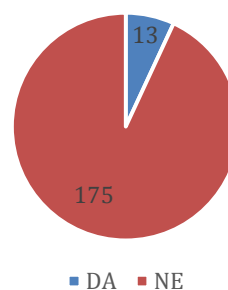


Diagram 10: povišan krvni tlak

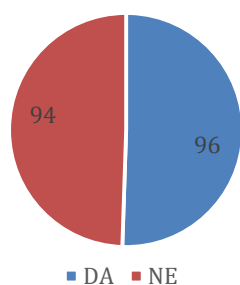


Diagram 11: srčni infarkt

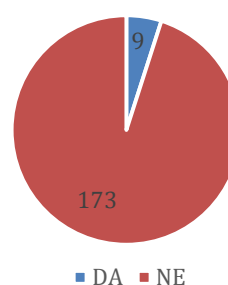


Diagram 11: možganska kap

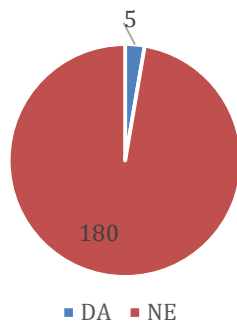


Diagram 12: rak

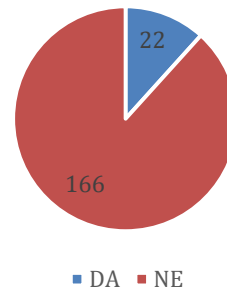
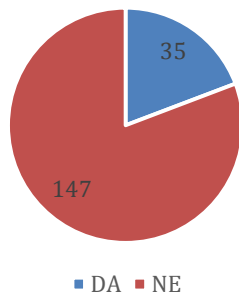
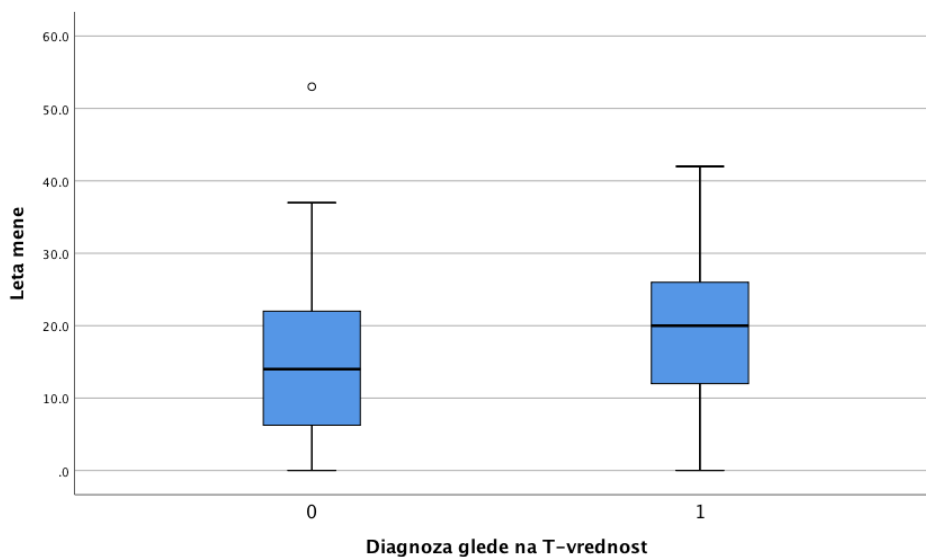


Diagram 13: bolezni ščitnice



Povprečna leta mene pri zdravih preiskovankah znašajo $14,7 \text{ let} \pm 10,2 \text{ let}$, pri preiskovankah z osteoporozo pa $19,3 \text{ let} \pm 10,9 \text{ let}$. (Grafikon 3) Skupini se signifikantno razlikujeta glede na leta mene ($p=0,009$).



Grafikon 3: Grafična primerjava mediane in percentilov let mene med zdravimi preiskovankami (0–levo) in preiskovankami z osteoporozo (1-desno).

4.2 ANALIZA MERITEV MKG IN TBS

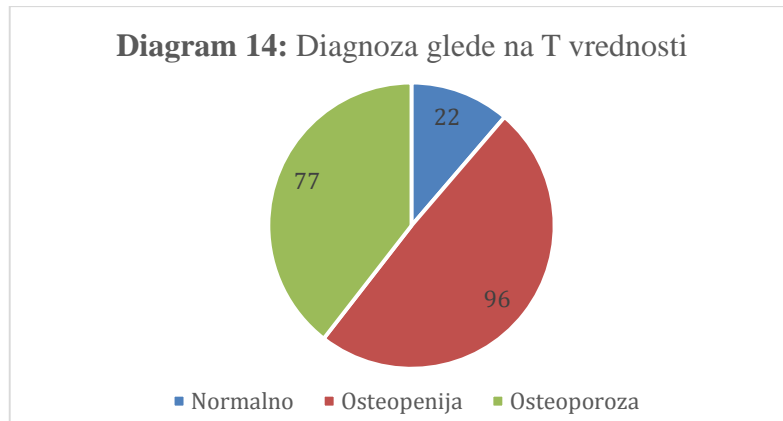
Vsem preiskovankam smo z metodo DXA izmerili naslednje MKG: vratu stegenice, trohantera, intertrohantera, kolka, ledvene hrbtenice, podlahtnice in distalne tretjine koželjnice. Za vsako meritev MKG smo izračunali tudi T-vrednost, na podlagi katere smo ocenili ali ima preiskovanka osteoporozo. (Preglednica 9) Osteoporozo potrdimo, če je zmanjšanje MKG za 2,5 ali več SD od pričakovane največje kostne gostote v zgodnji odrasli dobi, upoštevajoč spol in raso (Preglednica 1). (1)

Preglednica 9: Število preiskovank, ki ima za vsako meritev MKG izračunane T-vrednosti normalne, osteopenične ali osteoporozne.

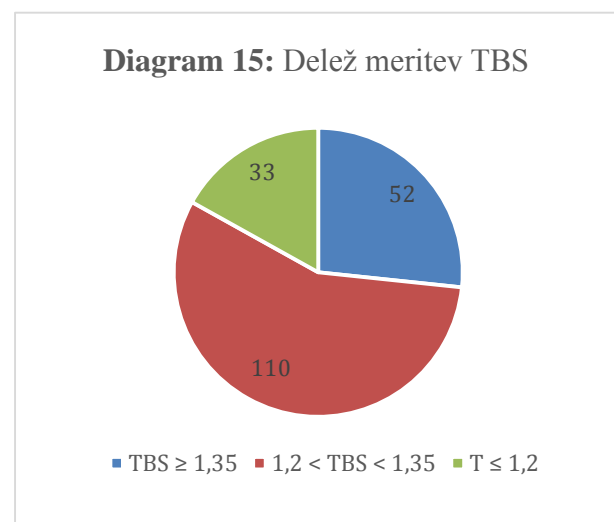
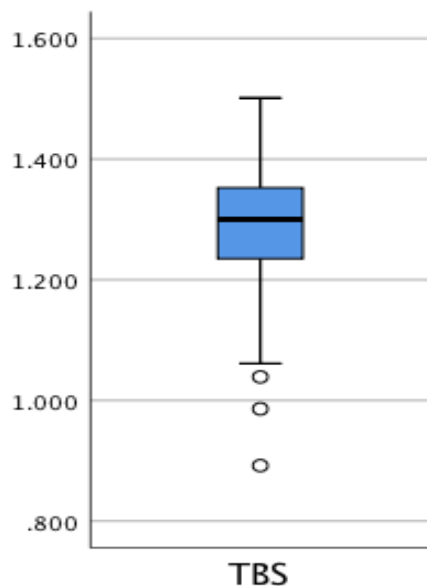
	Normalno $T \geq -1 \text{ SD}$	Osteopenija $-2,5 \text{ SD} < T < -1 \text{ SD}$	Osteoporozna $T \leq -2,5 \text{ SD}$
T_vs	64	110	21
T_troh	125	62	8
T_itroh	138	54	3
T_th	112	77	6
T_lh	85	75	34
T_podl	68	80	43
T_kož	66	71	54
SKUPAJ	22	96	77

Legenda: T_vs – T-vrednost vratu stegenice, T_troh – T-vrednost trohantera, T_itroh – T-vrednost intertrohantera, T_th – T-vrednost kolka, T_lh – T-vrednost ledvene hrbtenice, T_podl – T-vrednost podlahti, T_kož – T-vrednost distalne tretjine koželjnice

Skupaj ima 77 preiskovank vsaj eno izmed izračunanih T-vrednosti manjšo ali enako -2,5, kar pomeni, da imajo osteoporozo. 96 preiskovank ima vsaj eno izmed T-vrednosti manjšo kot -1 in večjo od -2,5, pri tem pa nima drugih T-vrednosti manjših od -2,5, kar pomeni, da imajo osteopenijo. 22 preiskovank ima vse izračunane T-vrednosti enake ali večje kot -1, kar pomeni, da so zdrave (Diagram 14).



Mikroarhitekturo kostnih trabekul pri pomenopavznih ženskah smo ocenili glede na izmerjene vrednosti TBS (Grafikon 4). 52 preiskovank je imelo vrednosti TBS enake ali večje kot 1,35, kar pomeni, da imajo normalno mikroarhitekturo kostnih trabekul. 110 preiskovank ima vrednosti TBS manjše kot 1,35 in večje kot 1,2, kar pomeni, da imajo že delno porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva. 33 preiskovank ima vrednosti TBS manjše oziroma enake 1,2, kar pomeni, da imajo hudo degradirano kostno mikroarhitektruo (Diagram 15).



Grafikon 4: Grafična predstavitev mediane in percentilov meritev TBS.

V nadaljevanju smo preiskovanke razdelili v skupine glede na izmerjene T-vrednosti in TBS. Prvo skupino zdravih predstavljajo preiskovanke, ki so imele vse T-vrednosti večje kot -2,5. Preiskovanke, ki niso ustrezale kriteriju in so imele vsaj eno T-vrednost manjšo

ali enako -2,5, smo razvrstili v skupino preiskovank z osteoporozo. S t-testom neodvisnih spremenljivk smo ugotovili signifikantne razlike ($p < 0,001$) v vseh izmerjenih vrednostih MKG med skupino zdravih preiskovank in preiskovank z osteoporozo (Preglednica 10). Prav tako smo ugotovili signifikantno razliko ($p = 0,008$) med kvaliteto kostnih trabekul zdravih preiskovank in osteoporoznih preiskovank (Preglednica 10). Preiskovanke z osteoporozo so imele signifikantno nižje vrednosti TBS kot zdrave preiskovanke.

Preglednica 10: Razlike v izmerjeni MKG in TBS med skupino zdravih preiskovank in skupino preiskovank z osteoporozo.

Diagnoza glede na T-vrednost			
	Zdravi (N=91)	Bolni (N=63)	p
MKG_vs	0,73±0,09	0,62±0,08	<0,001
MKG_troh	0,66±0,07	0,55±0,08	<0,001
MKG_itroh	1,07±0,14	0,91±0,13	<0,001
MKG_th	0,89±0,09	0,76±0,10	<0,001
MKG_lh	0,96±0,17	0,81±0,13	<0,001
MKG_podl	0,50±0,12	0,43±0,06	<0,001
MKG_kož	0,60±0,14	0,53±0,07	<0,001
TBS	1,31±0,09	1,27±0,08	0,008

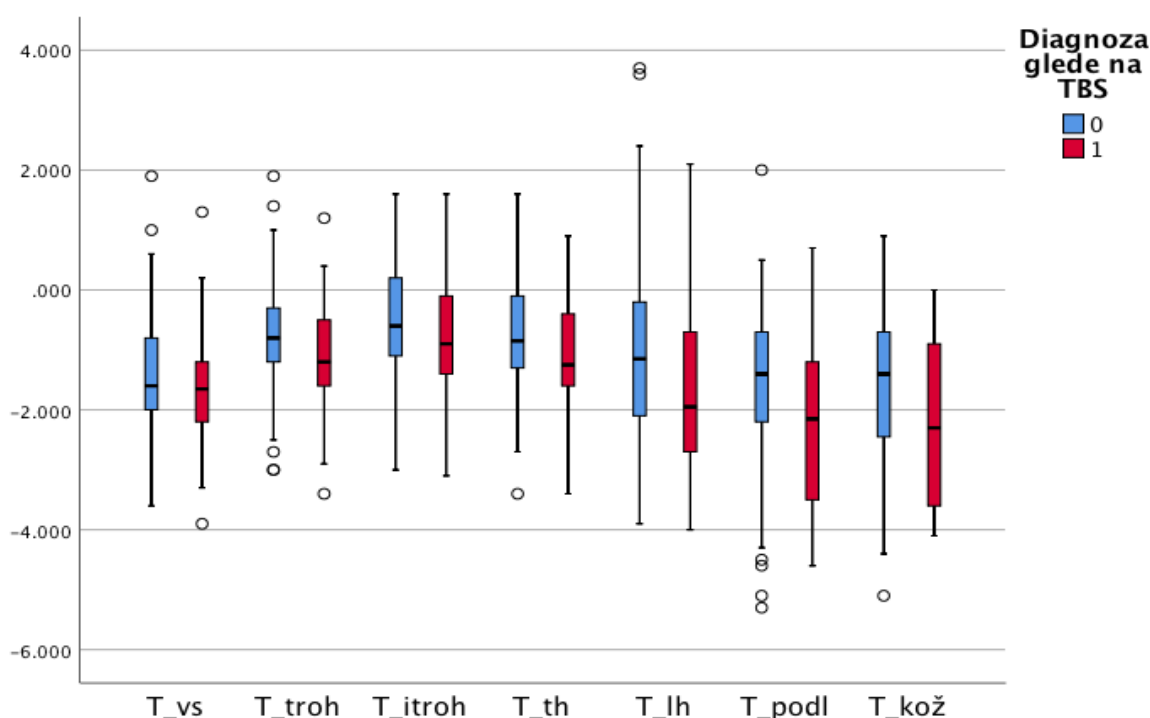
Legenda: MKG_vs – MKG vratu stegenice, MKG_troh – MKG trohantera, MKG_itroh – MKG intertrohantera, MKG_th – MKG kolka, MKG_lh – MKG ledvene hrbtenice, MKG_podl – MKG podlahti, MKG_kož – MKG distalne tretjine koželjnice, TBS – ocena kvalitete kostnih trabekul, N – število preiskovank, p – rezultat statistične analize

Drugo delitev preiskovank v skupine smo opravili na podlagi meritev TBS. Preiskovanke z vrednostjo TBS več kot 1,2 smo razvrstili v skupino zdravih, preiskovanke, ki pa so imele vrednosti TBS manj ali enake 1,2, pa smo razvrstili v skupino preiskovank s porušeno kostno mikroarhitekturo. Na podlagi t-testa neodvisnih spremenljivk smo ugotovili signifikantne razlike (Preglednica 11) med skupinama v T-vrednosti trohantera ($p = 0,040$), T-vrednosti ledvene hrbtenice ($p = 0,035$), T-vrednosti podlahtnice ($p = 0,006$) in T-vrednosti distalne tretjine koželjnice ($p = 0,003$). Omenjene T-vrednosti so bile nižje pri preiskovankah s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva. Razlike med skupinama ni bilo pri T-vrednosti vratu stegenice ($p = 0,219$), T-vrednosti intertrohantera ($p = 0,155$) in T-vrednosti kolka ($p = 0,059$).

Preglednica 11: Razlike v T-vrednosti med skupino zdravih preiskovankin skupino preiskovank z degenerirano mikroarhitekturo kosti.

Diagnoza glede na TBS			
	Zdravi (N=128)	Bolni (N=26)	p
T_vs	-1,42±0,92	-1,67±1,07	0,219
T_troh	-0,74±0,87	-1,14±1,06	0,040
T_itroh	-0,48±0,9	-0,78±1,14	0,155
T_th	-0,76±0,88	-1,13±1,09	0,059
T_lh	-1,06±1,41	-1,71±1,44	0,035
T_podl	-1,52±1,26	-2,31±1,48	0,006
T_kož	-1,55±1,21	-2,36±1,38	0,003

Legenda: T_vs – T-vrednost vratu stegenice, T_troh – T-vrednost trohantera, T_itroh – T-vrednost intertrohantera, T_th – T-vrednost kolka, T_lh – T-vrednost ledvene hrbtenice, T_podl – T-vrednost podlahti, T_kož – T-vrednost distalne tretjine koželjnice, N – število preiskovank, p – rezultat statistične analize

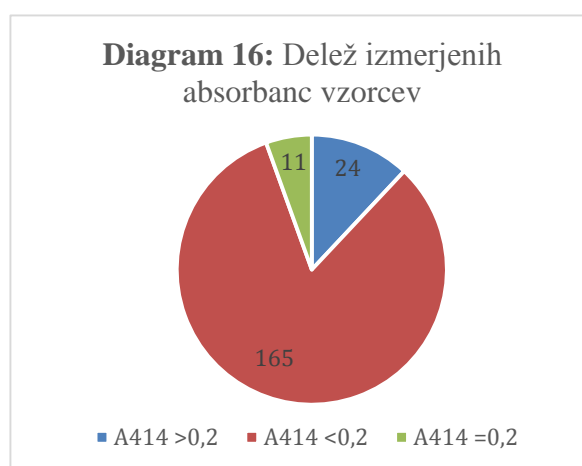
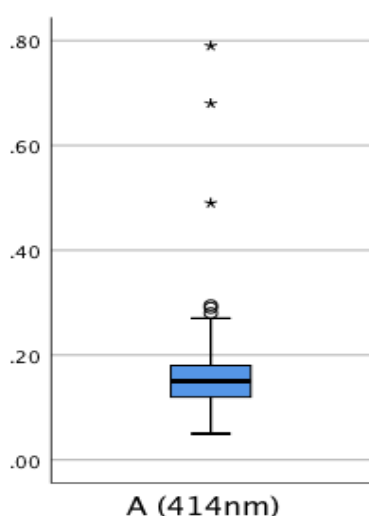


Grafikon 5: Grafična predstavitev primerjave median in percentilov izračunanih T-vrednosti na različnih delih skeleta med skupino zdravih preiskovank (0–modro) in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kosti (1–rdeče).

Legenda: T_vs – T-vrednost vratu stegenice, T_troh – T-vrednost trohantera, T_itroh – T-vrednost intertrohantera, T_th – T-vrednost kolka, T_lh – T-vrednost ledvene hrbtenice, T_podl – T-vrednost podlahti, T_kož – T-vrednost distalne tretjine koželjnice

4.3 MERJENJE HEMOLIZE VZORCEV

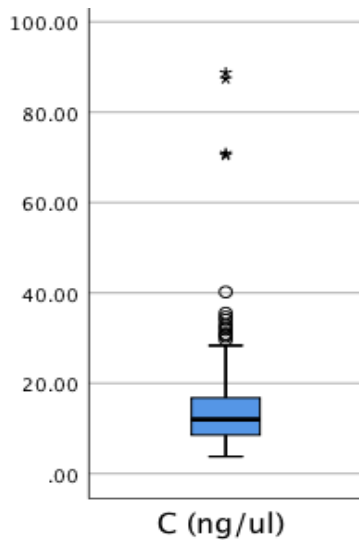
Pred izolacijo miRNA smo v vzorcih plazme spektrofotometrično merili stopnjo hemolize pri valovni dolžini 414 nm. Če je bila $A_{414} > 0,2$, smo vzorec izločili iz nadaljnjih preiskav. Porazdelitev rezultatov merjenja hemolize na NanoDrop ND-1000 je prikazana v Grafikonu 6. Povprečna vrednost A_{414} je $0,16 \pm 0,07$. 165 izoliranih vzorcev ima vrednosti $A_{414} < 0,2$, 11 vzorcev ima mejno vrednost $A_{414} = 0,2$, 24 vzorcev pa ima vrednost $A_{414} > 0,2$, zato smo jih izključili iz nadaljnjih preiskav (Diagram 16).



Grafikon 6: Grafična predstavitev mediane in percentilov izmerjenih absorbanc vseh vzorcev plazme pri valovni dolžini 414 nm na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

4.4 KONCENTRACIJA IZOLIRANIH miRNA

Po izolaciji smo koncentracijo izoliranih miRNA merili s pomočjo spektrofotometra NanoDrop ND-1000. Koncentracijo smo merili pri absorpcijskem maksimumu nukleinskih kislin (260 nm), koncentracijo izolirane miRNA pa je spektrofotometer samodejno podal v $\text{ng}/\mu\text{L}$. Rezultati meritev merjenja koncentracije izoliranih miRNA z miRNeasy Mini (Qiagen®) regenčnim kompletom so prikazani v Grafikonu 7. Povprečna koncentracija izolirane miRNA iz vzorcev je $15,0 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 11,7 \text{ ng}/\mu\text{L}$.



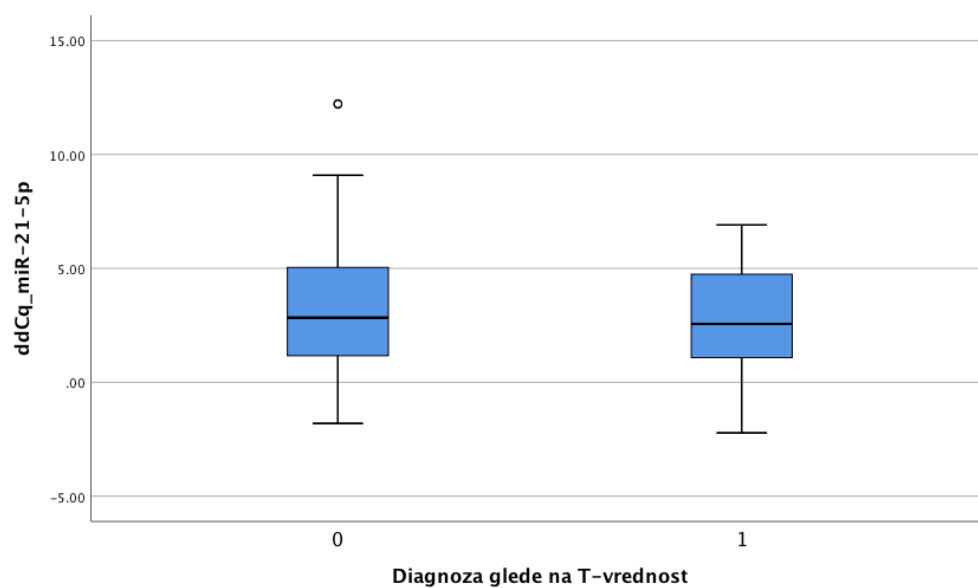
Grafikon 7: Grafična predstavitev mediane in percentilov izmerjenih koncentracij (ng/ μ L) izoliranih miRNA iz vzorcev plazme preiskovank na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

4.5 MERJENJE NIVOJA miRNA S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

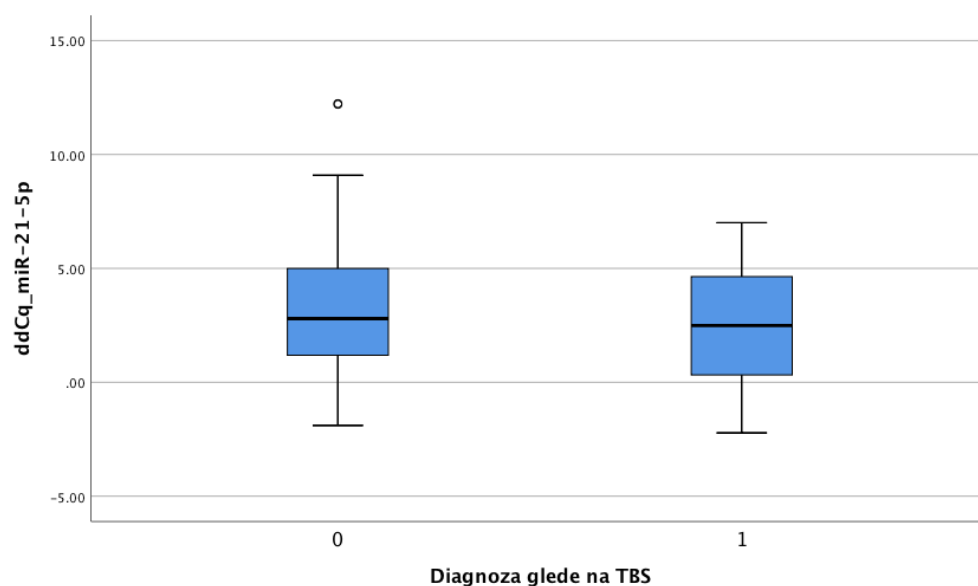
Na podlagi surovih podatkov o Cq vzorcev, sintetične kontrole UniSp4 in pozitivnih kontrolnih vzorcev smo s pomočjo enačbe 1 kvantificirali nivo miRNA. S t-testom za neodvisne vzorce smo želeli ugotoviti, ali se nivoji miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p signifikantno razlikujejo med skupino zdravih preiskovank in skupino preiskovank z osteoporozo (Grafikon 8, 10, 12). Ugotovili smo, da se plazemski nivo miR-21-5p med skupinama ne razlikuje ($p=0,252$), prav tako pa se med skupinama ne razlikuje nivo miR-576-5p ($p=0,898$) in let-7a-5p ($p=0,538$) (Preglednica 12).

Ponovno smo izvedli t-test za neodvisne vzorce, vendar smo tokrat želeli ugotoviti razliko v nivoju miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p med skupino zdravih preiskovank in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva (Grafikon 9, 11, 13). Tudi v tem primeru nismo ugotovili statistične razlike v plazemskem nivoju miR-21-5p ($p=0,239$), miR-576-5p ($p=0,511$) in let-7a-5p ($p=0,310$) med skupinama (Preglednica 12).

miR-21-5p

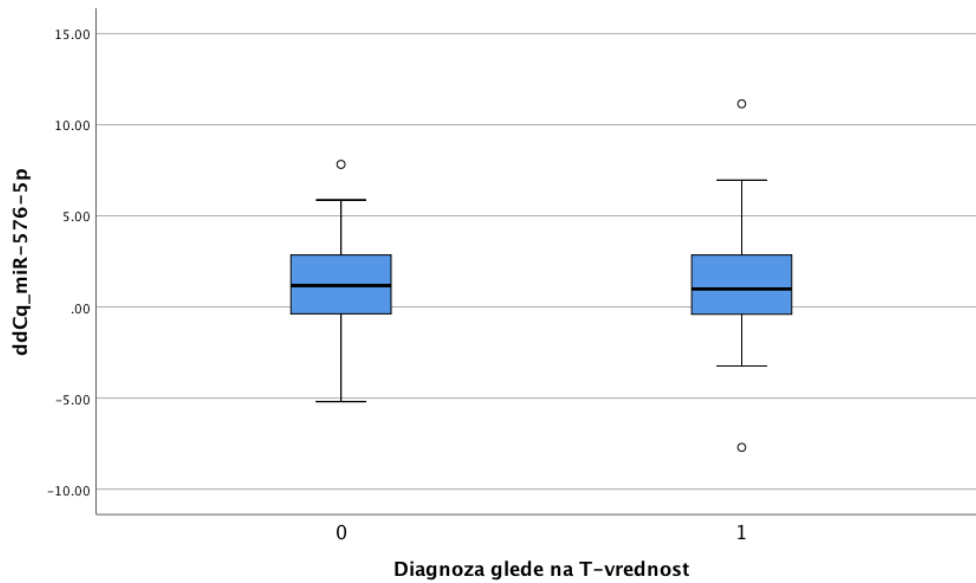


Grafikon 8: Razlika v plazemskem nivoju miR-21-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank z osteoporozo (1–desno).

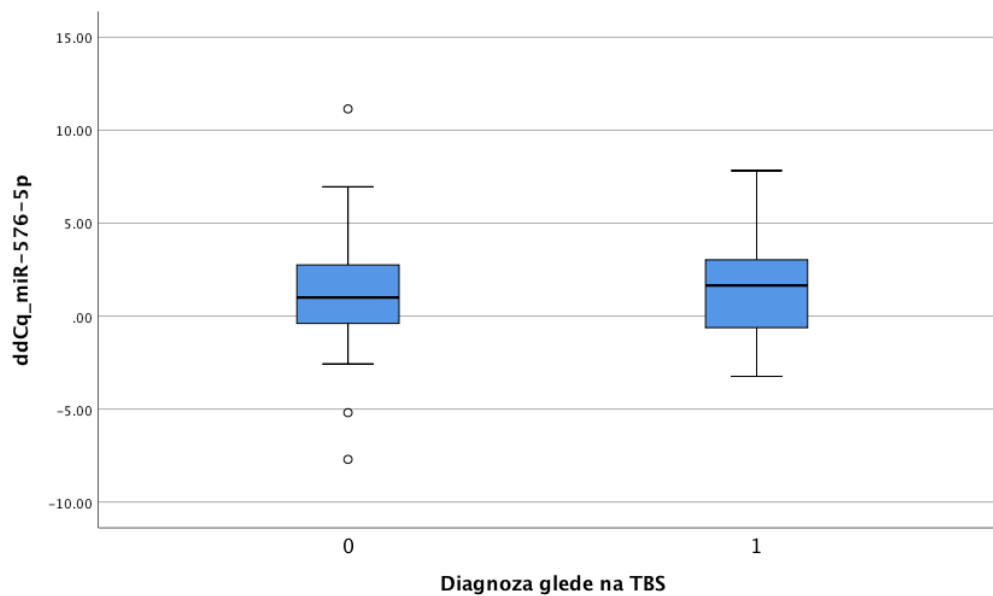


Grafikon 9: Razlika v plazemskem nivoju miR-21-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva (1–desno).

miR-576-5p

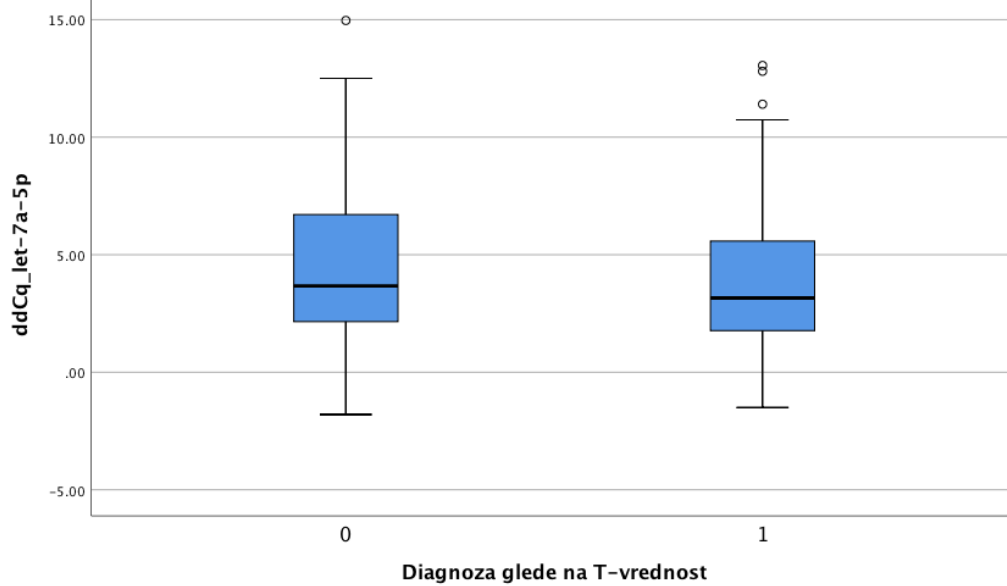


Grafikon 10: Razlika v plazemskem nivoju miR-576-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank z osteoporozo (1–desno).

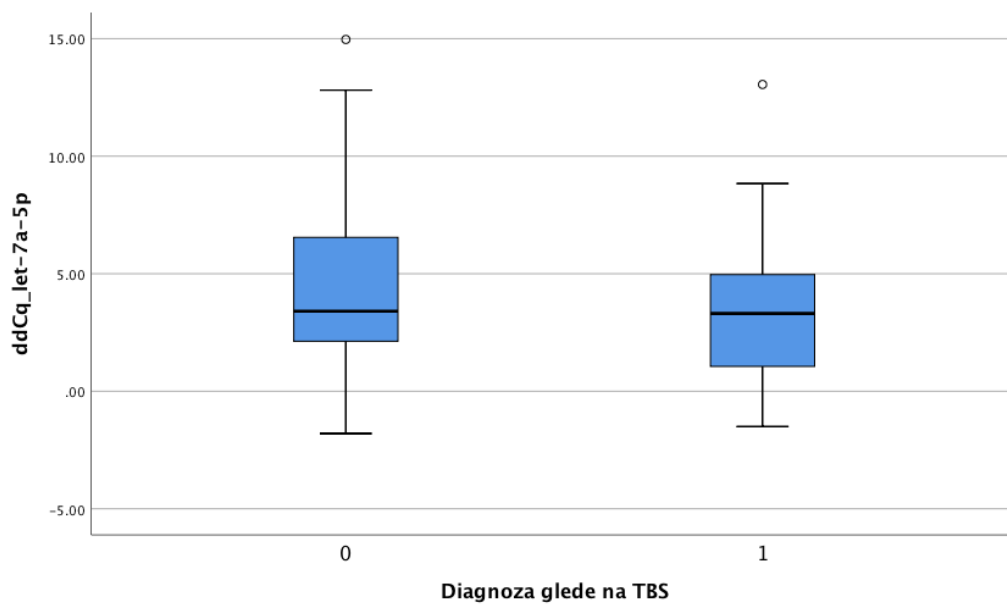


Grafikon 11: Razlika v plazemskem nivoju miR-576-5p med skupino zdravih preiskovank (0–levo) in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva (1–desno).

let-7a-5p



Grafikon 12: Razlika v plazemskem nivoju let-7a-5p med skupino zdravih preiskovank (0– levo) in skupino preiskovank z osteoporozo (1–desno).



Grafikon 13: Razlika v plazemskem nivoju let-7a-5p med skupino zdravih preiskovank (0– levo) in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva (1–desno).

Preglednica 12: Razlike v plazemskih nivojih miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p med skupino zdravih preiskovank in skupino preiskovank z osteoporozo ter razlike v nivojih istih miRNA med skupino zdravih preiskovank in preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva.

	Diagnoza glede na T-vrednost			Diagnoza glede na TBS		
	Zdravi	Bolni	p	Zdravi	Bolni	p
miR-21-5p	3,16 ± 2,72 (N=91)	2,68 ± 2,28 (N=63)	0,252	3,07 ± 2,55 (N=128)	2,42 ± 2,55 (N=26)	0,239
miR-576-5p	1,29 ± 2,21 (N=91)	1,34 ± 2,71 (N=63)	0,898	1,26 ± 2,40 (N=128)	1,60 ± 2,54 (N=26)	0,511
let-7a-5p	4,44 ± 3,16 (N=91)	4,11 ± 3,38 (N=63)	0,538	4,42 ± 3,25 (N=128)	3,71 ± 3,26 (N=26)	0,310

Legenda: N – število preiskovank, p – statistična vrednost analize

5.0 RAZPRAVA

V klinični praksi se za postavitev diagnoze in oceno tveganja za nastanek osteoporoznih zlomov uporabljajo predvsem merjenje MKG z DXA in ocena FRAX. Ker imata obe metodi pomanjkljivosti, lahko za oceno napredovanja bolezni in spremljanje zdravljenja v krvi merimo tudi označevalce kostne remodelacije, vendar je njihova uporaba zaradi pomanjkanja mednarodnih referenčnih standardov v klinični praksi omejena. Zato se je pojavila potreba po novih bioloških označevalcih, ki bi lahko sami ali v kombinaciji z drugimi metodami zagotovili boljše razumevanje stanja kosti pacientov. To možnost predstavljajo izvencelične miRNA. Ker je področje uporabe izvenceličnih miRNA še v povojih, ostajajo številne pred-, intra- in poanalitične težave. (32) Zato smo razvili metodo za merjenje koncentracij miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p v plazmi pomenopavnih žensk.

5.1 ANALIZA PREISKOVANK

Pomenopavzne ženske zaradi pomanjkanja estrogena predstavljajo najbolj ogroženo populacijo za nastanek osteoporoze. Upad koncentracije estrogena poveča kostno resorpcijo zaradi povečane aktivnosti in nastajanja osteoklastov ter njihove zmanjšanje apoptoze. (69, 70) V študijo smo vključili 200 pomenopavnih žensk, katerim smo odvzeli vzorce plazme, izmerili MKG in TBS ter analizirali njihove statistične podatke. Vse preiskovanke so izpolnile vprašalnik FRAX. Skupni vpliv poglavitnih dejavnikov tveganja za razvoj osteoporoze ovrednotimo s pomočjo računalniškega modela FRAX. Poleg nizke MKG so poglavitni dejavniki tveganja, ki so vključeni v vprašalnik, naslednji: spol, starost, predhodni zlomi pri preiskovankah in bližnjih sorodnikih, jemanje glukokortikoidov, kajenje, količina zaužitega alkohola, nizka telesna masa in višina ter prisotnost bolezni, ki vplivajo na kosti. Pri postavitvi diagnoze osteoporoze je potrebna tudi podrobna anamneza bolnikov. Med dejavnike tveganja za razvoj osteoporoze uvrščamo tudi kronične bolezni ledvic, ščitnice, jeter, srčno-žilne bolezni, nevrološke motnje in diabetes tipa I. (6, 69)

Razlog za izključitev preiskovank je bilo prejemanje hormonske nadomestne terapije, glukokortikoidov in zdravil za zdravljenje osteoporoze, prav tako pa smo izločili preiskovanke, ki imajo sistemske in druge presnovne bolezni, ki vplivajo na kosti. Izločili smo tudi hemolizirane in lipemične vzorce plazme. Tako smo izključili možnost vpliva

drugih bolezni na izražanje miRNA in zmanjšali možnost prisotnosti miRNA iz drugih virov (eritrocitov, trombocitov).

Preiskovanke smo glede na izračunane T-vrednosti in izmerjene vrednosti TBS razdelili v skupine. Preiskovanke z izračunanim $T \leq -2,5$ smo razvrstili v skupino preiskovank z osteoporozo, ostale pa v skupino zdravih preiskovank. Pričakovano ima skupina preiskovank z osteoporozo prav vse izmerjene vrednosti MKG signifikantno nižje ($p < 0,001$), saj je T-vrednost, ki smo jo izračunali na podlagi MKG, služila kot kriterij, da smo razvrstili preiskovanke v skupine. Glede na izmerjene vrednosti TBS smo ugotovili signifikantno razliko ($p = 0,008$) med kvaliteto kostnih trabekul zdravih preiskovank in osteoporoznih preiskovank. TBS predstavlja nov klinični parameter za opredelitev osteoporoze in oceno verjetnosti za osteoporozne zlome. Podobno kot MKG se vrednosti TBS s starostjo nižajo. Nizke vrednosti TBS ($\leq 1,2$) kažejo na porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva in povišano verjetnost za osteoporozne zlome. (71, 72)

Drugo delitev preiskovank smo opravili glede na vrednosti TBS. Preiskovanke z izmerjenim $TBS \leq 1,2$ smo razvrstili v skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kosti, ostale pa v skupino zdravih. Na podlagi t-testa neodvisnih spremenljivk smo ugotovili, da imajo preiskovanke s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva signifikantno nižje T-vrednosti: trohantera ($p = 0,040$), ledvene hrbtenice ($p = 0,035$), podlahtnice ($p = 0,006$) in distalne tretjine koželjnice ($p = 0,003$). Skupini se nista razlikovali v T-vrednostih: vratu stegenice ($p = 0,219$), intertrohantera ($p = 0,155$) in kolka ($p = 0,059$). Več študij je odkrilo šibko korelacijo med vrednostmi TBS in MKG ledvene hrbtenice ter MKG kolka. TBS se uporablja hkrati z MKG za boljšo oceno tveganja za osteoporozne zlome. TBS ni neposredna meritev kostne mikroarhitekture, ampak je povezana s karakteristikami kosti, kot so število, razmaknjenost in debelina kostnih trabekul. S TBS lahko razlikujemo kvaliteto v mikroarhitekturi kosti, kjer so meritve kostne gostote enake, vendar obstajajo razlike v karakteristiki in kvaliteti kostnih trabekul. Pomenopavzne ženske z nizkoenergetskimi zlomi, ki so imele enako MKG kot pomenopavzne ženske brez zlomov, so imele v primerjavi z slednjimi signifikantno nižje vrednosti TBS. (71, 72)

S t-testom neodvisnih vzorcev smo ugotovili signifikantno ($p = 0,004$) razliko v starosti preiskovank z osteoporozo v primerjavi z zdravimi preiskovankami. Tudi to je pričakovano, saj je starost eden izmed poglobitvinih dejavnikov tveganja za nastanek osteoporoze, kot tudi neodvisni klinični dejavnik za zlom. (6, 69) Poleg starosti se skupini razlikujeta tudi glede na leta mene ($p = 0,009$). Preiskovanke z osteoporozo imajo

signifikantno nižjo ($p < 0,001$) telesno maso, skupini pa se ne razlikujeta v telesni višini ($p = 0,98$). Posledično ima skupina preiskovank z osteoporozo nižji ITM ($p < 0,001$) v primerjavi z zdravimi. ITM je boljši napovednik tveganja za osteoporozo kot samo telesna masa, saj upošteva razlike v telesni višini med preiskovankami. Ženske z nizkim ITM imajo višje tveganje za nastanek osteoporoze v primerjavi z ženskami z normalno telesno maso. Telesna maščoba posredno varuje pred izgubo kostnine, saj se v njej androstendion pretvarja v estron. Pri ljudeh z manjšimi zalogami maščob je pretvorba zmanjšana, zato se posledično poveča kostna presnova, kar vodi v pospešeno izgubo kostne mase. Poleg tega težji posamezniki v zgodnji odrasli dobi dosežejo tudi višje vrednosti MKG. (73)

5.2 MERJENJE HEMOLIZE IN IZOLACIJA miRNA

Pred izolacijo smo s pomočjo Nanodropa ND-1000 v vseh vzorcih plazme merili stopnjo hemolize pri valovni dolžini 414 nm. Stopnja hemolize ima močan vpliv na profil izraženih izvenceličnih miRNA. Število zaznanih in izražanje nekaterih miRNA se z večjo stopnjo hemolize zvišuje. Ena izmed miRNA, ki kaže najbolj spremenjeno izražanje v plazmi zaradi hemolize, je prav miR-21, ki se že uporablja kot biomarker za številne bolezni. Kirschner in sodelavci so odkrili, da je izražanje miR-21 v hemoliziranih vzorcih plazme signifikantno povečano, izražanje let-7a pa ni bilo signifikantno spremenjeno v hemoliziranih vzorcih v primerjavi z nehemoliziranimi vzorci plazme. (74) Zaradi hemolize smo iz študije izključili 24 vzorcev, ki so imeli $A_{414} > 0,2$ in tako zmanjšali možnost prisotnosti in vpliv miRNA iz eritrocitov.

Izolacija miRNA iz plazme z optimiziranim postopkom izolacije je bila uspešna. Vrednosti koncentracij izoliranih miRNA, merjenih na Nanodropu pri valovni dolžini 260 nm, so bile pričakovane, vendar so koncentracije miRNA v vzorcih plazme prenizke, da bi lahko zanesljivo spektrofotometrično določili njihovo točno koncentracijo. Zaradi možnosti kontaminacije vzorca z miRNA iz drugih virov (eritrocitov, trombocitov, levkocitov) smo izločili izstopajoče visoke vrednosti koncentracij izoliranih miRNA. (75) S pomočjo razmerij A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230} smo ocenili čistoto izoliranih miRNA. Vrednosti so bile nižje od optimalnih vrednosti $A_{260}/A_{280} \sim 2$ in $A_{260}/A_{230} 1,8 - 2,2$ za čiste RNA. Nizke vrednosti lahko kažejo na zaostanek proteinov, fenola in drugih reagentov, uporabljenih tekom izolacije, ter glikogena, ki smo ga uporabili kot koprecipitant. Vrednosti so lahko nizke tudi zaradi zelo nizkih koncentracij izoliranih miRNA, pri čemer je posledično prispevek nečistot večji. (65, 76)

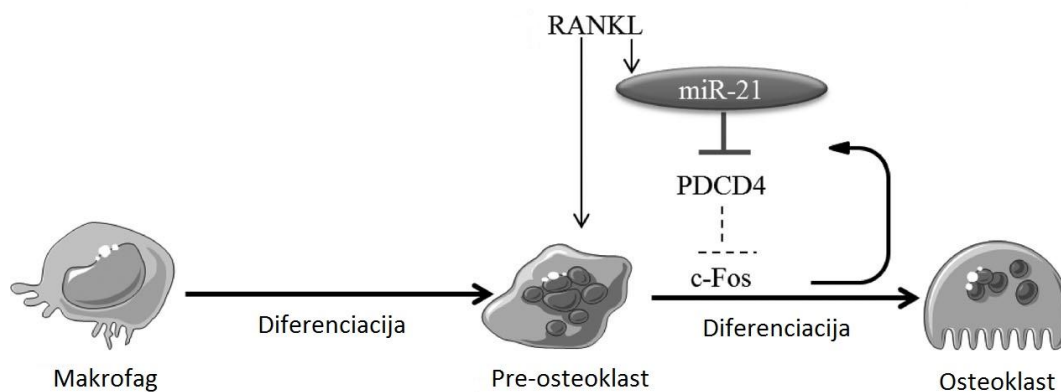
5.3 KVANTIFIKACIJA miR-21-5p, miR-576-5p IN let-7a V PLAZMI POMENOPAVZNIH ŽENSK

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času zaradi visoke občutljivosti še vedno predstavlja najpogosteje uporabljeno metodo za kvantifikacijo izvenseličnih miRNA. (60) Tako reverzna transkripcija kot RT-qPCR sta potekali uspešno. Povečano specifičnost in občutljivost metode ter zanesljivo kvantifikacijo nizkih koncentracij miRNA smo dosegli z uporabo univerzalne reverzne transkripcije in PCR reakcije z miRNA specifičnimi in optimiziranimi LNATM oligonukleotidnimi začetniki. Možnost nespecifičnih produktov smo izločili z analizo talilne krivulje. (67) Čeprav je večina raziskovalcev v študijah, s katerimi bomo primerjali rezultate, uporabila metodo RT-qPCR, pa še vedno obstajajo pomanjkljivosti in neenotnosti pri pogojih odvzema, obdelave in kontroli kvalitete vzorcev, izolaciji in kvantifikaciji miRNA ter normalizaciji rezultatov, poleg tega pa ne navedejo minimalnih zahtev in dovolj podrobnih informacij o izvedbi RT-qPCR. Zato je primerjava rezultatov med laboratoriji skorajda nemogoča in ni presenetljivo dejstvo, da različne študije za isto bolezen ne uspejo identificirati enakih izvenseličnih biomarkerskih miRNA. (77)

5.3.1 Plazemski nivo miR-21-5p, miR-21-5p in let-7a v preiskovanih skupinah

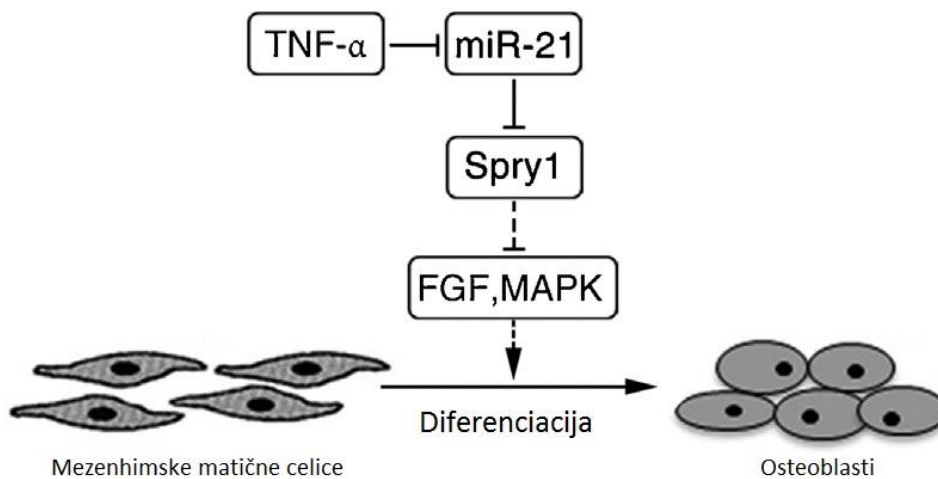
Zanimalo nas je ali obstaja signifikantna razlika v plazemskem nivoju miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a med skupinami preiskovank z osteoporozo in zdravimi preiskovankami, ki smo jih ločili glede na T-vrednosti, in skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva v primerjavi z zdravimi, ki smo jih ločili glede na vrednosti TBS. Ugotovili smo, da ni signifikantne razlike v plazemskih nivojih miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p med skupino osteoporoznih preiskovank in zdravimi, prav tako pa ni razlike v nivojih istih miRNA med skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva in skupino z normalno mikroarhitekturo kostnega tkiva (Preglednica 12). Vloga miR-21-5p v kostnem tkivu in osteoporozi je bila že obsežno preučevana (11, 35, 36, 46, 48), med tem ko študij, ki bi preučevale vlogo miR-576-5p in let-7a-5p v osteoporozi, nismo zasledili. Kot smo že opisali, ima miR-21-5p pomembno vlogo v osteoklastogenezi (Slika 2) in osteoblastogenezi (Slika 3), na njeno izražanje pa vpliva tudi estrogen. Zaradi tega smo pričakovali razlike v plazemskem nivoju te miRNA med skupinama. (11, 46) Čeprav med skupinama obstaja razlika v plazemskem nivoju miRNA, zaradi prevelike variabilnosti v populaciji ter majhnega števila preiskovank z osteoporozo (N=63) in s porušeno

mikroarhitekturo kostnega tkiva (N=26) oziroma nezadostnega števila preiskovank na splošno nismo ugotovili signifikantnih razlik v plazemskih nivojih. V ta namen bi bilo smiselno raziskavo izvesti na večjem številu vzorcev. Prav tako so se skupine signifikantno ločile glede na starost in ITM, ki sta poglavitna dejavnika za nastanek osteoporoze in imata vpliv na metabolizem kosti. (6) Razlog, da nismo ugotovili razlik v nivojih miRNA med skupinami, je lahko tudi dejstvo, da se s starostjo spreminja profil cirkulirajočih miRNA v krvi. Olivieri je s sodelavci dokazal, da je ena izmed miRNA z najbolj spremenjenim profilom med različnimi starostnimi skupinami miR-21-5p. Nivo miR-21-5p je koreliral tudi s C-reaktivnim proteinom in fibrinogenom, kar kaže, da ima ključno vlogo tudi v vnetju. (78) V nadaljnjih raziskavah bi morali biti bolj dosledni pri izbiri preiskovancev in kriterijih, po katerih smo jih razvrstili v skupine ter raziskavo, kot je bilo že omenjeno, izvesti na večjem številu vzorcev.



Slika 2: Vloga miR-21-5p v osteoklastogenezi. Prirejeno po (35).

Izražanje miR-21-5p se poveča med z RANKL inducirano osteoklastogenezo. miR-21-5p zavira izražanje PDCD4 ter tako zmanjša njegov zaviralni učinek na c-Fos, hkrati pa z RANKL inducirani c-Fos poveča izražanje miR-21-5p. c-Fos, PDCD4 in miR-21-5p ustvarijo pozitivno povratno zanko in spodbujajo osteoklastogenezo.



Slika 3: Vloga miR-21-5p v osteoblastogenezi. Prirejeno po (48).

Izražanje miR-21-5p zavira vnetni citokin TNF- α . MiR-21-5p zavira tudi izražanje gena Spry1, ki je negativni regulator FGF in MAPK signalnih poti, posledično pa se okrepi diferenciacija osteoblastov iz MSC.

Rezultate naše študije smo primerjali z dosedanjimi študijami, katerih cilj je bil odkriti različno izražene izvencelične miRNA pri osteoporozi.

Prvo takšno študijo so leta 2013 opravili Seeliger in sodelavci, ki so želeli odkriti različno izražene miRNA pri preiskovancih z osteoporoznim zlomom v primerjavi s preiskovanci z neosteoporoznim zlomom. Sprva so v skupini serumskih vzorcev preiskovancev z osteoporoznimi zlomi (N=10) in skupini serumskih vzorcev preiskovancev brez osteoporoznih zlomov (N=10) odkrili 83 miRNA, izmed katerih jih je med skupinama bilo 11 drugače izraženih. Validacijo so opravili na 30 serumskih vzorcih preiskovancev z osteoporozo in 30 serumskih vzorcih zdravih preiskovancev in potrdili spremenjene koncentracije 9 miRNA med skupinama. V kostnem tkivu so določili 6 različno izraženih miRNA, tako da je v serumu in kostnem tkivu hkrati 5 miRNA različno izraženih med skupinama (Preglednica 4). Med njimi je bila tudi miR-21-5p, ki je bila signifikantno bolj izražena pri preiskovancih z osteoporozo, kar se ne sklada z našimi rezultati. V kostnem tkivu osteoporoznih preiskovancev so zaznali tudi zavrto izražanje PDCD4 in posledično povečano izražanje c-Fos, ki sta regulirana z miR-21-5p. V serumu so zaznali let-7a, vendar niso uspeli dokazati razlike v koncentracijah med skupinama, kar pa se sklada z našimi rezultati. (35) Čeprav smo uporabili enak reagenčni komplet za izolacijo in enako metodo kvantifikacije miRNA, ima študija, ki jo je opravil Seeliger s sodelavci, v primerjavi z našo kar nekaj pomanjkljivosti. Največjo pomanjkljivost predstavlja majhen preučevan vzorec, poleg tega pa se preiskovanci niso ujemali v spolu, starosti in ITM. Iz

analize niso izločili hemoliziranih vzorcev. Kot smo že omenili, stopnja hemolize močno vpliva na izražanja nekaterih miRNA, med njimi tudi miR-21-5p. (74) Na koncentracijo izvenceličnih miRNA lahko vpliva tudi izbira vzorca. V našem primeru smo uporabili plazmo, medtem ko so v omenjeni študiji uporabili serumske vzorce. Wang in sodelavci so dokazali, da je koncentracija miRNA v vzorcih seruma višja kot v vzorcih plazme. Analiza je pokazala, da so v serumu prisotne tudi nekatere miRNA iz trombocitov, kar kaže na dejstvo, da proces koagulacije lahko spremeni profil izvenceličnih miRNA v krvi. (79)

Dve podobni študiji, ki sta prav tako iskali spremenjene koncentracije miRNA v serumu pacientov z osteoporoznimi zlomi, so leta 2015 opravili Panach in sodelavci (36) ter leta 2014 Weilner in sodelavci. (17) Prva raziskovalna skupina je v serumu preiskovank z osteoporoznimi zlomi (N=8) odkrila 12 miRNA s spremenjenim nivojem v primerjavi s kontrolno skupino preiskovank z osteoartritisom kolka (N=8). Kasnejša validacija na 12 kontrolnih in 15 vzorcih seruma preiskovank z osteoporozo je potrdila spremenjene koncentracije 3 miRNA (Preglednica 4) med skupinama, med katerimi je bila tudi miR-21-5p. Spremenjen serumski nivo miR-21-5p je bil neodvisen od razlike v starosti med skupinama, prav tako pa je miR-21-5p pozitivno korelirala z označevalcem kostne razgradnje CTx. Rezultati se skladajo z ugotovitvami raziskave, ki so jo opravili Seeliger in sodelavci, saj so odkrili enake miRNA s spremenjenimi koncentracijami v serumu pacientov z osteoporoznimi zlomi. (35, 36)

Zanimivo je dejstvo, da se rezultati obeh študij ne skladajo z ugotovitvami študije, ki so jo opravili Weilner s sodelavci. Ti so sprva odkrili spremenjene koncentracije 6 miRNA (Preglednica 4) med skupino serumskih kontrolnih vzorcev (N=7) in skupino serumskih vzorcev preiskovank z osteoporoznim zlomom (N=7). Kasneje so z validacijsko metodo na 11 kontrolnih vzorcih in 12 serumskih vzorcih pacientov z osteoporozo potrdili razlike v nivojih 3 miRNA. (17) miRNA s spremenjenimi izražanjem v serumu pacientov z osteoporozo, ki so jih odkrili v omenjeni študiji, se ne ujemajo z miRNA, ki so jih identificirali Seeliger in Panach s sodelavci. Polega tega so v nasprotju z njimi odkrili, da ni razlike v koncentraciji miR-21-5p, kar pa se sklada z našimi rezultati. (17, 35, 36) Čeprav smo v primerjavi z obema študijama uporabili različni vzorec, kar lahko, kot smo že omenili, vpliva na razliko v nivoju miRNA, smo za izolacijo, reverzno transkripcijo in kvantifikacijo uporabili enak reagenčni komplet kot Weilner in Panach s sodelavci. Obojni so tudi ustrezno izločili hemolizirane vzorce. Pomanjkljivost obeh študij je majhen preučevan vzorec in neujemanje preiskovank v starosti. Poglavitna pomanjkljivost študije,

ki jo je opravil Panach s sodelavci, je ta, da je kot kontrolo uporabil preiskovanke z osteoartritisom kolka. (17, 36) Osteoartritis je multifaktorska bolezen, ki prizadene sinovijske sklepe, subhondralno kost in ob sklepne mišice ter živce, spremlja pa jo vnetje. V nastanek in patogenezo osteoartritisa so vpletene tudi miRNA, zato to ni presenetljivo, da so pri preiskovancih z boleznijo zaznali spremenjen profil izraženih miRNA. (80) Osteoartritis in vnetje vplivata na profil izraženih cirkulirajočih miRNA, kar otežuje primerjavo med študijami, zato ni presenetljivo, da se rezultati tako naši kot med študijami razlikujejo.

Slabosti študij, ki so jih opravili Seeliger (35), Panach (36) in Weilner (17), je v študiji iz leta 2016 odpravil Kocijan s sodelavci, ki je želel odkriti spremenjen nivo cirkulirajočih miRNA med skupinami bolnikov z moško idiopatično osteoporozo, premenopavzno in pomenopavzno osteoporozo. Ta je na večjem številu vzorcev (36 pacientov z osteoporoznimi zlomi in 39 zdravih) ugotovil spremenjen nivo 19 miRNA (Preglednica 4) med skupinami, 8 izmed teh miRNA pa se je izkazalo za odlične diskriminatorje med skupinami. Skupine so se za razliko od prejšnjih študij ujemale v ITM, spolu in starosti. (39) Rezultati te študije se ne ujemajo z rezultati prej omenjenih študij, saj so odkrili spremenjene koncentracije različnih miRNA. (17, 35, 36, 39) Prav tako niso ugotovili razlik v koncentracijah miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p med skupinami, kar pa je v skladu z našimi rezultati. (39)

Največja razlika med našo in omenjenimi študijami je ta, da so primerjali preiskovance z nedavnimi osteoporoznimi zlomi z zdravimi preiskovanci z neosteoporoznimi zlomi ter so jih razvrstili v skupine glede na zlom in meritve MKG. Zlom, ne glede na to ali je posledica osteoporoze, osteoartroze ali pa mehanske obremenitve, vpliva na homeostazo kosti in sproži spremembe v molekularnih signalnih poteh, ki vplivajo na kostno presnovo. (43) V našem primeru smo preiskovanke razvrstili v skupine zgolj glede na meritve MKG in TBS. Čeprav so nekatere preiskovanke doživele predhodne nizkoenergetske zlome, ti niso bili nedavni.

V tem kontekstu sta študiji, ki so ju leta 2014 opravili Li in sodelavci (38) ter leta 2016 Yavropoulou (43) in sodelavci, z našo najbolj primerljivi. Prva raziskovalna skupina je v vzorcih plazme 120 pomenopavznih žensk, ki so jih glede na T-vrednosti kolka razdelili v 3 skupine (N=40) osteoporoznih, osteopeničnih in zdravih preiskovank, ugotovila spremenjen nivo 3 miRNA (Preglednica 4) med skupinami. Skupine so se signifikantno ločile samo glede na starost, za izolacijo in kvantifikacijo miRNA pa so uporabili enake

reagenčne komplete in metode kot mi. Nivo miR-21 je bil v skupini preiskovank z osteoporozo in osteopenijo signifikantno nižji v primerjavi z zdravimi, poleg tega pa je miR-21 korelirala z MKG. (38) Rezultati se ne skladajo z našimi, kot tudi ne z rezultati študij, ki so jih opravili Seeliger (35), Panach (36), Weilner (17) in Kocijan (39), se pa skladajo z najnovejšo študijo, ki jo je opravil Yavropoulou s sodelavci. (43) Ti so v serumu pacientov z nizkim MKG (N=70) odkrili 5 miRNA (Preglednica 4) s spremenjenimi koncentracijami v primerjavi s kontrolno skupino zdravih (N=30), izmed katerih je bila miR-21-5p signifikantno manj izražena pri preiskovancih z osteoporozo. Dodatna analiza subpopulacije je pokazala, da je nivo miR-21-5p signifikantno znižan pri skupini osteoporoznih žensk z vretenčnimi zlomi v primerjavi s skupino osteoporoznih žensk brez zlomov ter da ima 66% občutljivost in 77% specifičnost pri ločevanju žensk z zlomom vretenc. (43)

6.0 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo razvili metodo za merjenje nivoja miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p v plazmi pomenopavznih žensk. Zanimalo nas je ali se nivo teh miRNA v plazmi razlikuje med skupino preiskovank z osteoporozo oziroma skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva v primerjavi z zdravimi preiskovankami. Pri tem smo ugotovili:

- da se preiskovanke z osteoporozo signifikantno ločijo od zdravih preiskovank glede na starost, ITM in leta mene, medtem ko razlika v telesni višini ni statistično pomembna;
- da imajo preiskovanke s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva statistično pomembne nižje vrednosti MKG trohantera, ledvene hrbtenice, podlahtnice in distalne tretjine koželjnice, medtem ko ni signifikantne razlike v MKG vratu stegenice, intertrohantera in kolka;
- da se nivoji miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p v plazmi med skupino preiskovank z osteoporozo in skupino zdravih preiskovank signifikantno ne razlikujejo;
- da se nivoji miR-21-5p, miR-576-5p in let-7a-5p v plazmi med skupino preiskovank s porušeno mikroarhitekturo kostnega tkiva in skupino zdravih preiskovank signifikantno ne razlikujejo;
- da na področju uporabe miRNA kot bioloških kazalcev osteoporoze ostaja veliko težav, omejitev in neenotnosti, zato se rezultati, tako naši kot med primerljivimi študijami, razlikujejo.

Čeprav imamo na področju izvenceličnih miRNA obsežno znanje, je njihova uporaba v klinični praksi omejena. Tudi uporabe miR-21-5p, ki ima znano vlogo v kostnem tkivu, kot biološkega označevalca osteoporoze ne moremo potrditi. Prihodnje raziskave morajo preučiti fundamentalne intrinzične in ekstrinzične dejavnike, ki vplivajo na profil izraženih izvenceličnih miRNA, prav tako pa bi morali eksperimentalno potrditi teoretične mehanizme delovanja miRNA. Ponovljivost rezultatov lahko izboljšamo z razvojem boljših reagentov, implementacijo standardnih operacijskih postopkov za odvzem, shranjevanje in obdelavo vzorcev, izolacijo in kvantifikacijo miRNA ter poenotenjem normalizacije in validacije rezultatov.

7.0 LITERATURA

1. World Health Organization: Prevention and management of osteoporosis. WHO Technical Report Series 2003; 921: 1–192.
2. Preželj J, Kocjan T: Osteoporoza. V: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: Interna medicina, 4. izdaja, Littera picta, d.o.o., Ljubljana, 2011: 991–1001.
3. Cummings SR, Melton LJ: Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359: 1761–67.
4. Cooper C, Campion G, Melton LJ III: Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int* 1992; 2: 285–289.
5. Watts NB. Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Osteoporos Int* 2004; 15: 847–854.
6. Kocjan T, Preželj J, Pfeifer M, Jensterle Sever M, Čokolič M, Zavratnik A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze, *Zdrav Vestn* 2013; 82: 207–217.
7. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O et al; for the IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group: Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* 2011; 22: 391–420.
8. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farm Vestn* 2012; 63: 269–278.
9. Mencej Bedrač S, Zupan J, Kocjan T, Mlakar V, Preželj J, Marc J, Ostanek B: Zdravljenje osteoporoze danes in jutri. *Farm Vestn* 2012; 63: 279–289.
10. Mencej Bedrač S, Marc J: Sistem RANKL/RANK/OPG – nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze. *Farm Vestn* 2008; 59: 175–178.
11. Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B: Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52 (5): 589–608.
12. Tétreault N, De Guire V: miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin Biochem* 2013; 46 (10–11): 842–845.
13. Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniataki E, Mourelatos Z: The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem Sci* 2003; 28 (10): 534–540.
14. <http://www.mirbase.org> ; dostopno februar 2017
15. van Wijnen AJ, van de Peppel J, van Leeuwen JP et al: MicroRNA Functions in Osteogenesis and Dysfunctions in Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2013; 11(2): 72–82.

16. Li M, Muller–Marin C, Bharadwaj U et al: MicroRNAs: Control and Loss of Control in Human Physiology and Disease. *World J Surg* 2009; 33 (4): 667–684.
17. Weilner S, Skalicky S, Salzer B et al: Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* 2015; 79: 43–51.
18. Melo CA, Melo SA: Biogenesis and Physiology of MicroRNAs. V: Fabbri M: Non-coding RNAs and Cancer. Springer 2014: 5–24.
19. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S: Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; 11 (3): 228–234.
20. Bratkovič T, Glavan G, Štrukelj B, Živin M, Rogelj B: Exploiting microRNAs for cell engineering and therapy. *Biotechnol Adv* 2012; 30: 753–765.
21. Broadersen P, Voinnet O: Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10 (2): 141–148.
22. Iwakawa H, Tomari Y: The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol* 2015; 25 (11): 651–665.
23. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J: A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2009; 7 (4): 147–54.
24. Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L: The role of MicroRNAs in Osteoclasts and Osteoporosis. *RNA Biol* 2014; 11 (11): 1355–1363.
25. Li H, Xie H, Liu W et al: A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009; 119 (12): 3666–3677.
26. Lei SF, Papasian C, Deng HW: Polymorphisms in Predicted miRNA Binding Sites and Osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2011; 26 (1): 72–78.
27. Moore BT, Xiao P: MiRNAs in Bone Diseases. *Microna* 2013; 2 (1): 20–31.
28. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K: Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011; 717 (1–2): 85–90.
29. Taylor DD, Gercel-Taylor C: The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet* 2013; 4 (142): 7–18.
30. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky A.G, Burwinkel B: Circulating miRNAs: cell–cell communication function?. *Front Genet* 2013; 4 (119): 27–36.

31. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P et al: BM mesenchymal stromal cell–derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* 2013; 123 (4): 1542–1555.
32. Hackl M, Heilmeyer U, Weilner S, Grillari J: Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases – Complex signatures for multifactorial diseases?. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 432: 83–95.
33. Collino F, Deregibus MC, Bruno S et al: Microvesicles Derived from Adult Human Bone Marrow and Tissue Specific Mesenchymal Stem Cells Shuttle Selected Pattern of miRNAs. *PloS One* 2010; 5 (7): e11803.
34. Ekström K, Omar O, Granéli C et al: Monocyte Exosomes Stimulate the Osteogenic Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells. *PloS One* 2013; 8 (9): e75227.
35. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT et al: Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 2014; 29 (8): 1718–1728.
36. Panach L, Mifsut D, Tarin JJ, Cano A: Serum Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture. *Calcif Tissue Int* 2015; 97: 495–505.
37. Meng J, Zhang D, Pan N et al: Identification of miR-194-5p as a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PeerJ* 2015; 3:e971.
38. Li H, Wang Z, Fu Q, Zhang J: Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients. *Biomarkers* 2014; 19 (7): 553–556.
39. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E et al: Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101 (11): 4125–4134.
40. Heilmeyer U, Hackl M, Skalicky S et al: Serum microRNAs are indicative of skeletal fractures in postmenopausal women with and without type 2 diabetes and influence osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-tissue derived mesenchymal stem cells in vitro. *J Bone Miner Res* 2016; 31 (12): 2173–2192.
41. Chen J, Li K, Pang Q et al: Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis. *Scientific Reports* 2016; 6: 36347.
42. Bedene A, Mencej Bedrač S, Ješe L, Marc J, Vrtačnik P, Preželj J, Kocjan T, Kranjc T, Ostanek B: MiR-148a the epigenetic regulator of bone homeostasis is increased in plasma of osteoporotic postmenopausal women. *Wien Klin Wochenschr* 2016; 128 (7): 519–526.

43. Yavropoulou PM, Anastasilakis DA, Makras P et al: Expression of microRNAs that regulate bone turnover in the serum of postmenopausal women with low bone mass and vertebral fractures. *Eur J Endocrinol* 2017; 176 (2): 169–176.
44. Liu Z, Sall A, Yang D: MicroRNA: an Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool. *Int J Mol Sci* 2008; 9: 978–999.
45. Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H et al: miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature* 2014; 512 (7515): 431–435.
46. Ji X, Chen X, Yu X: MicroRNAs in Osteoclastogenesis and Function: Potential Therapeutic Targets for Osteoporosis. *Int J Mol Sci* 2016; 17 (3): 349.
47. <http://bmi.ana.med.uni-muenchen.de/miriad/miRNA/human/hsa-mir-21/>, dostopno: marec 2015
48. Yang N, Wang G, Hu C et al: Tumor Necrosis Factor α Suppresses the Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Promoter miR-21 in Estrogen Deficiency–Induced Osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2013; 28 (3): 559–73.
49. <http://bmi.ana.med.uni-muenchen.de/miriad/miRNA/human/hsa-mir-576/>, dostopno: marec 2015
50. Dong L, Li Y, Han C et al: miRNA microarray reveals specific expression in the peripheral blood of glioblastoma patients. *Int J Oncol* 2014; 45 (2): 746–756.
51. Li Z, Gu X, Fang Y et al: microRNA expression profiles in human colorectal cancers with brain metastases. *Oncol Lett* 2012; 3 (2): 346–350.
52. Gan X, Liu Z, Tong B, Zhou J: Epigenetic downregulated ITGBL1 promotes non-small cell lung cancer invasion through Wnt/PCP signaling. *Tumour Biol* 2016; 37 (2): 1663–1669.
53. Diaz-Prado S, Cicione C, Muiños-López E et al: Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 2012; 13: 144.
54. <http://bmi.ana.med.uni-muenchen.de/miriad/miRNA/human/hsa-let-7a-1/>, dostopno: marec 2017
55. Roush S, Slack J. F: The *let-7* family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 2008; 18 (10): 505–516.

56. Yu Y, Liao L, Shao B et al: Knockdown of MicroRNA Let-7a Improves the Functionality of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Immunotherapy. *Mol Ther* 2017; 25 (2): 480–493.
57. Iwasaki T, Tanaka K, Kawano M et al: Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells. *Int J Oncol* 2015; 46 (4): 1543–1550.
58. Wei J, Li H, Wang S et al: let-7 Enhances Osteogenesis and Bone Formation While Repressing Adipogenesis of Human Stromal/Mesenchymal Stem Cells by regulating HMGA2. *Stem Cells Dev* 2014; 23 (13): 1452–1463.
59. Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M et al: MicroRNA signature associated with osteogenic lineage commitment. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 7569–7581.
60. Niu Y, Zhang L, Qiu H et al: An improved method for detecting circulating microRNAs with S-Poly(T) Plus real-time PCR. *Scientific Reports* 2015; 5: 15100.
61. Moret I, Sánchez-Izquierdo D, Iborra M et al: Assessing an Improved Protocol for Plasma microRNA Extraction. *PloS One* 2013; 8 (12): e82753.
62. Page K, Guttery SD, Zahra N et al: Influence of Plasma Processing on Recovery and Analysis of Circulating Nucleic Acids. *PloS One* 2013; 8 (10): e77963.
63. miRNeasy Mini Handbook. Qiagen® 2013
64. Duy J, Koehler WJ, Honko NA, Minogue DT: Optimized microRNA purification from TRIzol-treated plasma. *BMC Genomics* 2015; 16: 95.
65. Desjardins P, Conklin D: NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J Vis Exp* 2010; 45: e2565.
66. Ostanek B: Različne verižne reakcije s polimerazo. V: Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012: 120–135.
67. miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR. Instruction manual v6.1, #203301, 20335. Exiqon 2015
68. Ostanek B: Verižna reakcija s polimerazo v realnem času. V: Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012: 136–147.
69. Kanis AJ, McCloskey VE: Risk factors in osteoporosis. *Maturitas* 1998; 30: 229–233.
70. Riggs BL: The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 2000; 106 (10): 1203–1204.

71. Silva CB, Leslie DW, Resch H et al: Trabecular Bone Score: A Noninvasive Analytical Method Based Upon the DXA Image. *J Bone Miner Res* 2014; 29 (3): 518–530.
72. Harvey NC, Glüer CC, Binkley N et al: Trabecular bone score (TBS) as a new complementary approach for osteoporosis evaluation in clinical practice. *Bone* 2015; 78: 216–224.
73. Asomaning K, Bertone-Johnson RE, Nasca CP et al: The Association between Body Mass Index and Osteoporosis in Patients Referred for a Bone Mineral Density Examination. *J Womens Health* 2006; 15 (9): 1028–1034.
74. Kirschner BM, Edelman BJJ, Kao C-H. S et al: The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Front Genet* 2013; 4 (94): 53–65.
75. Shaffer J, Schlumpberger M, Lader E: miRNA profiling from blood – challenges and recommendations. Qiagen® 2012
76. Assessment of Nucleic Acid Purity. T042-TECHNICAL BULLETIN; NanoDrop Spectrophotometers, Thermo Scientific
77. Kirschner BM, van Zandwijk N, Reid G: Cell-free microRNAs: potential biomarkers in need of standardized reporting. *Front Genet* 2013; 4 (56): 66–70.
78. Olivieri F, Spazzafumo L, Santini G et al: Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating marker of inflammaging. *Mech Ageing Dev* 2012; 133 (11–12): 675–685.
79. Wang K, Yuan Y, Cho J et al: Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma. *PloS One* 2012; 7(7): e41561.
80. Kopańska M, Szala D, Czech J et al: MiRNA expression in the cartilage of patients with osteoarthritis. *J Orthop Surg Res* 2017; 12 (1): 51.