

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA BRLOGAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA BRLOGAR

**POVEZANOST KONCENTRACIJ IZBRANIH MIKRO RNA V PLAZMI
POMENOPAVZNIH ŽENSK S KVALITETO TRABEKULARNE KOSTI**

**ASSOCIATION BETWEEN CONCENTRATIONS OF SELECTED PLASMA
MICRO RNAs WITH TRABECULAR BONE SCORE IN POSTMENOPAUSAL
WOMEN**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Tilna Kranjca, mag. farm. Raziskovalno delo je del študije, ki jo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko, številka odobritve 108/12/05.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, izr. prof. dr. Barbari Ostanek, mag. farm., in somentorju, asist. dr. Tilnu Kranjcu, mag. farm., za strokovno usmerjanje, sodelovanje in pomoč pri nastajanju magistrske naloge.

Velika zahvala gre moji družini, ki mi je omogočila študij, in fantu Aljažu, za spodbujanje, potrpežljivost in za ljubezen. Najlepša hvala tudi sošolcem, za vso pomoč in sodelovanje tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Barbare Ostanek, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Tilna Kranjca, mag. farm.

Ana Brlogar

VSEBINA

VSEBINA	I
KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
1 UVOD.....	1
1.1 Opredelitev in lastnosti nekodirajočih RNA	1
1.2 Biogeneza mikro RNA.....	2
1.3 Mehanizmi delovanja mikro RNA.....	3
1.4 Izvencelična mikro RNA	3
1.4.1 Izločanje mikro RNA iz celic	4
1.4.2 Prenašalci izvencelične mikro RNA in privzem v tarčne celice	4
1.5 Mikro RNA kot biološki označevalci	6
1.6 Kostna prenova	6
1.7 Osteoporoz	8
1.7.1 Definicija	8
1.7.2 Diagnostika osteoporoze.....	9
1.8 Vloga mikro RNA v osteoporozi	10
1.9 Potencialna vloga preiskovanih mikro RNA	13
1.9.1 hsa-let-7a-5p	13
1.9.2 hsa-miR-21-5p	13
1.9.3 hsa-miR-30d-5p	13
1.9.4 hsa-miR-93-5p	13
1.9.5 hsa-miR-125b-5p	13
1.9.6 hsa-miR-148a-3p	14
1.9.7 hsa-miR-590-5p	14
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 Opis preiskovancev	16
3.2 Prepis plazemskih mikro RNA v komplementarno DNA	16
3.3 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	17
3.4 Kvantifikacija izražanja izbranih mikro RNA	19

3.5	Analiza rezultatov	19
4	REZULTATI	21
4.1	Preučevana populacija	21
4.2	Normalizacija koncentracije izbranih mikro RNA	28
4.3	Razlika v izražanju izbranih mikro RNA med skupinama	28
5	RAZPRAVA.....	34
5.1	Preučevana populacija	34
5.2	Razlika v izražanju mikro RNA med skupinama	35
5.3	Potencialni mehanizem delovanja mikro RNA-21, mikro RNA-93 in mikro RNA-30d	37
6	SKLEP	40
7	LITERATURA	41
8	PRILOGE	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Potek biogeneze mikro RNA.....	2
Slika 2: Shematski prikaz poteka kostne prenove.....	8
Slika 3: Obratna transkripcija.	17
Slika 4: Potek reakcije qPCR.	18
Slika 5: Prikaz števila preiskovank z osteoporozo s preseki po posameznih skupinah.	22
Slika 6: Mehanizem signalne poti RANK/RANKL/OPG	37
Slika 7: Mehanizem signalne poti kostnega morfogenetskega proteina (BMP).....	38
Slika 8: Mehanizem signalne poti Wnt.....	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste kratkih nekodirajočih RNA molekul.....	1
Preglednica 2: Definicija osteoporoze po WHO kriterijih.....	9
Preglednica 3: Izbor člankov, kjer so preiskovali potencialno povezanost določenih vrst celičnih in izvenceličnih mikro RNA z osteoporozo, na podlagi ključnih besed <i>post-menopausal osteoporosis and miR; osteoporosis and miR expression</i> (MKG = mineralna kostna gostota).....	11
Preglednica 4: Sestava reakcijske zmesi za prepis plazemske miRNA v cDNA.....	17
Preglednica 5: Program za izvedbo prepisa plazemske miRNA v cDNA.....	17
Preglednica 6: Sestava reakcijske zmesi za qPCR.....	18
Preglednica 7: Program za izvedbo qPCR	18
Preglednica 8: Razdelitev preiskovank v skupino z osteoporozo in kontrolno skupino....	20
Preglednica 9: Število preiskovank v skupini z osteoporozo in kontrolni skupini glede na izbrane kriterije.....	21
Preglednica 10: Povprečne vrednosti parametrov v posamezni skupini.	22
Preglednica 11: Razlika v izražanju miRNA med skupinama.....	30
Preglednica 12: Povprečne vrednosti normaliziranih ciklov (Cq) v skupini z osteoporozo (OP) in kontrolni skupini, po posameznih kriterijih.....	30

POVZETEK

Molekule mikro RNA so skupina majhnih nekodirajočih molekul RNA, ki so dolge ~22 nukleotidov in nadzorujejo številne biološke procese. Koncentracija izvenceličnih mikro RNA v plazmi, serumu in drugih telesnih tekočinah se spreminja glede na fiziološko stanje organizma, njihova stabilnost pa nam omogoča, da jih lahko uporabljamo kot neinvazivne in visoko specifične biološke označevalce za različne bolezni, kot so bolezni srca in ožilja ter rakava obolenja. Raziskave v zadnjem času so potrdile, da se koncentracija določenih vrst mikro RNA razlikuje tudi pri bolnikih z osteoporozo, v primerjavi z zdravimi posamezniki. Osteoporoza je degenerativna bolezen skeleta, opredeljena z zmanjšanjem kostne mase in porušeno kostno mikroarhitekturo. Glavna klinična posledica bolezni so zlomi, ki predstavljajo velik zdravstveni problem tako za posameznika, kot tudi za javno zdravstvo. Trenutna diagnostika temelji na merjenju mineralne kostne gostote in predhodnih zlomih, ima pa kar nekaj pomanjkljivosti. Odkritje izvenceličnih mikro RNA, ki so vpletene v razvoj osteoporoze, bi predstavljalo novo, neinvazivno diagnostično orodje, zato smo v naši raziskavi žeeli ugotoviti, ali je izražanje izbranih vrst mikro RNA različno v skupini pomenopavznih žensk z osteoporozo in kontrolni skupini. V ta namen smo izmerili koncentracije hsa-let-7a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-576-5p in hsa-miR-590-5p v plazmi 142 pomenopavznih žensk. Izolirano mikro RNA smo prepisali v komplementarno DNA, ter izmerili njeno izražanje s pomočjo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Koncentracijo mikro RNA smo normalizirali. Na podlagi ocene kvalitete trabekularne kosti, mineralne kostne gostote in predhodnih zlomov smo posameznice razdelili v skupino z osteoporozo in kontrolno skupino. Ugotovili smo, da je izražanje hsa-miR-21-5p ($p=0.045$), hsa-miR-30d-5p ($p=0.019$) in hsa-miR-93-5p ($p=0.050$) zvišano v skupini z osteoporozo. Glede na literurne podatke, ki dokazujejo vpletjenost omenjenih mikro RNA v kostno prenovo, smo določili potencialne mehanizme delovanja in ugotovili, da hsa-miR-21-5p deluje na signalno pot RANK/RANKL/OPG, ki je vpletena v diferenciacijo osteoklastov, medtem ko sta hsa-miR-30d-5p in hsa-miR-93-5p vpleteni v diferenciacijo osteoblastov, in sicer preko mehanizma signalne poti kostnega morfogenetskega proteina in signalne poti Wnt/ β -catenin, kar dodatno kaže, da bi lahko služile kot potencialni biološki označevalci pomenopavzne osteoporoze.

Ključne besede: mikroRNA, osteoporoza, mineralna gostota kosti, osteoporozni zlomi, kvaliteta trabekularne kosti

ABSTRACT

Micro RNAs are a group of small non-coding RNA molecules, ~22 nucleotides long, controlling many biological processes. Concentration of cell-free micro RNAs in plasma, serum and other body fluids differ according to physiological state of the organism. Stability of cell-free micro RNAs enables their use as non-invasive and highly-specific biomarkers for different diseases, such as cardio-vascular diseases, cancer and tumours. Different studies recently confirmed that concentration of some micro RNAs differ in osteoporotic patients, compared to healthy controls. Osteoporosis is characterized by reduced bone mass and disruption of bone architecture, resulting in increased risks of fragility fractures which represent the main clinical consequence of the disease. Fragility fractures represent major healthcare problem for individuals, as well as public health system. Current diagnostics, such as bone mineral density and trabecular bone quality measurements, has many limitations. Discovery of cell-free micro RNAs, associated with development of osteoporosis, would represent new, accurate and non-invasive diagnostic tool and we wanted to find out whether concentration of selected micro RNAs differ in group of osteoporotic post-menopausal women compared to healthy controls. Therefore, we measured plasma concentrations of hsa-let-7a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-576-5p in hsa-miR-590-5p in 142 postmenopausal women. We transcribed isolated micro RNAs to complementary DNAs and measured their concentrations with real time quantitative polymerase chain reaction. Micro RNA concentrations were then normalized. We split the patients in two groups, group of osteoporotic patients and healthy controls, according to bone mineral density and trabecular bone quality measurements and previous fragility fractures. Our results show increased plasma concentrations of hsa-miR-21-5p ($p=0.045$), hsa-miR-30d-5p ($p=0.019$) and hsa-miR-93-5p ($p=0.050$) in group of osteoporotic patients. According to the literature data, showing possible involvement of the micro RNAs in bone remodelling, we predicted their potential mechanisms of action. Hsa-miR-21-5p could be involved in osteoclast differentiation via RANK/RANKL/OPG signalling pathway, whereas hsa-miR-30d-5p and hsa-miR-93-5p could be involved osteoblast differentiation via bone morphogenic protein and Wnt/ β -catenin signalling pathway. All the results furthermore prove, that these micro RNAs could be used as potential biological markers of post-menopausal osteoporosis. Key words: microRNA, osteoporosis, bone mineral density, osteoporotic fractures, trabecular bone quality

SEZNAM OKRAJŠAV

DNA	deoksiribonukleinska kislina
RNA	ribonukleinska kislina
miRNA	mikro RNA
cf-miRNA	izvencelične miRNA
RN-aze	encimi ribonukleaze
AGO	protein iz družine argonavtov
RISC	z RNA inducirani utiševalni kompleks
DXA	dvoenergijska rentgenska absorbcimetrija
FRAX	orodje za izračun ocene tveganja za osteoporoznim zlom (angl. <i>Fracture Risk Assessment Tool</i>)
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
Cq	kvantifikacijski cikel
ITM	indeks telesne mase
MKG	mineralna kostna gostota
TBS	kazalec kvalitete trabekularne kosti
RANK	receptor, ki aktivira jedrni dejavnik κB
RANKL	ligand receptorja RANK

1 UVOD

1.1 Opredelitev in lastnosti nekodirajočih RNA

Sporočilne molekule RNA (mRNA) so glavni posrednik pri prepisu genetske informacije iz DNA v proteine (1). Poleg mRNA molekul, ki prenašajo zapise za proteine, človeški genom nosi zapise tudi za nekodirajoče molekule RNA (ncRNA) različnih dolžin (2). NcRNA so heterogena skupina RNA molekul, ki jih glede na velikost delimo v skupino kratkih nekodirajočih RNA molekul (sncRNA) in dolgih nekodirajočih RNA molekul (lncRNA) (3–6).

Molekule lncRNA so dolge več kot 200 nukleotidov. Sodelujejo pri uravnavanju celičnih procesov kot so apoptoza, proliferacija in razvoj metastaz ter imajo pomembno vlogo v fizioloških procesih in razvoju bolezni (3,7). Molekule sncRNA so dolge 18-200 nukleotidov in so ključni dejavniki RNA interference ali procesa utišanja genov (3–6). Delimo jih v skupine, prikazane v preglednici 1.

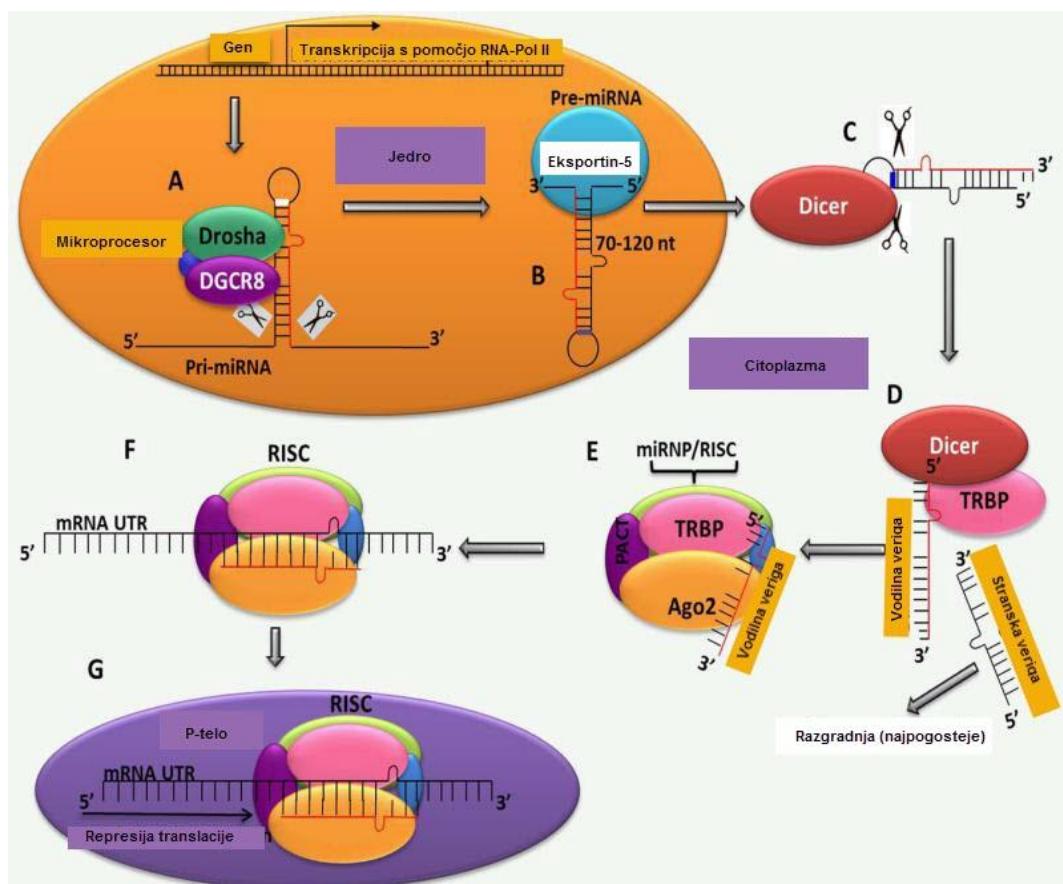
Preglednica 1: Vrste kratkih nekodirajočih RNA molekul. Povzeto po (3,8)

Skupina sncRNA	Opis
endo-siRNA	Endogene kratke interferenčne RNA
piRNA	Kratke, s Piwi povezane RNA
snoRNA	Kratke jedrne RNA
sd-RNA	RNA, ki izvirajo iz kratkih jedrnih RNA
tiRNA	RNA, ki lahko sprožijo transkripcijo
miRNA	Mikro RNA

Mikro RNA (miRNA) molekule so dolge ~22 nukleotidov in nadzorujejo številne biološke procese ter imajo zato ključno vlogo pri celičnem razvoju in homeostazi. Delujejo tako, da se vežejo na mRNA in povzročijo utišanje genov ter na ta način uravnavajo tvorbo proteinov. Razlika v izražanju miRNA molekul je povezana z razvojem različnih bolezni (9–11).

1.2 Biogeneza mikro RNA

Biogeneza miRNA se začne s prepisom gena za miRNA v celičnem jedru. Prepis gena lahko poteka v treh različnih delih genoma: intronski regiji, eksonski regiji ali intergenski regiji (12). Nastane več sto nukleotidov dolga primarna miRNA (pri-miRNA). Pod vplivom multiproteinskega kompleksa nastane ~70 do 120 nukleotidov dolga prekurzorska miRNA (pre-miRNA). Novo nastalo pre-miRNA prenašalec eksportin-5 prenese iz jedra v citoplazmo, kjer jo encim dicer (ribonukleaza-III) razreže v ~18 – 23 nukleotidov dolgo, zrelo miRNA, ki se nato loči v dve verigi – vodilno in stransko verigo. Vodilna miRNA veriga se vgradi v kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) (13). Vodilna miRNA veriga usmeri kompleks RISC na tarčno mRNA, kjer se miRNA veže na tarčno mRNA in utiša izražanje genov (14). Podrobnejši opis biogeneze je prikazan na sliki 1.



Slika 1: Potek biogeneze mikro RNA. (A) Gen za miRNA se prepiše z encimom RNA polimeraza II (RNA-Pol II) in tako nastane primarna miRNA (pri-miRNA), ki jo mikroprocesor, sestavljen iz encima drosha in proteina DGCR8 razreže v prekurzorsko miRNA (pre-miRNA). Ta se veže na prenašalec eksportin-5, ki jo iz jedra prenese v citoplazmo. (C) V citoplazmi se pre-miRNA veže na encim dicer, ki jo razreže na ~18 – 23 nukleotidov dolgo, zrelo miRNA. (D) Celični protein imenovan TRBP (ang. *Transactivation response RNA binding protein*) olajša vezavo encima dicer in vodilne

verige miRNA v kompleks RISC, ki vsebuje še protein Argonaut 2 (Ago2), aktivator RNA protein kinaze (PACT), TNRC6A in druge RNA vezajoče proteine (E). Po vezavi vodilne verige miRNA v kompleks RISC se stranska veriga razgradi, vodilna veriga pa usmeri RISC kompleks na tarčno mRNA, kjer se miRNA s sekvenčno-specifičnim baznim parjenjem običajno poveže s 3' neprevedeno regijo (3'UTR angl. *three prime untranslated region*) mRNA in utiša izražanje genov (F). Povzeto po (14).

1.3 Mehanizmi delovanja mikro RNA

MiRNA uravnava izražanje genov preko različnih mehanizmov (15):

- razgradnja mRNA,
- represija translacije mRNA,
- aktivacija translacije mRNA.

Za vezavo miRNA na mRNA je dovolj ujemanje v 7 ali 8 baznih parih. Več kot je komplementarnih baznih parov med miRNA in mRNA, boljša je vezava, jakost vezave pa določa po katerem mehanizmu bo potekalo utišanje genov (16). Vezavno mesto na miRNA predstavlja začetna sekvenca 2-8 nukleotidov na 5'-koncu (ang. *seed*). Začetna sekvenca se običajno veže na 3'UTR vezavno mesto mRNA. Popolna komplementarnost baznih parov povzroči razgradnjo mRNA, medtem ko delna komplementarnost vodi v represijo translacije. Zadnje raziskave so pokazale, da se začetna sekvenca lahko veže tudi na 5'UTR ali kodirajočo regijo mRNA, vezava na ta mesta pa lahko vodi v aktivacijo translacije (17,18).

Razpad mRNA poteka v citoplazemskih telesih imenovanih p-telesa. Ta vsebujejo frakcije AGO proteinov in so mesta shranjevanja in katabolizma RNA (19–21). Vsebujejo visoke koncentracije proteinov, ki povzročijo odstranjevanje metilirane kape na 5'-koncu mRNA (DCP1/2) ali deadenilacijo (GW182) in posledično razpad mRNA (12,22).

1.4 Izvencelična mikro RNA

Molekule miRNA se nahajajo v celicah in izven njih. Izvencelično miRNA (cf-miRNA) lahko izolirano iz različnih telesnih tekočin. Njihova prisotnost v plazmi in serumu je mogoča zaradi njihove odpornosti proti RN-azam v krvi. Cf-miRNA najdemo v membranskih veziklih (mikrovezikli, eksosomi in apoptočna telesa), lipoproteinih z visoko gostoto (HDL) ali v kompleksih z RNA-vezajočimi proteini (večinoma AGO proteini, ki sestavljajo RISC-kompleks). Ti jih ščitijo pred delovanjem RNaz (23,24). Cf-miRNA je lahko odpadni material ali pa ima biološko vlogo v organizmu. Poznamo dva mehanizma delovanja cf-miRNA. Delujejo lahko na konvencionalni način, s katerim negativno uravnava izražanje genov v tarčnih celicah, ali pa delujejo kot ligandi, ki se

vežejo na receptorje TLR (ang. *toll-like receptors*) in aktivirajo imunske celice (25). Profil cf-miRNA v plazmi, serumu in drugih telesnih tekočinah se spreminja v odvisnosti od fiziološkega (telesna aktivnost, nosečnost) (26) in patofiziološkega (rakava obolenja, avtoimune in virusne bolezni) stanja organizma (27–30). Njihova stabilnost v krvnem obtoku kaže velik potencial, da bi jih v prihodnosti lahko uporabljali kot neinvazivne in visoko specifične biološke označevalce (31).

1.4.1 Izločanje mikro RNA iz celic

MiRNA delujejo v celicah, v katerih se sintetizirajo ali pa se iz njih izločajo in delujejo na ostale celice ter tako predstavljajo način za medcelično komunikacijo. Izločanje miRNA iz donorskih celic lahko poteka s pasivno difuzijo ali aktivnim transportom (32). Medcelična komunikacija je sestavljena iz treh procesov: Najprej se morajo miRNA selektivno izločiti iz donorskih celic in se vključiti v primerne prenašalce. Nato se morajo zaščititi pred izvenceličnimi RN-aznimi encimi in priti do tarčnih celic. Pomembno je, da pri tem ohranijo sposobnost za prepoznavo in utišanje mRNA molekul znotraj tarčnih celic. Na kakšen način celice selektivno izločijo miRNA še ni znano, vendar je dokazano, da je proces lahko selektiven in reguliran. Glede na profil miRNA v izvenceličnih veziklih in lipoproteinih v serumu in plazmi ne moremo sklepati na vrsto donorskih celic, iz katerih miRNA izhajajo. Različne vrste telesnih tekočin vsebujejo različne vrste miRNA. Te ugotovitve podpirajo hipotezo o selektivnem izločanju specifičnih miRNA iz celic pod vplivom celičnih signalov ali okoljskih dražljajev. Nekateri izvencelični vezikli, ki jih izločajo tumorske celice vsebujejo miRNA, ki jih v donorskih celicah ne najdemo, kar pomeni, da se določene vrste miRNA prepišejo izključno z namenom, da jih celica izloči (33,34).

1.4.2 Prenašalci izvencelične mikro RNA in privzem v tarčne celice

Kompleksi z miRNA vezavnimi proteini

V več študijah so ugotovili, da se večina cf-miRNA ne prenaša z mikrovezikli, pač pa ji njeni odpornost na RN-aze v plazmi omogoča vključevanje v proteinske komplekse. Dokazali so, da je najpomembnejši protein, ki je odgovoren za prenos 60 % ali celo več cf-miRNA, protein AGO2, ki je tudi del kompleksa RISC. Izvencelični kompleksi AGO2-miRNA nakazujejo na možnost, da celice RISC kompleks sproščajo tudi v krvni obtok (31,35,36).

Membranski vezikli (MV)

MV so sestavljeni iz fosfolipidnega dvosloja in hidrofilnega jedra. Delimo jih v tri skupine: mikrovezikle, eksosome in apoptotska telesa.

Vključevanje miRNA v MV poteka na štiri načine:

- z encimom nevtralna sfingomielinaza 2 (nSMaza2), ki je najpomembnejši encim pri pretvorbi sfingomielina v ceramid ter ključni regulator biogeneze eksosomov in njihovega izločanja. Zaviranje nSMaze2 je povzročilo manjše vključevanje miRNA v eksosome in povečano vključevanje miR-223 v komplekse s HDL (33).
- s proteini hnRNP. HnRNP protein prepozna zaporedje GGAG na 3'-koncu miRNA in usmeri specifično miRNA v ustrezni eksosom.
- s sekvenco 3'-konca miRNA. MiRNA, ki imajo na 3'-koncu več poli-U kot poli-A se hitreje vežejo v eksosome.
- s kompleksom RISC, ki vsebuje multivezikularna telesa, ki so mesta biogeneze eksosomov (37–39).

Lipoproteinske strukture

Lipoproteini so sestavljeni le iz enega lipidnega zunanjega sloja in notranjega hidrofilnega jedra (33). Dokazano je, da HDL deluje kot prenašalec endogenih miRNA do tarčnih celic. V nasprotju z izločanjem miRNA prek eksosomov, nSMaza2 in verjetno tudi ceramidna pot povzročajo represijo celičnega izločanja miRNA v HDL, kar pomeni, da pot izločanja specifičnih miRNA prek HDL poteka po drugačnih in celo nasprotnih mehanizmih kot izločanje prek eksosomov (40).

Način in specifičnost privzema cf-miRNA v tarčne celice vpliva na njihovo funkcionalno vlogo. Način privzema miRNA, ki se prenašajo preko mikroveziklov, je najverjetneje endocitoza, fagocitoza ali neposredno zlitje membrane s plazemsko membrano tarčnih celic. MiRNA, ki so vezane na proteine, se vežejo na specifične receptorje na površini celice, kot je receptor SR-BI (ang. *Scavenger receptor class B type I*). Specifičnost privzema omogočajo prepoznavne molekule celic na površini MV ali receptorji na tarčnih celicah. Hkrati lahko poteka privzem več različnih miRNA v eno tarčno celico, kar vodi v sočasno reguliranje več tarčnih genov (40).

1.5 Mikro RNA kot biološki označevalci

Molekule miRNA izkazujejo velik potencial kot biološki označevalci v diagnostiki bolezenskih stanj (18). Diagnostika z uporabo miRNA bi bila cenejša in bolj natančna od uporabe trenutnih označevalcev, kot sta beta C-terminalni telopeptid (beta-CTX) ter prokolagen tipa I N-propeptid (P1NP). Za raziskovalne namene trenutno zaradi lažje izolacije določamo celokupno miRNA. Izločanje miRNA, ki so vezane v eksosome in HDL je bolj specifično, vendar je izolacija tovrstnih miRNA težja. Ugotovili so, da maligni tumorji izločajo MV s specifičnimi seti miRNA (28,41,42). Z identifikacijo teh setov lahko ugotovijo za katero vrsto in stadij raka gre (42,43). V primeru z zdravili povzročene lezije na jetrih (npr. previsok odmerek paracetamola), se izloča za jetra specifična miR-122 v kompleksih z AGO2 proteini, medtem ko se pri lezijah nastalih zaradi alkohola, miR-122 izločajo predvsem vezane v eksosome (44). V večini primerov identifikacija le ene miRNA ni dovolj za natančno diagnostiko, pač pa je potrebno določiti več vrst miRNA (27). Trenutne raziskave potekajo v smeri razvoja univerzalnega seta cf-miRNA, s pomočjo katerega bi lahko diagnosticirali širši spekter bolezni (45,46). V primeru da za vsako bolezen identificiramo po en označevalc, bi bilo za natančno določitev bolezni potrebno identificirati veliko število označevalcev, kar pa je drago in dolgotrajno. Tudi če z univerzalnim setom cf-miRNA ne bi točno določili bolezni, ampak le organ, ki je podvržen patofiziološkim procesom, bi to prihranilo veliko denarja in časa ter omogočilo bolj specifično diagnostiko (45).

1.6 Kostna prenova

Kostna prenova je glavni proces, ki poteka v odrasli dobi, ko je kostni skelet že popolnoma razvit. Zahteva usklajeno delovanje osteoblastov in osteoklastov. V komunikacijo med celicami so vpleteni T-limfociti, B-limfociti, megakariociti, makrofagi, številni citokini in rastni dejavniki (47). Proces poteka več mesecev, prek osteoklastov, ki so odgovorni za kostno resorpcijo, in osteoblastov, ki so odgovorni za tvorbo kosti. Grozdi osteoklastov in osteoblastov so urejeni v začasne strukture, imenovane »osnovne večcelične enote« (BMU oz. ang. *basic multicellular units*). Te predstavljajo prostor za kostno prenovo in ustvarjajo mikrookolje, ki olajša resorpcijo osteoklastov in tvorbo kostnine (48). Na ta način ohranjajo kostni volumen med fiziološko prenovo. Aktivno BMU v prvi vrsti sestavljajo osteoklasti. Za njimi se nahajajo mononuklearne celice, katerih fenotip še ni poznan. Njihova naloga je, da pokrivajo na novo odkrito površino kosti in jo pripravijo na

zapolnитеv z novo kostnino. Osteoblasti se nahajajo na repu BMU, kjer izločajo in odlagajo nemineralizirani kostni matriks - osteoid ter vodijo nastajanje in mineralizacijo v zrelo lamelarno kost. Taka postavitev celic v BMU je ključnega pomena za kostno prenovo, saj omogoča koordinacijo in usklajeno delovanje vseh procesov prenove: aktivacije, resorpcije, preobrata, tvorbe kostnega matriksa in zaključne faze (47). Potek procesov je shematsko prikazan na sliki 2.

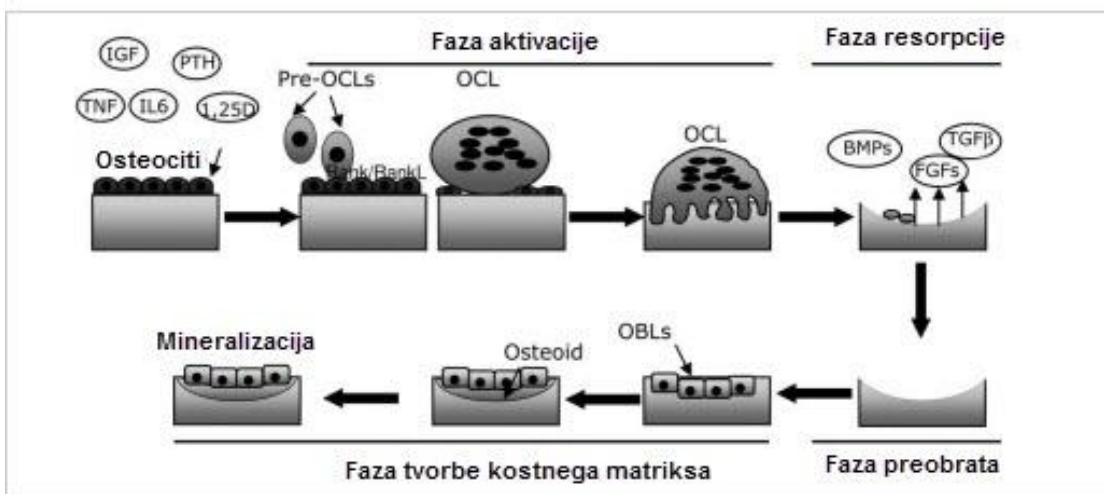
Aktivacija - Osteociti prepoznaajo sprožilni signal za prenovo, ki se lahko pojavi v obliki neposrednega mehanskega delovanja na kost (poškodbe), ali v obliki hormonskega delovanja (estrogenov ali paratiroidnega hormona (PTH)) na kostne celice. Vsakodnevna aktivnost povzroča mikro poškodbe skeleta. Osteociti zaznavajo spremembe fizičnih sil, ki delujejo na okostje in jih pretvorijo v signale, ki sprožijo kostno prenovo (49). Poškodbe kostnega matriksa (50) ali zlomi okončin sprožijo apoptozo osteocitov in pospešeno osteoklastogenezo (51). V tej fazi se osteoblasti na aktivnih mestih v kostnini umaknejo in razgalijo površino kosti, kjer bo potekala kostna prenova.

Resorpcija – Osteoblasti se odzovejo na signale, ki jih sprožijo osteociti ali na neposredno endokrino aktivacijo signalov ter usmerijo osteoklaste na območje prenove s pomočjo proizvajanja različnih kemotaktičnih snovi, kot so MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*), M-CSF (»*macrophage colony-stimulating factor*«) in ligand receptorja RANK (RANKL) (52). Na mestih kjer osteoklasti razgrajujo kostnino, nastajajo erozijske Howshipove lakune (53).

Preobrat – Mononuklearne celice odstranijo ostanke kolagena iz erozijskih lakun in pripravijo površino kosti na obnovo z osteoblasti. Izločajo kemotaktične snovi, ki privabljajo osteoblaste ter proizvajajo kolagenski matriks, ki tvori cementno plast (54).

Tvorba kostnega matriksa – Mezenhimske matične celice in osteoblastne progenitorne celice se vrnejo v lakuno, kjer se diferencirajo in izločajo molekule za zadnjo fazo tvorbe kosti (55). Najpomembnejša organska komponenta kosti je kolagen tipa 1. Ostale organske komponente predstavljajo nekolagenski proteini (proteoglikani, glikozilirani proteini kot je tkivno nespecifična alkalna fosfataza, matriksni Gla proteini, osteokalcin) in lipidi (56). Sledi mineralizacija, pri kateri se hidroksiapatit veže v novo nastali osteoid (57).

Zaključna faza – Ko se izgradi enaka količina kosti kot se je razgradila, je krog kostne prenove zaključen. Terminacijski signali, ki ustavijo prenovo so še nepoznani. Po zaključku mineralizacije se zreli osteoblasti razgradijo, vgradijo v mineraliziran matriks ali se diferencirajo v mirujoče osteocite (47).



Slika 2: Shematski prikaz poteka kostne prenove. Kostna prenova se začne z aktivacijo osteocitov, ki jo sprožijo različni dejavniki. Poveča se izražanje liganda receptorja RANK (RANKL) na površini celic. RANKL se veže na receptor, ki aktivira jedrni dejavnik (RANK), kar sproži diferenciacijo OC (Faza aktivacije). OC sprožijo resorpcijo kosti (Faza resorpcije), pri tem pa se sproščajo dejavniki, ki so običajno shranjeni v kostnem matriksu (BMPs, TGF β , FGFs). Ti dejavniki usmerijo OB na mesto, kjer je potekala razgradnja kosti. OB začnejo proizvajati nov kostni matriks in mineralizacijo matriksa (Faza tvorbe kostnega matriksa). Ko je kostni matriks izgrajen, se površina kosti vrne v mirujoče stanje in krog kostne prenove je zaključen. Povzeto po (58).

1.7 Osteoporoz

1.7.1 Definicija

Osteoporoz je degenerativna bolezen kosti, pri kateri je prizadeta tako kvantiteta (zmanjšanje kostne mase) kot tudi kvaliteta kosti (mikroarhitekturne spremembe). Kosti so posledično krhke, glavna klinična posledica bolezni pa so zlomi. Leta 2010 je bilo v Evropi (EU) z osteoporozo diagnosticiranih 22 milijonov žensk in 5,5 milijona moških. Incidenca zlomov je 3,5 milijona. V Sloveniji so zadnjo epidemiološko študijo opravili leta 2010. Vanjo je bilo vključenih 343 000 moških in 416 000 žensk starejših od 50 let. Po kriterijih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, ang. *World Healthcare Organisation*) so avtorji diagnosticirali 110 000 bolnikov z osteoporozo. Incidenca zlomov je bila ocenjena na 15500, od tega se je 64 % zlomov pojavljalo pri ženskah. Incidenca smrti na 100 000 posameznikov v prvem letu po zlomu je ocenjena na 192, od tega je 54 % smrti pri ženskah (59). Po kriterijih WHO je osteoporoz definirana na podlagi izmerjene mineralne kostne gostote (MKG), kot je opisano v preglednici 2. T vrednost predstavlja razliko med

izmerjeno MKG in pričakovano MKG zdrave odrasle osebe, deljeno s standardno deviacijo (SD) populacije zdravih odraslih oseb (60).

Preglednica 2: Definicija osteoporoze po WHO kriterijih. (60)

Opredelitev	MKG
normalno stanje	$T \geq 1 \text{ SD}$
nizka kostna masa	$-2,5 < T < 1 \text{ SD}$
osteoporoza	$T \leq -2,5 \text{ SD}$
huda osteoporoza	$T \leq -2,5 \text{ SD} + \text{zlom}$

1.7.2 Diagnostika osteoporoze

Diagnoza osteoporoze je na podlagi trenutnih smernic postavljena na podlagi izmerjene MKG z uporabo dvojne rentgenske absorpcimetrije (DXA) ali na podlagi prisotnosti predhodnih osteoporotičnih zlomov. Potrebno je tudi predhodno laboratorijsko testiranje za izključitev sekundarne osteoporoze (61,62).

Merjenje MKG z uporabo DXA

Na podlagi suma na osteoporozo ob prisotnosti dejavnikov tveganja je za potrditev diagnoze osteoporoze potrebno izmeriti MKG z metodo DXA. Uporabljam jo za ugotavljanje ali potrjevanje diagnoze osteoporoze, predvidevanje tveganja za zlome in spremeljanje stanja bolnikov (61–63).

Prisotnost predhodnih zlomov

V primeru prisotnosti predhodnih zlomov, kot so vretenčni zlom, zlom kolka in drugi nevretenčni zlomi (npr. zlom zapestja), je za potrditev diagnoze osteoporoze potrebno le še izključiti sekundarno osteoporozo, medtem ko je meritev MKG neobvezna.

Laboratorijsko testiranje

Pred potrditvijo diagnoze osteoporoze je obvezno laboratorijsko testiranje za izključitev sekundarne osteoporoze. Preverja se krvna slika in meri koncentracija kalcija, fosfatov, alkalne fosfataze, kreatinina, proteinogram, aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT) in tirotropina (TSH) v serumu oz. krvi, in pri moških dodatno še celokupni testosteron (61).

FRAX (ang. Fracture Risk Assessment Tool)

FRAX je orodje, ki se je v zadnjem času uveljavilo za izračun tveganja za osteoporotične zlome. Orodje poleg MKG vključuje tudi druge spremenljivke, npr. predhodne zlome, družinsko anamnezo zlomov, življenjski slog (kajenje, dolgotrajno uživanje alkohola), kronično uporabo zdravil kot so glukokortikoidi, sočasno obolenost za revmatoidnim artritisom ter druge vzroke, ki lahko povzročijo sekundarno osteoporozo. Z orodjem FRAX lahko izračunamo verjetnost, da bo pacient v 10 letih doživel osteoporotični zlom (64). FRAX je primeren za uporabo pri pomenopavznih ženskah in moških starih 50 let in več, ni pa primeren pri bolnikih, ki se zdravijo z anti-androgenimi zdravili, pri bolnicah, ki se zdravijo z zaviralci aromataze, in bolnikih, ki se 3 mesece ali več zdravijo s peroralnimi glukokortikoidi (61).

1.8 Vloga mikro RNA v osteoporozi

MiRNA so vpletene v proliferacijo in diferenciacijo celic, celično zlitje, apoptozo, tvorbo citoskeleta in resorpcijo kosti. MiRNA vpliva tako na anabolno aktivnost osteoblastov, kot tudi na katabolno delovanje osteoklastov, kar so dokazali z analizo izgube funkcije encima dicer, ki je ključen za tvorbo zrele miRNA. Ničelna mutacija encima dicer namreč vodi v smrt embrija in prepreči tvorbo normalne zasnove telesnega vretena v gastrulaciji (65). Kažejo potencialno uporabo kot biološki označevalci aktivnosti osteoblastov in osteoklastov, vendar so za to potrebne še nadaljnje raziskave (66,67). Več raziskav je potrdilo njihovo potencialno uporabnost kot biološki kazalci pomenopavzne osteoporoze ter kot potencialne terapevtske tarče pri zdravljenju osteoporoze. Pregled nekaterih raziskav je prikazan v preglednici 3.

Preglednica 3: Izbor člankov, kjer so preiskovali potencialno povezanost določenih vrst celičnih in izvenceličnih mikro RNA z osteoporozo, na podlagi ključnih besed *post-menopausal osteoporosis and miR; osteoporosis and miR expression* (MKG = mineralna kostna gostota).

miRNA	Preiskovana skupina	Biološki vzorec in vrsta miRNA	Izražanje	Referenca
miR-133a-3p	Preiskovanke z nizko MKG / Preiskovanke z visoko MKG (N=20)	kri (celična miRNA)	Zvišano v skupini preiskovank z nizko MKG	(68)
miR-422a	Preiskovanke z nizko MKG / Preiskovanke z visoko MKG (N=20)	kri (celična miRNA)	Zvišano v skupini preiskovank z nizko MKG	(69)
miR-218-5p	Preiskovanke s pomenopavzno osteoporozo / Zdrave preiskovanke	kri (celična miRNA)	Znižano v skupini preiskovank s pomenopavzno osteoporozo	(70)
miR-503-5p	Preiskovanke s pomenopavzno osteoporozo / Zdrave preiskovanke (N=61)	serum (izvencelična miRNA)	Znižano v skupini preiskovank s pomenopavzno osteoporozo	(71)

miR-122-5p miR-125b-5p miR-21-5p	Preiskovanci z osteoporoznim zlomom / Preiskovanci z osteoartritisom (N=25)	serum (izvencelična miRNA)	Zvišano v skupini preiskovancev z osteoporoznim zlomom	(72)
miR-23-3p miR-24-3p miR-100-5p	Preiskovanci z osteoporoznim zlomom / Zdravi preiskovanci (N=60)	serum (izvencelična miRNA) in kostno tkivo (celična miRNA)	Zvišano v skupini preiskovancev z osteoporoznim zlomom	(73)
miR-133b miR-328-3p let-7g-5p	Pomenopavzne preiskovanke z zlomom kolka / Zdrave preiskovanke (N=23)	serum (izvencelična miRNA)	Znižano v skupini pomenopavznih preiskovank z zlomom kolka	(74)
miR-10a-5p miR-10b-5p miR-22-3p			Zvišano v skupini pomenopavznih preiskovank z zlomom kolka	
miR-148a-3p	Preiskovanke z osteoporozo / Zdrave preiskovanke (N=74)	plazma (izvencelična miRNA)	Zvišano v skupini preiskovank z osteoporozo	(75)

1.9 Potencialna vloga preiskovanih mikro RNA

1.9.1 hsa-let-7a-5p

V študiji, kjer so raziskovali povezavo izražanja določenih miRNA v hipokampusu podgan in depresijo, so ugotovili, da je pri depresiji izražanje miR-7a v hipokampusu zvišano (76). V študijah izražanja miRNA pri nevroloških posledicah poškodbe hrbtnače pri podganah so ugotovili, da je izražanje miR-7a pri teh poškodbah znižano in da se nevrološka funkcija bistveno izboljša po intratekalni injekciji miR-7a (77). Povezave s kostnimi boleznimi še niso potrdili v nobeni raziskavi.

1.9.2 hsa-miR-21-5p

MiR-21 je dokazano regulator osteoklastogeneze in pospešuje *in vitro* diferenciacijo osteoklastov in je prva *in vivo* dokazana miRNA s pro-osteoklastno aktivnostjo. Inhibicija miR-21 ima velik osteo-protektivni potencial pri zdravljenju osteoporoze (78). Študija, v kateri so ugotavljali izražanje miRNA v skupini bolnikov z osteoporoznimi zlomi, v primerjavi s kontrolno skupino z osteoartritisom je pokazala, da je izražanje miR-21-5p zvišano v skupini z osteoporozo, prisotnost hemolize pa ne vpliva na njeno koncentracijo (79).

1.9.3 hsa-miR-30d-5p

Wu *in sod.* so dokazali, da skupina miR-30 deluje kot negativni regulator diferenciacije osteoblastov (80). Zaragozi *in sod.* so ugotovili, da je izražanje skupine miR-30 zvišano med diferenciacijo mezenhimskih matičnih celic v adipocite, zaradi česar je zaustavljena pretvorba zarodnih celic v osteoblaste, razvoj pa se usmeri v tvorbo maščobnih celic (81).

1.9.4 hsa-miR-93-5p

Kocijan *in sod.* so raziskovali nivo izražanja različnih miRNA pri moških in ženskah z idiopatsko in pred-menopavzno osteoporozo in ugotovili zvišano izražanje miR-93-5p pri bolnikih z osteoporozo (82). V drugi študiji so dokazali tudi zvišano izražanje miR-93 v serumu bolnikov z osteoporozo, vendar pa v kostnem tkivu izražanje ni bilo zvišano, zato niso potrdili, da bi bil miR-93 lahko potencialni biološki označevalec za osteoporozo (73).

1.9.5 hsa-miR-125b-5p

Panach in *sod.* so ugotovili zvišano izražanje miR-125b-5p pri osteoporoznih bolnikih z osteoporoznimi zlomi v primerjavi s kontrolno skupino z osteoartritisom (79). V drugi

raziskavi so Kelch in sod. prav tako ugotovili zvišano izražanje miR-125b-5p tako v serumu, kot tudi kostnem tkivu osteoporoznih bolnikov (83).

1.9.6 hsa-miR-148a-3p

Cheng *in sod.* so ugotovili, da je izražanje miR-148a zvišano med diferenciacijo osteoklastov (84). Bedene *in sod.* so dokazali zvišano izražanje miR-148a pri pomenopavznih ženskah z osteoporozo, v primerjavi s kontrolno skupino (85,86).

1.9.7 hsa-miR-590-5p

Študija je pokazala, da miR-590 negativno vpliva na izražanje WT1(ang. *Wilms' tumor 1*), ki je po raziskavah zaviralec razvoja nekaterih tumorjev (87). V študiji kolorektalnega raka, pa so ugotovili da miR-590 inhibira tumorigenezo v celicah kolorektalnega raka (CRC celicah), kar je dokazano *in vitro* in *in vivo* ter kaže na potencial za razvoj novih bioloških označevalcev ali tarčne terapije CRC (88). Povezave s kostnimi boleznimi še niso potrdili v nobeni raziskavi.

2 NAMEN DELA

Osteoporoz je degenerativna bolezen, pri kateri zaradi zmanjšanja kostne mase in porušene mikroarhitekture pride do zlomov kosti. Prevalenca bolezni je zaradi naraščanja starosti prebivalstva vedno večja, zato osteoporoza s posledičnimi zlomi predstavlja velik javnozdravstveni problem. Molekule miRNA delujejo tako, da se vežejo na mRNA in povzročijo utišanje genov ter na ta način uravnavajo tvorbo proteinov, ki vplivajo na kostno prenovo. Njihova stabilnost v krvnem obtoku nam omogoča, da jih uporabljamo kot neinvazivne in visoko specifične biološke označevalce, vendar pa je na področju osteoporoze o njih omejeno število študij in malo znanega. Namen magistrske naloge bo poiskati mikro RNA, ki bi jih lahko uporabljali kot potencialne biološke označevalce pomenopavzne osteoporoze. V ta namen bomo:

- prepisali izolirane plazemske miRNA približno 150 pomenopavznih žensk v komplementarno DNA,
- izmerili plazemske koncentracije hsa-let-7a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-576-5p in hsa-miR-590-5p,
- razdelili preiskovanke v skupino preiskovank z osteoporozo in kontrolno skupino na podlagi ocene kvalitete trabekularne kosti (ang. *Trabecular bone score*), mineralne kostne gostote in na podlagi prisotnosti predhodnih osteoporoznih zlomov,
- z uporabo ustreznih statističnih testov ugotavljal razlike v koncentracijah miRNA med skupino preiskovank z osteoporozo in kontrolno skupino.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Opis preiskovancev

V raziskavo smo vključili ženske v pomenopavznem obdobju, ki v času vključitve in tudi v preteklosti niso prejemale hormonske nadomestne terapije, zdravil za zdravljenje osteoporoze, kalcija, vitamina D, v preteklosti niso uživale sistemskih glukokortikoidov več kot 3 mesece in niso imele sistemskih ali drugih bolezni, ki bi lahko vplivale na razvoj sekundarne osteoporoze. Raziskava je bila odobrena s strani Etične komisije RS, številka odobritve 108/12/05. Preiskovankam smo predhodno v EDTA epruvete odvzeli vzorce venske krvi in iz plazme izolirali miRNA. Odvzem je potekal v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni. Izločili smo preiskovanke s hemolitičnimi in lipemičnimi plazemskimi vzorci. Nato smo jih na podlagi meritev MKG in izračunane t-vrednosti, ocene kvalitete trabekularne kosti (TBS) in prisotnosti predhodnih zlomov razdelili v dve skupini – skupino z osteoporozo in kontrolno skupino. Skupini smo številčno približali na podlagi indeksa telesne mase (ITM).

3.2 Prepis plazemskih mikro RNA v komplementarno DNA

Prepis plazemskih miRNA v cDNA smo izvedli s pomočjo reagenčnega kompleta miRCURY LNATM Universal cDNA synthesis kit (Exiqon, Vedbaek, Danska). Vse reagente in plazemske miRNA, ki smo jih pred uporabo odtajali, smo ves čas hranili na ledu. Uporabili smo nerazredčene vzorce miRNA. Vključili smo dve pozitivni kontroli, ki sta predstavljali zbir vseh vzorcev (po 1 µL vsakega vzorca), ter sintetično kontrolo UniSP4. Končna sestava reakcijske zmesi je prikazana v preglednici 4. V cikličnem termostatu Termocycler Primus 96 (Peqlab, Erlangen, Nemčija) smo izvedli reakcijo po programu, opisanem v preglednici 5.

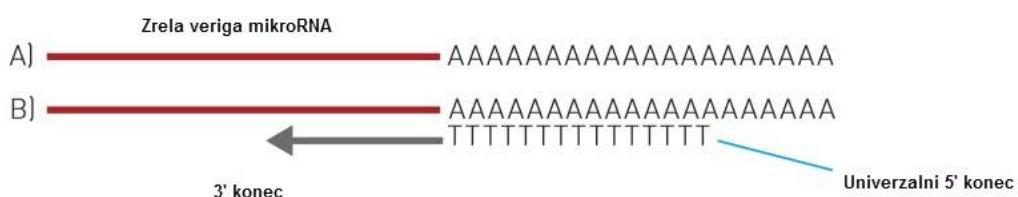
Preglednica 4: Sestava reakcijske zmesi za prepis plazemske miRNA v cDNA.

Reagenti	Volumen
5 x reakcijski pufer	2 µL
Zmes encimov z reverzno transkriptazo	1 µL
UniSp6, RNA Spike-in	0,5 µL
Vzorci plazemskih miRNA	6,5 µL
Skupni volumen	10 µL

Preglednica 5: Program za izvedbo prepisa plazemske miRNA v cDNA.

	Inkubacija	Inaktivacija	Ohlajanje
Temperatura (T)	42 °C	95 °C	4 °C
Čas (t)	60 min	5 min	/

Obratna transkripcija je reakcija sinteze cDNA na podlagi enoverižne miRNA. Potek reakcije je opisan na sliki 3 (89). Prepisano cDNA smo shranjevali na -80 °C.



Slika 3: Obratna transkripcija A) Zreli miRNA se s pomočjo encima poli(A)polimeraza doda poliadeninski rep. B) Sledi vezava začetnega oligonukleotida, ki se s 3'-koncem, ki je komplementaren poliadeneninskemu repu, veže na miRNA. Ima tudi univerzalen 5' rep, ki je pomemben v naslednjem koraku pomnoževanja cDNA. S pomočjo encima reverzna transkriptaza poteče reakcija, pri kateri nastane cDNA. Povzeto po (89).

3.3 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Za izvedbo qPCR smo uporabili reagenčni komplet miRCURY LNA™ ExiLENT SYBR® Green master mix (Exiqon, Vedbæk, Danska). CDNA in reagente smo pred uporabo odtajali in jih ves čas hranili na ledu. Osnovno mešanico za q-PCR smo zaščitili pred svetljavo. Sestava reakcijske zmesi je opisana v preglednici 6. Pripravljeno reakcijsko zmes

smo z robotom QIAgility (Qiagen, Venlo, Nizozemska) nanesli v mikrotitrske ploščice s 384 vdolbinicami in jo zaščitili s samolepilno folijo (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija). Reakcijo qPCR smo izvedli v duplikatih v cikličnem termostatu LightCycler® LC480 (Roche, Basel, Švica). Program reakcije je opisan v preglednici 7.

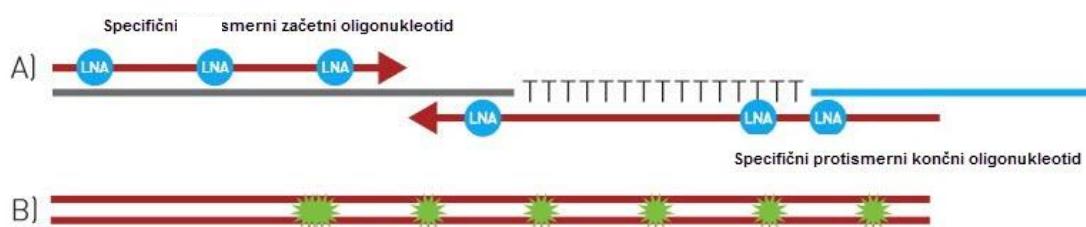
Preglednica 6: Sestava reakcijske zmesi za qPCR

Reagenti	Volumen
Osnovna mešanica za qPCR	5 µL
Zmes oligonukleotidnih začetnikov	1 µL
cDNA vzorec (40 x redčitev)	4 µL
Skupni volumen	10 µL

Preglednica 7: Program za izvedbo qPCR

	Temperatura	Čas
Aktivacija DNA polimeraze / denaturacija	95 °C	10 min
Pomnoževanje (45 x)	95 °C	10 s
	60 °C	1 min

Potek reakcije q-PCR je opisan na sliki 4.



Slika 4: Potek reakcije qPCR. A) Aktivacija termostabilne DNA polimeraze, ki ji sledi temperaturna denaturacija cDNA. Sledi prileganje specifičnih smernih in protismernih začetnih in končnih oligonukleotidov, ki se podaljšujejo z encimom DNA polimerazo iz smeri 5' konca proti 3'-koncu. Izgradi se komplementarna DNA veriga. B) Detekcija nastale DNA z barvilkom SYBR® Green. LNA = ang. *Locked nucleic acid.* (89)

Za detekcijo nastale DNA smo uporabili nespecifično barvilo SYBR® Green. Barvilo se reverzibilno veže na dvovertično DNA tako, da se vrine med bazne pare. Vezano barvilo po svetlobni eksitaciji oddaja fluorescentni signal. Fluorescenza narašča sorazmerno z večanjem količine produkta tekom podvajanja. V fazi temperaturne denaturacije DNA, nevezano barvilo ne oddaja fluorescentnega signala (90). Večanje količine produkta je sestavljeni iz eksponentne faze, linearne faze in platoja. V eksponentni fazi pride do točke, ko je fluorescenza vzorca signifikantno večja od fluorescence ozadja. Imenujemo jo prag fluorescence . Za vsak vzorec, sintetično kontrolo UniSp4 in pozitivne kontrole smo določili prag fluorescence ter kvantifikacijski cikel (Cq), ko je prag presežen. Izvedli smo tudi talilno analizo, s katero smo preverili ali so v posameznem vzorcu prisotni nespecifični produkti. Če so bili v vzorcu prisotni nespecifični produkti, se je v talilni analizi pojavil več kot en vrh in te vzorce smo iz analize izključili.

3.4 Kvantifikacija izražanja izbranih mikro RNA

Izražanje izbranih miRNA smo kvantificirali s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2010. Za normalizacijo koncentracije smo uporabili relativno metodo kvantifikacije $\Delta\Delta Cq$. V prvem koraku smo izračunali povprečne cikle vzorcev (Cq_{vz}), endogene sintetične kontrole UniSp4 (Cq_{UniSp4}) in kalibratorja ploščce (Cq_{poz}), ker smo reakcije izvajali v duplikatih. Nato smo z uporabo enačbe 1 kvantificirali izražanje miRNA.

$$\begin{aligned}\Delta Cq_{vz} &= Cq_{poz} - Cq_{vz} \\ \Delta Cq_{UniSp4} &= Cq_{poz} - Cq_{UniSp4} \\ \Delta\Delta Cq_{vz} &= \Delta Cq_{UniSp4} - \Delta Cq_{vz}\end{aligned}$$

Enačba 1: Izračun normalizirane količine posamezne miRNA v vzorcu z uporabo endogene sintetične kontrole UniSp4

Cq_{vz}	= povprečni kvantifikacijski cikel posamezne miRNA
Cq_{UniSp4}	= povprečni kvantifikacijski cikel endogene sintetične kontrole UniSp4
Cq_{poz}	= povprečni kvantifikacijski cikel pozitivne kontrole
$\Delta\Delta Cq_{vz}$	= normalizirana koncentracija posamezne miRNA

3.5 Analiza rezultatov

Za izračun podatkov o preiskovancih (ITM, MKG, TBS in t-vrednost) smo uporabili računalniški program Microsoft Office Excel 2010, nato pa smo pridobljene podatke ovrednotili s pomočjo ustreznih statističnih testov s programom SPSS Statistics 22.0.

Potek analize

1. ITM smo izračunali z uporabo enačbe:

$$ITM = \frac{telesna\ masa(kg)}{(višina(m))^2}$$

2. Preiskovanke smo na podlagi treh parametrov, opisanih v preglednici 8, razdelili v dve skupini: skupino z osteoporozo in kontrolno skupino. Skupini smo številčno približali na podlagi indeksa telesne mase (ITM) in iz kontrolne skupine (po kriterijih za t-vrednost) izključili vse preiskovanke z $ITM > 33.5$. Dobili smo populacijo 142 preiskovank. Število preiskovank v posamezni skupini, pri vseh treh razdelitvah, je prikazano v preglednici 8.

Preglednica 8: Razdelitev preiskovank v skupino z osteoporozo in kontrolno skupino

Kriterij	Kriterij razdelitve	Število preiskovank (N)
MKG (t-vrednost)	$\leq -2,5$ = z osteoporozo	58
	$> -2,5$ = kontrolna skupina	84
TBS	$< 1,35$ = z osteoporozo	109
	$\geq 1,35$ = kontrolna skupina	33
Predhodni zlomi	≥ 1 = z osteoporozo	49
	< 1 = kontrolna skupina	93

3. Vse izračunane vrednosti smo uvozili v računalniški program SPSS Statistics 22.0 in jih ovrednotili z ustreznimi statističnimi testi:

- T-test za neodvisne vzorce, s katerim smo ugotavljali, ali se starost, ITM in leta mene statistično značilno razlikujejo med skupinama,
- Test linearne regresije, s katerim smo ugotavljali ali se normalizirane koncentracije miRNA statistično značilno razlikujejo med skupinama ob upoštevanju kovariat.

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

4 REZULTATI

4.1 Preučevana populacija

V raziskavi smo preučevali preiskovanke ženskega spola, stare od 45 do 86 let. Izključitveni kriteriji so bili naslednji:

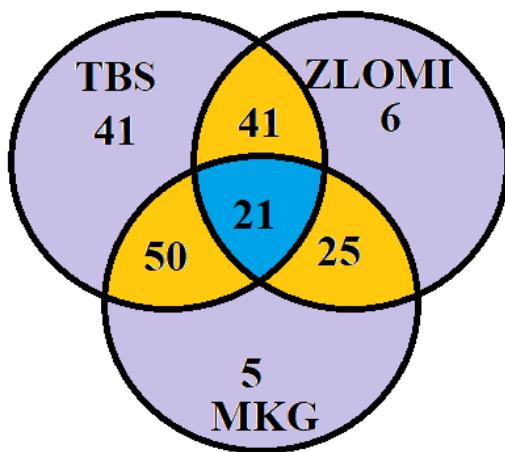
- prejemanje hormonske nadomestno terapije (trenutno ali v preteklosti),
- prejemanje zdravil za zdravljenje osteoporoze,
- preventivno uživanje zdravil za preprečevanje osteoporoze (kalcij, vitamin D),
- prejemanje sistemskih glukokotrikoidov (trenutno ali v preteklosti, več kot 3 mesece),
- prisotnost sistemskih ali drugih bolezni, ki bi lahko vplivale na razvoj osteoporoze.

Preiskovanke smo nato na podlagi meritev MKG na mestih, kjer se najpogosteje pojavljajo osteoporozni zlomi (kolk, podlaht, trohanter, stegnenični vrat in ledvena hrbtenica) in iz njih izračunane t-vrednosti, TBS, ki predstavlja parameter kvalitete trabekularne kosti, in prisotnosti predhodnih zlomov razdelili v dve skupini – skupino z osteoporozo in kontrolno skupino brez osteoporoze.

Statistične analize smo izvajali na populaciji 142 preiskovank. Število preiskovank v posamezni skupini je predstavljeno v preglednici 9. Prikaz števila preiskovank s preseki po posameznih skupinah je prikazan na sliki 5. Pri razdelitvi preiskovank glede na MKG in predhodne zlome je bilo število preiskovank višje v kontrolni skupini, medtem ko je bilo pri razdelitvi preiskovank na podlagi TBS število višje v skupini z osteoporozo.

Preglednica 9: Število preiskovank v skupini z osteoporozo in kontrolni skupini glede na izbrane kriterije. OP = osteoporoza.

Kriterij	Število preiskovank v skupini z OP	Število preiskovank v kontrolni skupini
MKG	58	84
TBS	109	33
Predhodni zlomi	49	93



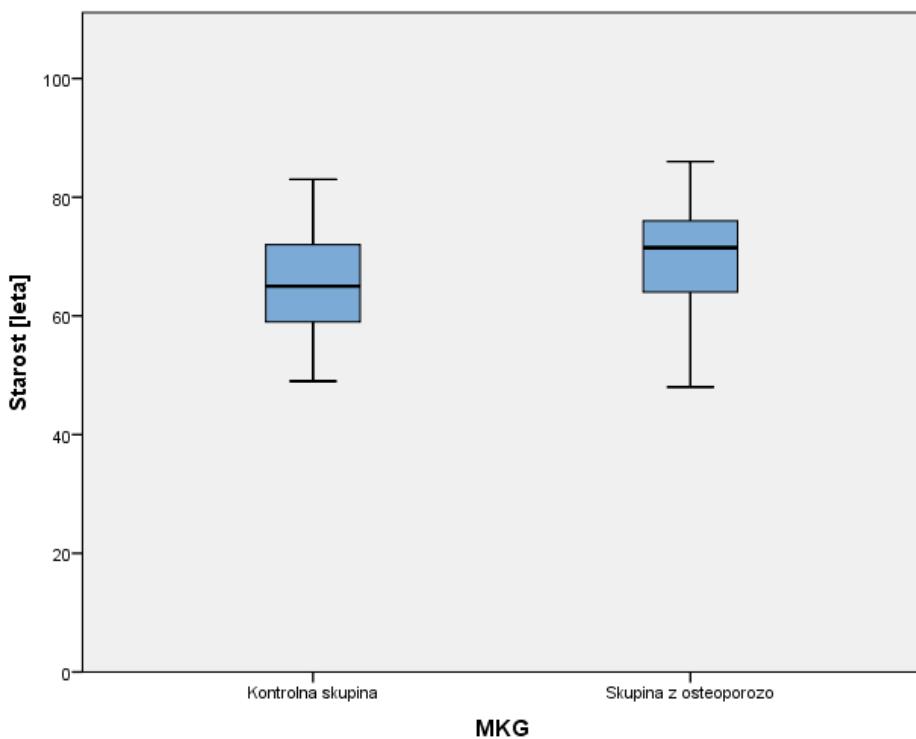
Slika 5: Prikaz števila preiskovank z osteoporozo s preseki po posameznih skupinah. TBS = ocena kvalitete trabekularne kosti, MKG = mineralna kostna gostota, zlomi = predhodni zlomi

Povprečne vrednosti starosti, ITM in let mene so prikazane v preglednici 10. Preiskovanke v skupini z osteoporozo so starejše ter so vstopile v obdobje mene prej kot preiskovanke v kontrolni skupini. To velja za vse razdelitve. ITM je pri razdelitvi preiskovank glede na TBS in predhodne zlome višji kot v skupini z osteoporozo, pri razdelitvi preiskovank glede na MKG pa je višji v kontrolni skupini.

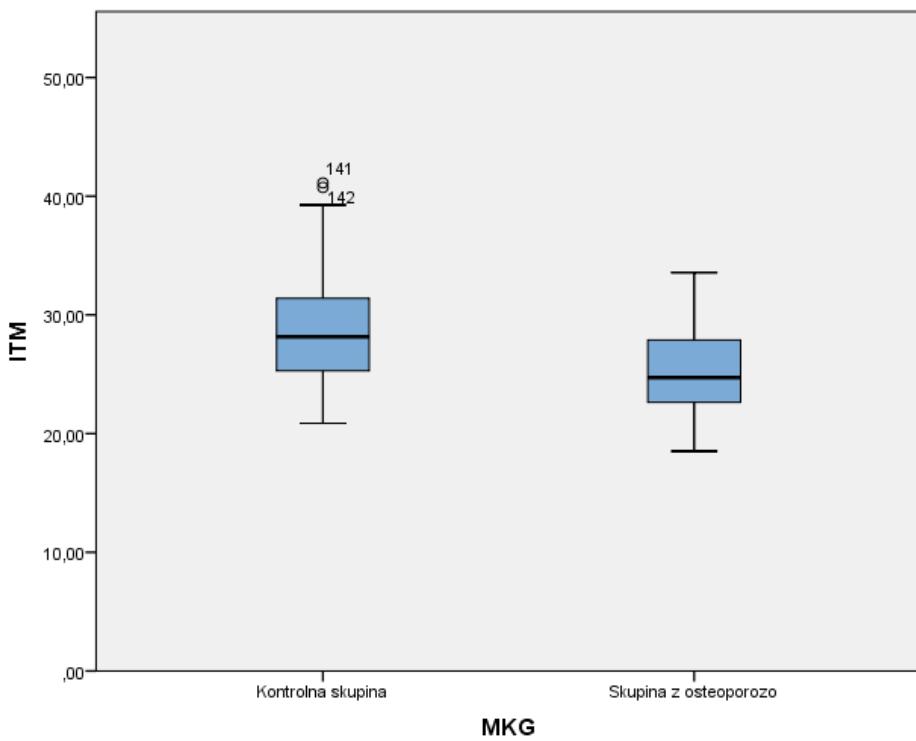
Preglednica 10: Povprečne vrednosti parametrov v posamezni skupini. OP = Osteoporozna.

	MKG		TBS		Predhodni zlomi	
	Kontrolna skupina	Skupina z OP	Kontrolna skupina	Skupina z OP	Kontrolna skupina	Skupina z OP
Starost (leta)	65,52	69,59	63,52	68,29	66,02	69,39
ITM	28,76	25,00	25,00	27,89	27,15	27,36
Leta mene	15,34	20,31	13,79	18,45	16,20	19,59

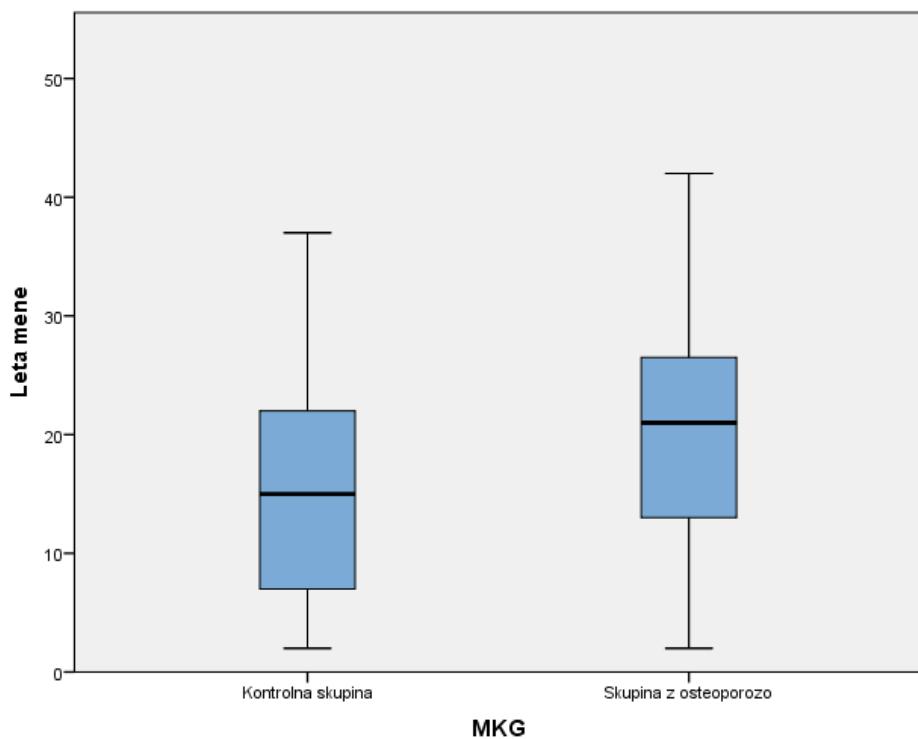
Da bi ugotovili, ali med skupinama obstajajo statistično značilne razlike v starosti, ITM in letih mene, smo izvedli t-teste neodvisnih spremenljivk. Rezultati testov in primerjava osnovnih značilnosti med skupino z osteoporozo in kontrolno skupino so predstavljeni v grafihi 1-9.



Graf 1: Razlika v starosti med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na MKG. P vrednost = 0,004.

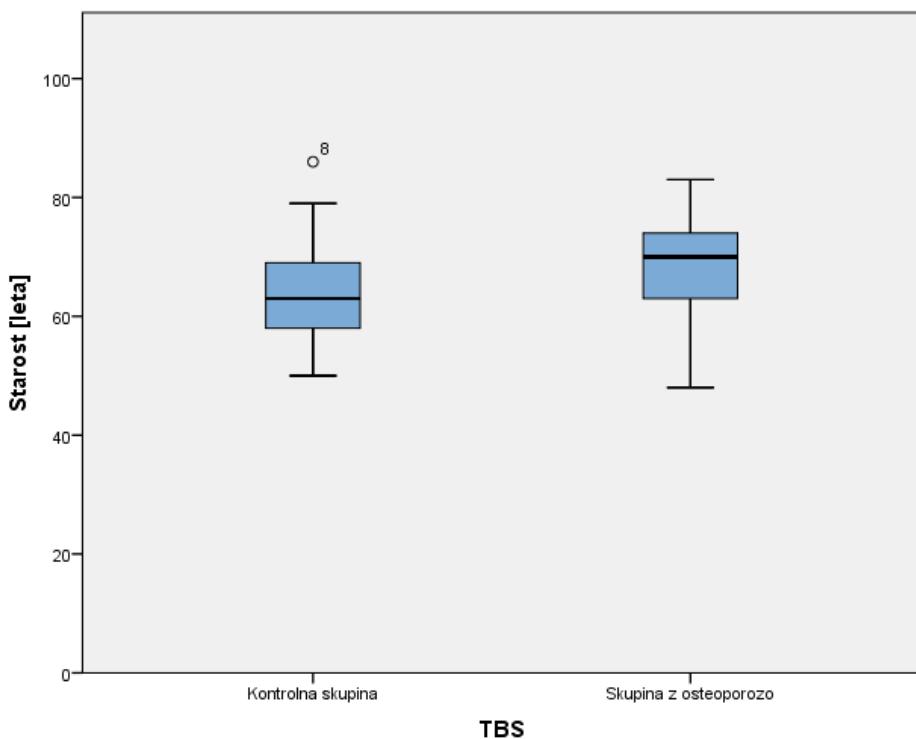


Graf 2: Razlika v ITM med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na MKG, pri čemer ^o predstavljajo odstopanja.
P vrednost = 0,000.

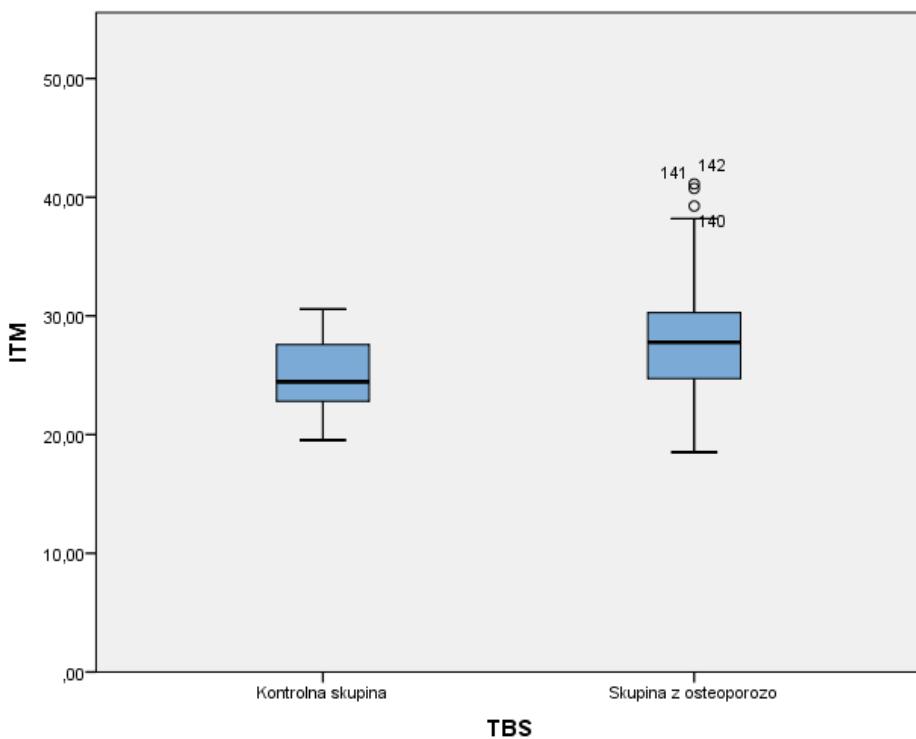


Graf 3: Razlika v letih mene med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na MKG. P vrednost = 0,002.

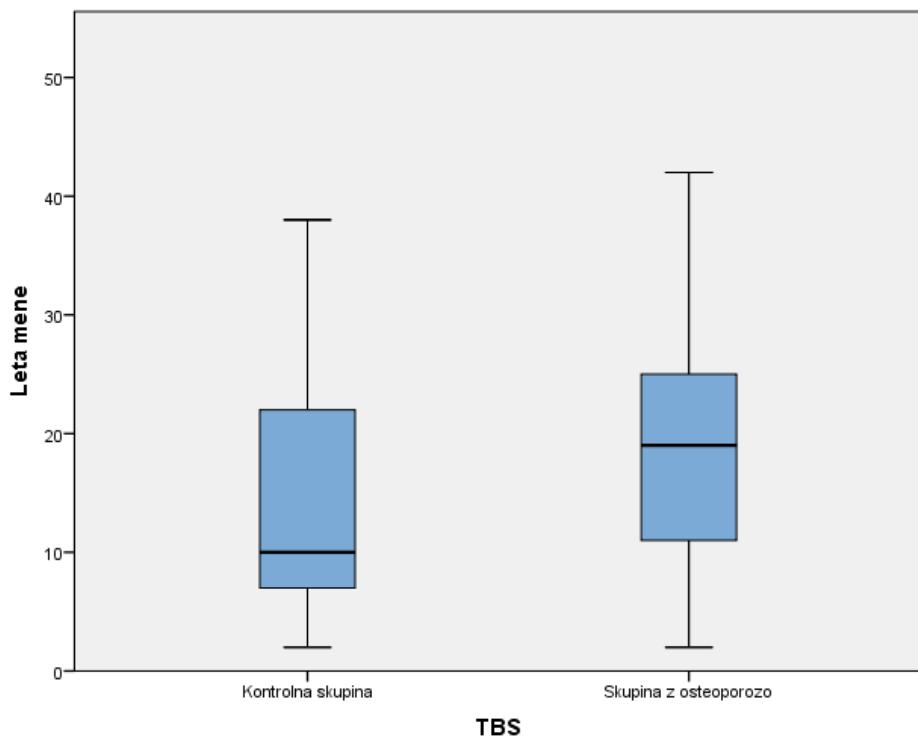
Grafi 1-3 prikazujejo porazdelitev preiskovank po starosti, ITM in letih mene glede na izmerjeno MKG. Med skupinama smo ugotovili statistično značilno razliko v starosti, ITM in letih mene. Starost in leta mene sta v primerjavi s kontrolno skupino višja v skupini z osteoporozo, ITM pa nižji.



Graf 4: Razlika v starosti med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na TBS, pri čemer ^o predstavljajo odstopanja. P vrednost = 0,004.

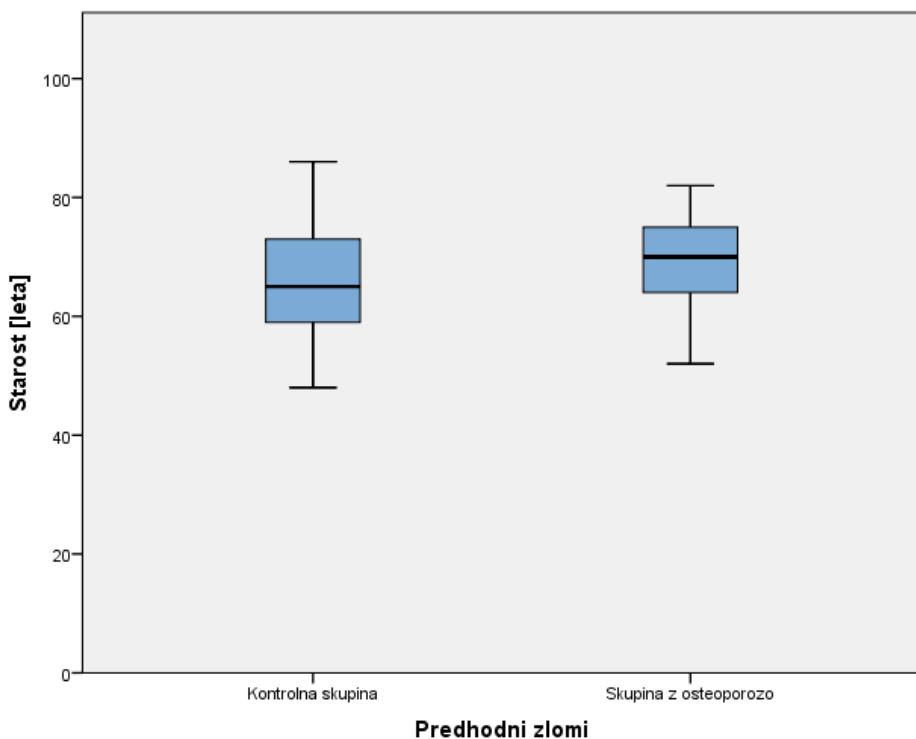


Graf 5: Razlika v ITM med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na TBS, pri čemer ^o predstavljajo odstopanja.
P vrednost = 0,000.

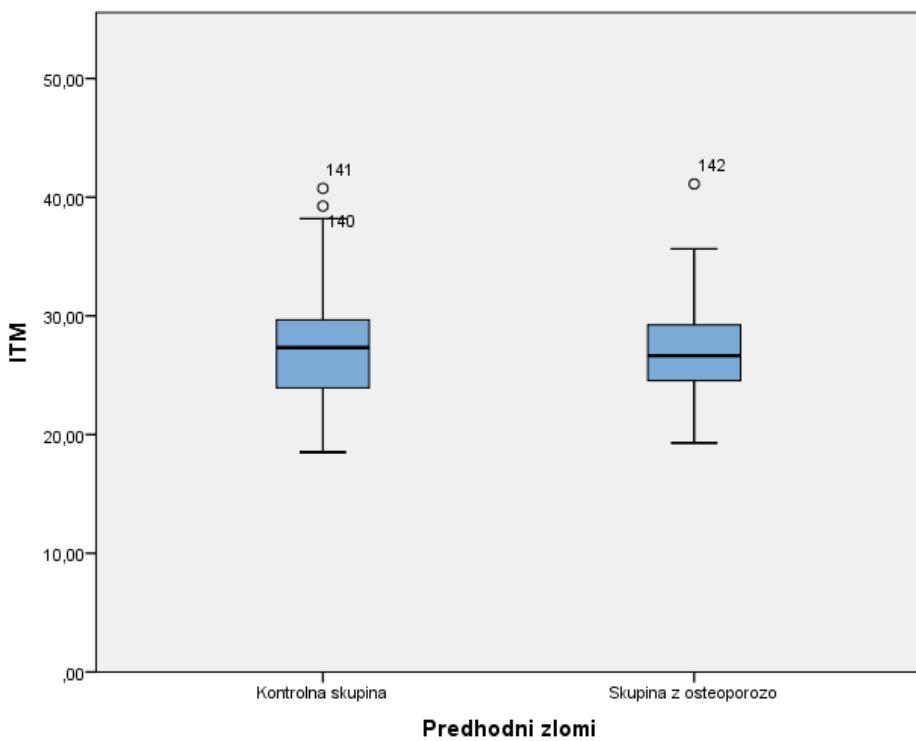


Graf 6: Razlika v letih mene med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na TBS. P vrednost = 0,014.

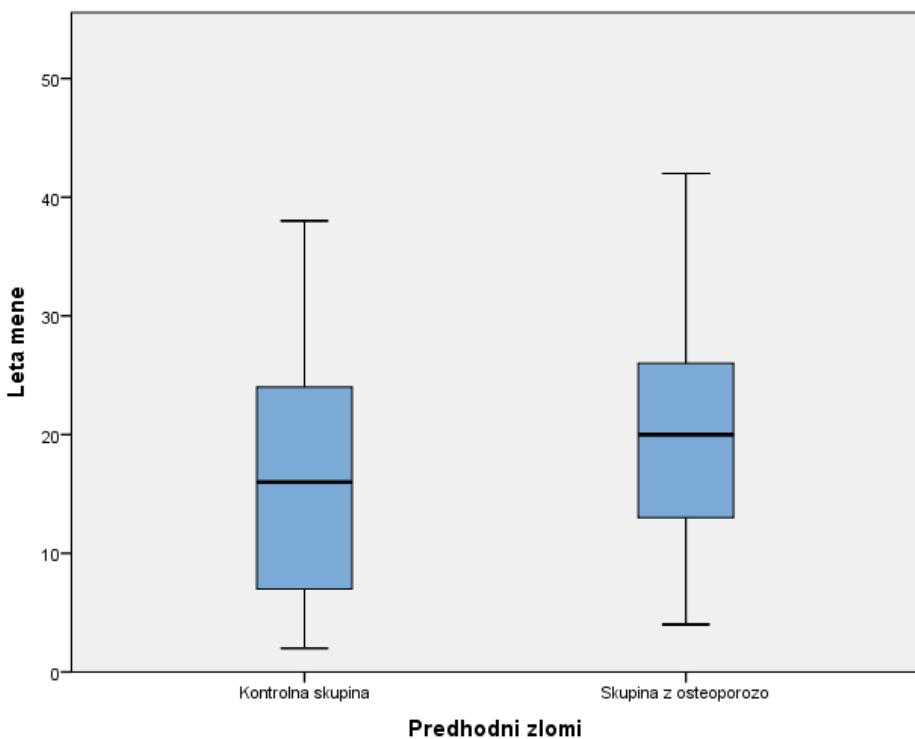
Grafi 4-6 prikazujejo porazdelitev preiskovank po starosti, ITM in letih mene glede na TBS. Ugotovili smo statistično značilno razliko med skupinama v starosti, ITM in letih mene. Vsi parametri so v skupini z osteoporozo višji kot v kontrolni skupini.



Graf 7: Razlika v starosti med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na predhodne zlome. P vrednost = 0,014.



Graf 8: Razlika v ITM med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na predhodne zlome, pri čemer ^o predstavljajo odstopanja. P vrednost = 0,787.



Graf 9: Razlika v letih mene med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na predhodne zlome. P vrednost = 0,044.

Grafi 7-9 prikazujejo porazdelitev preiskovank po starosti, ITM in letih mene glede na prisotnost predhodnih zlomov. Ugotovili smo statistično pomembno razliko med skupinama v starosti in letih mene. Oba parametra sta v skupini z osteoporozo višja kot v kontrolni skupini, ITM pa je nižji.

4.2 Normalizacija koncentracije izbranih mikro RNA

Izražanje posamezne miRNA smo določili s Pfafflovo metodo, oziroma metodo $\Delta\Delta Cq$. Gre za relativno metodo kvantifikacije, pri kateri smo predpostavili 100 % učinkovitost pomnoževanja. Izračunali smo povprečne vrednosti koncentracij vzorcev, ker smo reakcije izvajali v duplikatih. Za normalizacijo podatkov smo uporabili spike-in UniSp4, ki je namenjen za kontrolo učinkovitosti podvajanja med reakcijo PCR. Vrednosti normaliziranih količin posameznih vzorcev za izbrane miRNA so prikazane v prilogi 1.

4.3 Razlika v izražanju izbranih mikro RNA med skupinama

Želeli smo ugotoviti ali obstaja statistično značilna razlika v izražanju izbranih miRNA v skupini z osteoporozo v primerjavi s kontrolno skupino. S predhodnim t-testom neodvisnih spremenljivk smo ugotovili, da se skupini preiskovank, razdeljenih glede na MKG in TBS, pomembno razlikujeta glede na ITM, ki ima dokazan in pomemben vpliv na kosti, medtem

ko pri starosti in letih mene korelacija ni tako neposredna. ITM je bil v skupini preiskovank, razdeljenih glede na MKG nižji v skupini z osteoporozo, v skupini preiskovank, razdeljenih glede na TBS višji v skupini z osteoporozo, pri razdelitvi preiskovank glede na predhodne zlome pa smo opazili trend povišanja ITM. Pri testu linearne regresije smo zato kot kovariato uporabili ITM. Rezultati testa so prikazani v preglednici 11.

Preglednica 11: Razlika v izražanju miRNA med skupinama, pri čemer p<0,050 pomeni statistično značilno razliko med skupino z osteoporozo in kontrolno skupino (polja, obarvana s sivo).

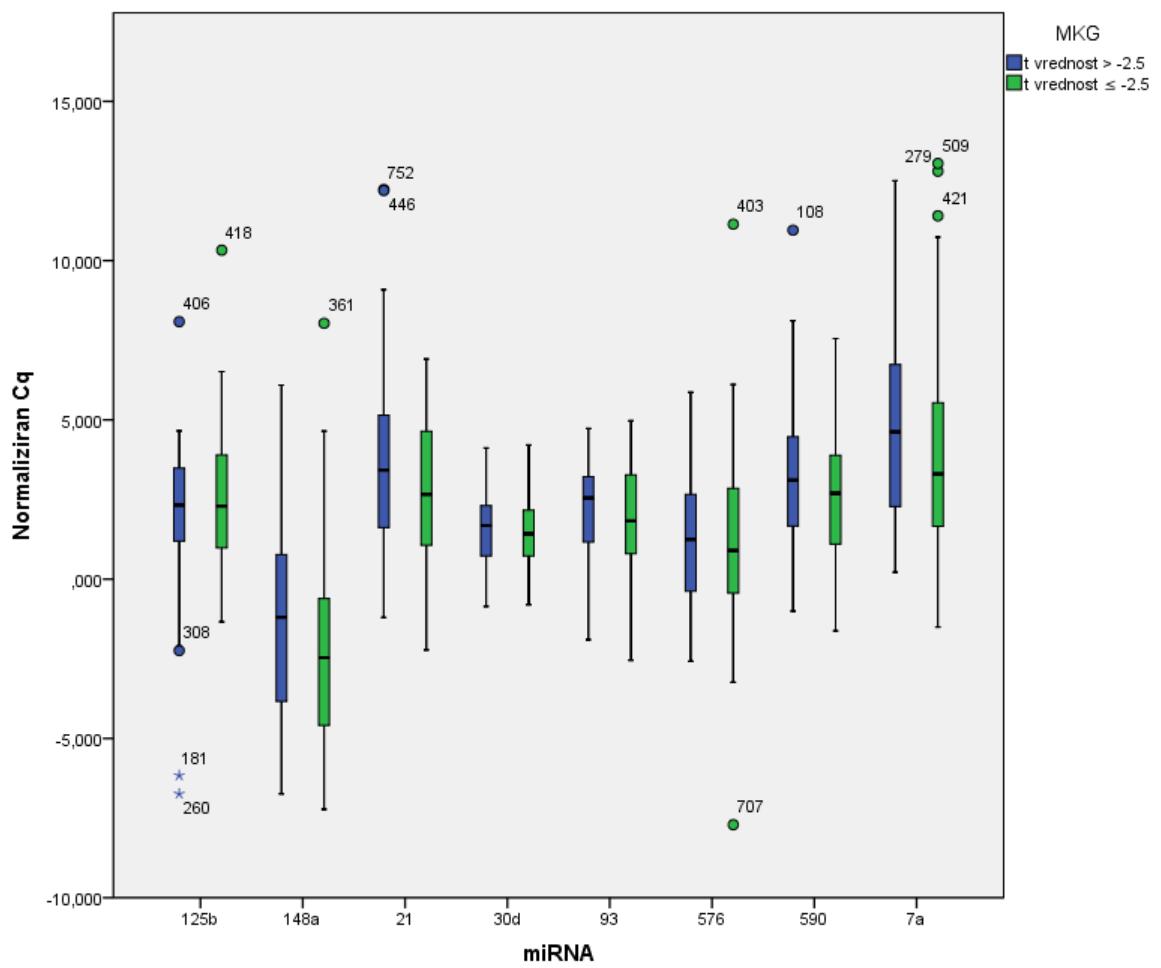
Vrsta miRNA	P vrednost (glede na MKG)	P vrednost (glede na TBS)	P vrednost (glede na predhodne zlome)
miRNA-125b	0,729	0,614	0,170
miRNA-148a	0,135	0,242	0,502
miRNA-21	0,045	0,404	0,610
miRNA-30d	0,463	0,019	0,814
miRNA-576	0,631	0,350	0,535
miRNA-590	0,149	0,081	0,837
miRNA-7a	0,210	0,150	0,921
miRNA-93	0,143	0,050	0,324

Ugotovili smo statistično značilno razliko med koncentracijama v skupini z osteoporozo in kontrolno skupino pri miRNA-21, miRNA-30d in miRNA-93, pri čemer je bila koncentracija vseh treh miRNA višja v skupini z osteoporozo.

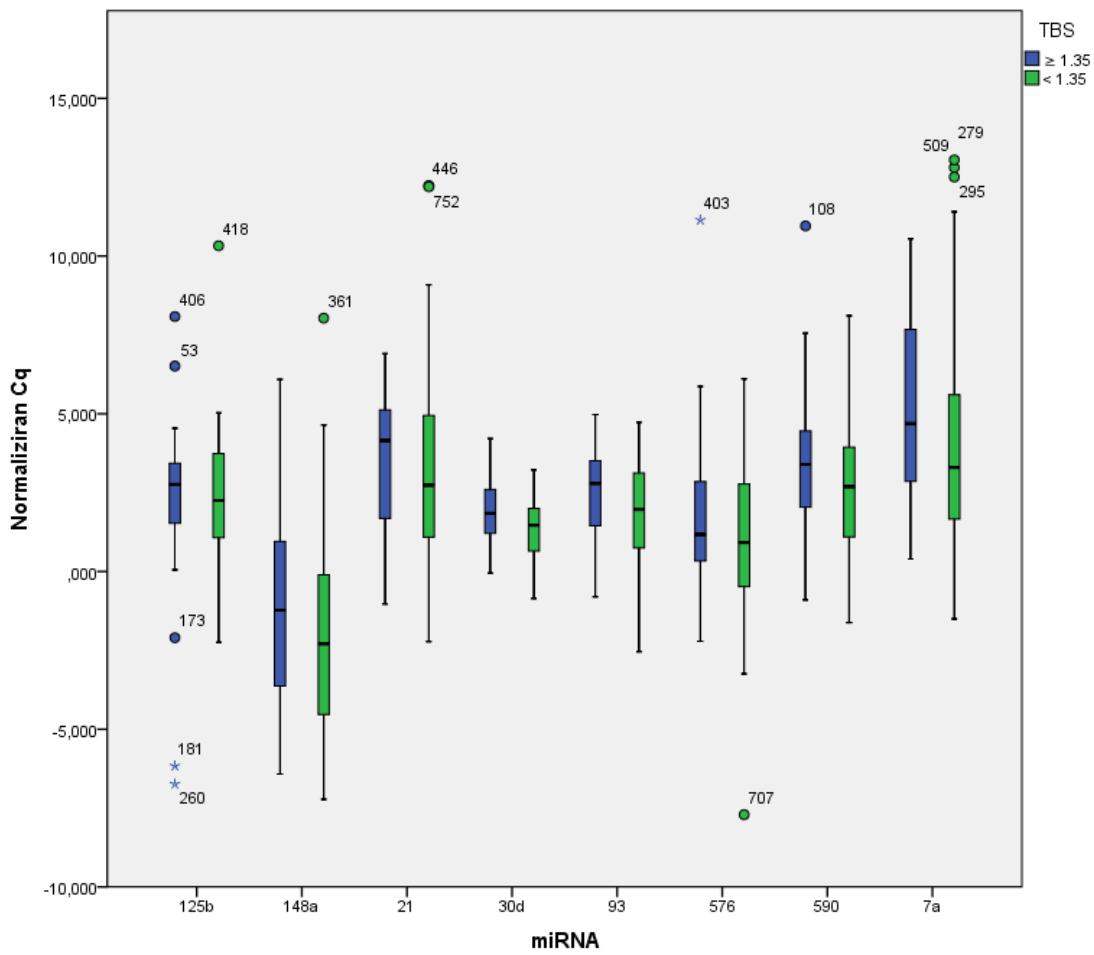
V grafih 10-12 so prikazane razlike v koncentracijah preiskovanih miRNA med skupinama. Povprečne vrednosti Cq v skupini z osteoporozo in kontrolni skupini po vseh treh kriterijih so prikazane v preglednici 12.

Preglednica 12: Povprečne vrednosti normaliziranih ciklov (Cq) v skupini z osteoporozo (OP) in kontrolni skupini, po posameznih kriterijih.

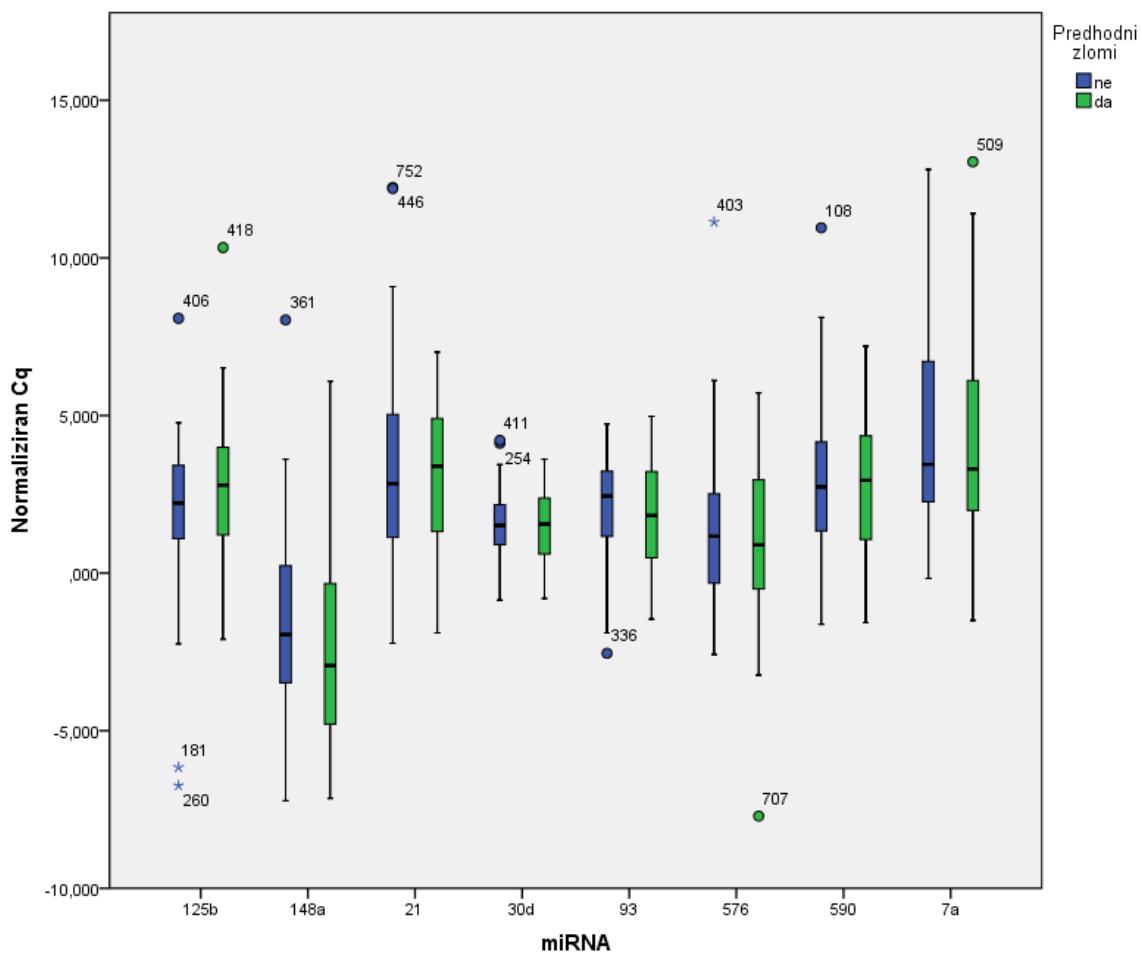
miRNA	Povprečni Cq (glede na MKG)		Povprečni Cq (glede na TBS)		Povprečni Cq (glede na predhodne zlome)	
	Kontrolna skupina	OP	Kontrolna skupina	OP	Kontrolna skupina	OP
miRNA-125b	2,084	2,446	2,064	2,278	2,100	2,461
miRNA-148a	1,754	2,206	1,423	2,092	1,826	2,130
miRNA-21	3,101	2,700	3,350	2,822	2,928	2,864
miRNA-30d	1,365	1,406	1,871	1,228	1,427	1,298
miRNA-576	1,268	1,343	1,658	1,184	1,398	1,112
miRNA-590	2,936	2,614	3,165	2,967	2,836	2,759
miRNA-7a	4,375	4,108	4,969	4,052	4,312	4,196
miRNA-93	2,093	1,970	2,406	1,888	2,116	1,819



Graf 10: Razlike v koncentracijah med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na MKG pri čemer ♀ predstavljajo odstopanja, * pa izrazita odstopanja.



Graf 11: Razlike v koncentracijah med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na TBS, pri čemer čemer * predstavlja odstopanja, * pa izrazita odstopanja.



Graf 12: Razlike v koncentracijah med kontrolno skupino in skupino z osteoporozo, glede na predhodne zlome, pri čemer 0predstavljajo odstopanja, * pa izrazita odstopanja.

5 RAZPRAVA

V študiji smo iskali miRNA, ki bi lahko bile potencialni biološki označevalci pomenopavzne osteoporoze. V ta namen smo merili plazemske koncentracije izbranih miRNA, ki smo jih nato ovrednotili s statističnimi testi.

5.1 Preučevana populacija

V raziskavo smo vključili preiskovanke ženskega spola, stare od 45 do 86 let. Prevalenca osteoporoze in tveganje za pojav zlomov sta namreč pri ženskah večja kot pri moških. Po trenutnih ocenah NOF (*ang. National Osteoporosis Foundation*) je na svetu 9,1 milijona žensk z osteoporozo in dodatnih 26 milijonov z nizko kostno gostoto, kar izrazito presega ocenjeno število 2,8 milijona moških z osteoporozo in 14,4 milijone z nizko kostno gostoto (91). Osteoporoza je močno povezana tudi s pomanjkanjem estrogenov, zato smo v raziskavo vključili izključno preiskovanke v pomenopavznem obdobju (92). Preiskovanke smo na podlagi MKG, TBS in predhodnih zlomov razdelili v dve skupini: skupino z osteoporozo in kontrolno skupino brez osteoporoze. Tri različne parametre smo uporabili, ker kljub temu da merjenje MKG velja za zlati standard diagnostike osteoporoze, to ni najbolj idealno. Z MKG smo izmerili količino, s TBS pa smo ocenili kvaliteto kosti. Meritve smo opravljali na mestih najpogostejših osteoporoznih zlomov. Najpogostejši predhodni zlomi, ki so se pojavljali pri preiskovankah, so vključevali zlome roke, zapestja, gležnja, hrbteničnega vretenca, ključnice, kolena in komolca. Zlomov nismo spremljali aktivno, pač pa smo jih popisali na podlagi opisa preiskovank, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da so bili osteoporozni. Število vseh preiskovank je bilo 142. Pri razdelitvi preiskovank glede na MKG in predhodne zlome je bilo število preiskovank v kontrolni skupini večje kot v skupini z osteoporozo, medtem ko je bilo pri razdelitvi preiskovank na podlagi TBS več takih z osteoporozo in manj v kontrolni skupini.

Preiskovankam smo določili povprečne vrednosti starosti, ITM in let mene, ter izvedli statistične t-teste neodvisnih spremenljivk, da bi ugotovili, ali med skupinami obstajajo statistično značilne razlike. Vsi trije parametri predstavljajo tveganje za razvoj osteoporoze. Glede na literaturo smo pričakovali, da bosta starost in leta mene v skupini z osteoporozo višja, ITM pa nižji (93,94). Pri ženskah poznamo dve fazi preko katerih pride do izgube kostnine. Prva faza poteka večinoma v trabekularni kostnini in se začne ob nastopu menopavze. Je posledica pomanjkanja estrogena in vodi v neenakomerno povečanje kostne resorpcije. Po 4-8 letih mene nastopi sekundarna faza, pri kateri gre za

izgubo trabekularne in kortikalne kostnine. Ta faza je povezana z zmanjšanjem tvorbe kosti zaradi manjšega števila osteocitov. Gre za starostno izgubo kostnine, ki nastopi tudi pri moških (95). Na izgubo kostnine vpliva tudi nizek ITM. Na splošno velja, da večja telesna teža predstavlja večjo mehansko obremenitev kosti, katerih masa se mora zato povečati. Poleg tega adipociti proizvajajo velike količine estrogena, ta pa zavira kostno resorpcijo. Ugotovili so, da povečanje količine maščobnega tkiva s posledičnim povečanjem ITM pri pomenopavznih ženskah vodi v povečano nastajanje estrogena, zaviranje osteoklastov in povečanje kostne mase. Debelost je povezana tudi z rezistenco na inzulin. Ljudje z višjim ITM imajo v krvi zvišane plazemske koncentracije inzulina, ki med drugim vpliva na povečano tvorbo androgenov in estrogena v jajčnikih, kar vodi v povečanje koncentracije spolnih hormonov in zopet povečano kostno maso zaradi zmanjšane aktivnosti osteklastov in povečane aktivnosti osteoblastov (96).

Pri razdelitvi preiskovank glede na MKG so bili vsi parametri statistično značilno različni, ter po pričakovanjih starost in leta mene v skupini z osteoporozo višja, ITM pa nižji. Ko smo preiskovanke razdelili na podlagi TBS, smo prav tako ugotovili statistično značilno razliko v vseh parametrih; starost in leta mene sta bila v skupini z osteoporozo višja, poleg tega pa je bil višji tudi ITM. Pri razdelitvi preiskovank glede na predhodne zlome smo ugotovili statistično značilno razliko v starosti in letih mene. Parametra sta bila po pričakovanjih višja v skupini z osteoporozo, ITM se med skupinama ni statistično značilno razlikoval, trend pa je bil višji v skupini z osteoporozo.

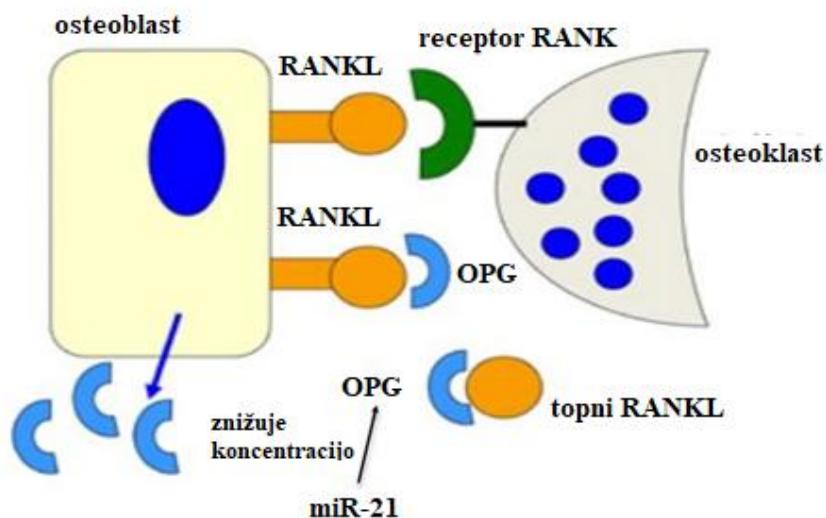
5.2 Razlika v izražanju mikro RNA med skupinama

S pomočjo testa linearne regresije smo želeli preveriti ali med skupino z osteoporozo in kontrolno skupino obstajajo statistično značilne razlike v koncentracijah izbranih miRNA, kar bi pomenilo, da bi jih potencialno lahko uporabljali kot biološke označevalce v diagnostiki osteoporoze. Trenutna orodja, ki se uporabljajo v klinični praksi imajo namreč kar nekaj omejitev, še posebej v povezavi s predvidevanjem tveganja za zlome. V naši raziskavi smo ugotovili, da je izražanje miRNA-21, miRNA-30d in miRNA-93 statistično značilno različno med skupinama. Izražanje miRNA-21 je bilo v skupini preiskovank, razdeljenih glede na MKG zvišano v skupini z osteoporozo, medtem ko smo tudi pri razdelitvi preiskovank glede na TBS in predhodne zlome opazili trend povišanega izražanja v skupini z osteoporozo. Izražanje miRNA-30d je bilo v skupini preiskovank, razdeljenih glede na TBS, zvišano v skupini z osteoporozo. Pri razdelitvi preiskovank,

razdeljenih glede na MKG smo opazili trend znižanega izražanja, v skupini preiskovank, razdeljenih glede na predhodne zlome pa trend povišanega izražanja v skupini z osteoporozo. Izražanje miRNA-93 je bilo v skupini preiskovank, razdeljenih glede na TBS, zvišano v skupini z osteoporozo. Tudi pri razdelitvi preiskovank glede na TBS in predhodne zlome opazili trend povišanega izražanja v skupini z osteoporozo. Ostale preiskovane miRNA niso izkazovale statistično značilne razlike v izražanju med skupino z osteoporozo in kontrolno skupino. Pri miRNA-125b in miRNA-148a smo opazili trend nižjega izražanja v skupini z osteoporozo, pri razdelitvi preiskovank po vseh treh kriterijih. Pri miRNA-590 ter miRNA-7a smo opazili trend povišanega izražanja v skupini z osteoporozo, pri razdelitvi preiskovank po vseh treh kriterijih. MiRNA-576 pa je izkazovala trend povišanega izražanja v skupini z osteoporozo pri razdelitvi preiskovank glede na TBS in predhodne zlome, medtem ko je v skupini preiskovank, razdeljenih glede na MKG izkazovala trend znižanega izražanja v skupini z osteoporozo. Zvišano koncentracijo miRNA-21, miRNA-30d in miRNA-93 so dokazali tudi v drugih raziskavah. Panach *in sod.* so preiskovanke v pomenopavznem obdobju razdelili v skupino z osteoporozo (preiskovanke z zlomom kolka) in kontrolno skupino (preiskovanke z osteoartritisom) ter ugotovili zvišano izražanje miRNA-21 v skupini z osteoporozo. Kocijan *in sod.* so ugotovili zvišano izražanje miRNA-93 v serumu bolnikov z osteoporozo, pri čemer so preiskovance razdelili v skupino z osteoporozo in kontrolno skupino na podlagi predhodnih zlomov (82). Tudi Seeliger *in sod.* so dokazali zvišano izražanje miRNA-21, miRNA-93 v serumu bolnikov z osteopoznimi zlomi v primerjavi s preiskovanci brez osteopoznih zlomov (73). Nasprotno so dokazali Li *in sod.* ki so v skupini 120 pomenopavznih žensk v primerjavi z zdravo kontrolno skupino merili izražanje miRNA-133a, miRNA-21 in miRNA-146a. Ugotovili so namreč znižano izražanje miRNA-21, medtem ko je bilo izražanje miRNA-133a zvišano, miRNA-146a pa nespremenjeno (97). Weilner *in sod.* so merili koncentracije miRNA-22-3p, miRNA-328-3p in let-7g-5p v serumu preiskovancev z osteoporozo in zlomi kolka v primerjavi s kontrolno skupino brez zlomov. Želeli so ugotoviti spremembe v profilu izražanja miRNA, ki so posledica zlomov, ter njihovo potencialno vlogo in vpliv na diferenciacijo mezenhimskih matičnih celic. Tudi oni so dokazali, da je izražanje -22-3p, miRNA-328-3p in let-7g-5p znižano v primerjavi s kontrolno skupino (98). Do razlik med rezultati študij prihaja lahko zaradi različne zasnove študij, kot je število in profil pacientov, ter zaradi različnih uporabljenih analitskih metod.

5.3 Potencialni mehanizem delovanja mikro RNA-21, mikro RNA-93 in mikro RNA-30d

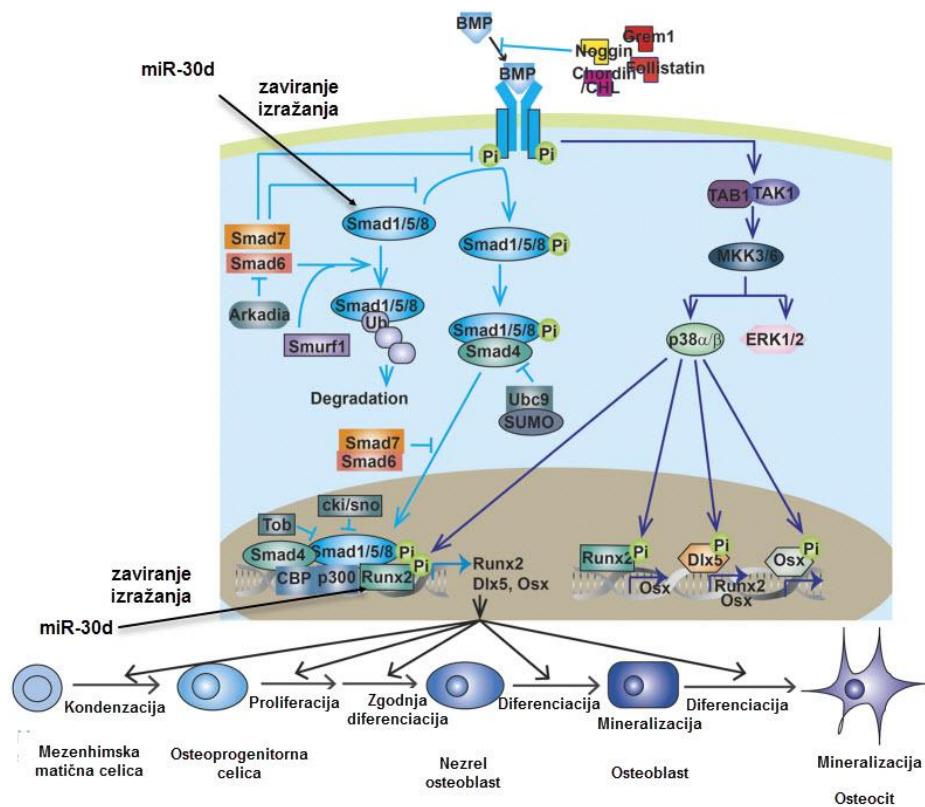
Izražanje miRNA-21, miRNA-93 in miRNA-30d je bilo izrazito zvišano v skupini z osteoporozo, zato nas je zanimal njihov potencialni mehanizem, preko katerega bi lahko vplivale na razvoj osteoporoze. MiRNA-21 vpliva na signalno pot RANK/RANKL/OPG, ki je ključna pot diferenciacije osteoklastov (99). Neposredno zmanjšuje koncentracijo osteoprotegerina (OPG) in na ta način pospešuje osteoklastogenezo. V raziskavi, kjer so ugotavljeni ali je miRNA-21 povezana s kostnimi boleznimi, ki so posledica multiplega mieloma, so namreč dokazali, da je tarča miRNA-21 3'UTR regija na OPG ter da se z inhibicijo miRNA-21 koncentracija in izločanje OPG poveča (100). Mehanizem signalne poti je opisan na sliki 6.



Slika 6: Mehanizem signalne poti RANK/RANKL/OPG: Osteoblasti izločajo številne signalne molekule, med njimi M-CSF (*ang. macrophage colony stimulating factor*) in RANKL (ligand aktivatorja receptorja NF- κ B). RANKL se veže na receptor RANK na površini osteoklastov in sproži osteoklastogenezo. Osteoprotegerin (OPG), ki ga prav tako izločajo osteoblasti, se veže na RANKL in na ta način prepreči njegovo vezavo na RANK receptor ter posledično zavira osteoklastogenezo. Povzeto po (101,102).

MiRNA-30d *in-vitro* inhibira diferenciacijo osteoblastov, njeni glavni tarči pa sta proteina Smad1 in Runx, ključni molekuli v signalni poti kostnega morfogenetskega proteina (BMP, *ang. Bone Morphogenetic Protein*) v procesu tvorbe kosti. Potez BMP signalne poti je podrobnejše predstavljen na sliki 7. MiRNA-30d deluje tako, da inhibira translacijo

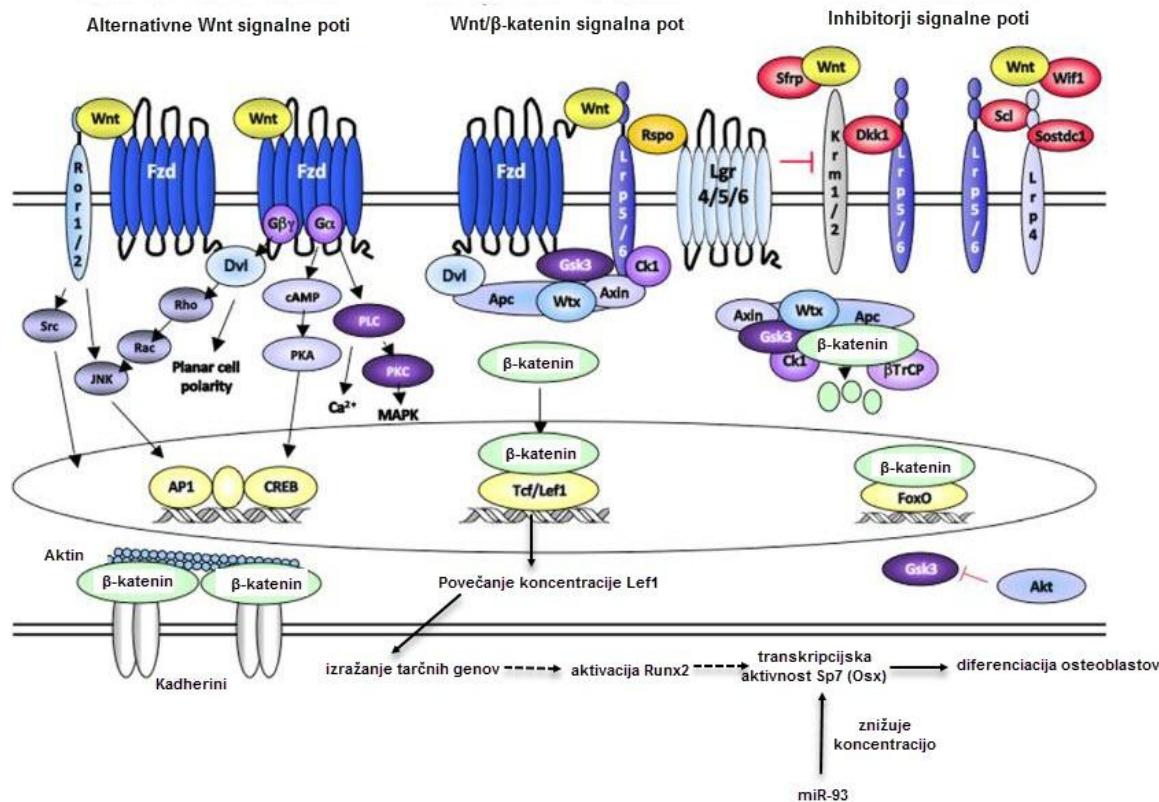
genov, ki kodirajo Smad1 in Runx2 ter tako zmanjšuje njuno koncentracijo (80,103). *In vivo* vpliv miRNA-30d še ni bil potrjen.



Slika 7: Mehанизem signalne poti kostnega morfogenetskega proteina (BMP). Ločimo dve poti signaliziranja prek BMP: Signalno pot, ki je odvisna od Smad proteinov in signalno pot neodvisno od Smad proteinov. Obe poti se začneta z vezavo BMP na homomerni receptor tipa II, ki transfosforilira homomerni receptor tipa I. Signalna pot, odvisna od Smad proteinov, se nadaljuje tako, da fosforilirani R-Smad (Smad1, 5 ali 8) tvori kompleks s Smad4, kompleks pa se prenese v jedro, kjer se sprostijo kofaktorji in Runx2, ki omogočijo osteogenezo. Signalna pot, ki ni odvisna od Smad proteinov, pa poteka preko fosforiliranih TAK1, ki se povežejo s TAB1 in sprožijo kaskado reakcij preko MKK-p38 MAPK ali MKK/ERK1/2. MAPK fosforilira Runx2 in aktivira njegovo transkripcijsko aktivnost. Povzeto po (104).

MiRNA-93 je pomemben regulator kostne mineralizacije. Zvišano izražanje miRNA-93 zavira mineralizacijo preko neposrednega zniževanja koncentracije proteina Sp7 (Osterix ali Osx) (105). Protein Sp7 je transkripcijski dejavnik, ki ga izločajo osteoblasti, za njegovo transkripcijsko dejavnost pa je potrebna predhodna aktivacija Runx2 preko BMP ali kanonične Wnt / β -catenin signalne poti, ki je podrobnejše opisana na sliki 8 (106). MiRNA-93 in protein Sp7 vplivata drug na drugega preko negativne povratne zanke. MiRNA-93 znižuje koncentracijo proteina Sp7, nižja koncentracije Sp7 pa zniža izražanje

miRNA-93. Na ta način ohranjata ravnovesje v procesu mineralizacije kostnega matriksa (105).



Slika 8: Mehanizem signalne poti Wnt. Na sliki sta prikazani kanonična ali Wnt/β-katenin signalna pot in alternativna signalna pot. Ključna molekula v kanonični signalni poti je β-katenin. Ob prisotnosti Wnt molekul pa se sproži kaskada reakcij, ki sprostijo β-katenin iz kompleksov. Ta v prosti obliki lahko preide v jedro, kjer aktivira transkripcijske dejavnike (kot sta Lef1 in Tcf7), ki uravnavajo izražanje genov, med drugim sproži izražanje Opg in Runx2. Nekanonične signalne poti pa so signalna pot s planarno celično polarnostjo, signalna pot, ki je povezana s trimernim receptorjem sklopljenim s proteinom G in Jnk signalna pot. Povzeto po (107).

6 SKLEP

V magistrski nalogi smo iskali miRNA, ki bi lahko bile potencialni biološki označevalci pomenopavzne osteoporoze. Izolirane plazemske miRNA približno 150 pomenopavznih žensk smo prepisali v komplementarno DNA in izmerili plazemske koncentracije hsa-let-7a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-576-5p in hsa-miR-590-5p. Preiskovanke smo razdelili v skupino z osteoporozo in kontrolno skupino na podlagi ocene kvalitete trabekularne kosti (angl. *Trabecular bone score*), mineralne kostne gostote in na podlagi prisotnosti predhodnih osteoporotičnih zlomov. Nato smo z uporabo ustreznih statističnih testov vrednotili razlike v izražanju miRNA med skupino preiskovank z osteoporozo in kontrolno skupino.

Naše ugotovitve so:

- Izražanje hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30d-5p in hsa-miR-93-5p se statistično pomembno razlikuje med skupino preiskovank z osteoporozo in kontrolno skupino, pri čemer je izražanje vseh treh miRNA zvišano v skupini z osteoporozo.
- Hsa-miR-21-5p, hsa-miR-30d-5p in hsa-miR-93-5p bi lahko predstavljale potencialne biološke označevalce pomenopavzne osteoporoze.
- Naši rezultati se ujemajo s študijami s primerljivim številom preiskovank, vendar bi morali potrditi ugotovitve na večjem številu preiskovank.

7 LITERATURA

1. Di Gesualdo F, Capaccioli S, Lulli M. A pathophysiological view of the long non-coding RNA world. *Oncotarget* 2014; 5(22): 10976–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428918> Dostop: 8.11.2017.
2. Patil VS, Zhou R, Rana TM. Gene regulation by non-coding RNAs. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2014; 49(1): 16–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24164576> Dostop: 8.11.2017.
3. Grimaldi A, Zarone MR, Irace C, Zappavigna S, Lombardi A, Kawasaki H, et al. Non-coding RNAs as a new dawn in tumor diagnosis. *Semin Cell Dev Biol* 2017. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952117302586> Dostop: 8.11.2017.
4. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *Int J Mol Sci* 2013; 14(8): 16010–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912238> Dostop: 11.11.2017.
5. Nam J-W, Choi S-W, You B-H. Incredible RNA: Dual Functions of Coding and Noncoding. *Mol Cells* 2016; 39(5): 367–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27137091> Dostop: 11.11.2017.
6. Kugel JF, Goodrich JA. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(4): 144–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300815> Dostop: 11.11.2017.
7. Melissari M-T, Grote P. Roles for long non-coding RNAs in physiology and disease. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2016; 468(6): 945–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944276> Dostop: 11.11.2017.
8. Kwan JYY, Psarianos P, Bruce JP, Yip KW, Liu F-F. The complexity of microRNAs in human cancer. *J Radiat Res* 2016; 57 Suppl 1(Suppl 1): i106–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26983984> Dostop: 11.11.2017.
9. Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions. *Brief Bioinform* 2014; 15(1): 1–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23175680> Dostop: 8.11.2017.
10. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281–97. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404000455> Dostop: 11.11.2017.
11. Zhao T, Li G, Mi S, Li S, Hannon GJ, Wang X-J, et al. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* 2007;

- 21(10): 1190–203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470535> Dostop: 11.11.2017.
12. O’Carroll D, Schaefer A. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(1): 39–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22669168> Dostop: 8.11.2017.
13. Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115(2): 199–208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567917> Dostop: 11.11.2017.
14. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol* 2014; 51(4): 759–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24045890> Dostop: 8.11.2017.
15. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 2009; 136(2): 215–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167326> Dostop: 11.11.2017.
16. Mohr A, Mott J. Overview of MicroRNA Biology. *Semin Liver Dis* 2015; 35(1): 003–11.
17. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem* 2017; 8(1): 45–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289518> Dostop: 8.11.2017.
18. Iorio M V, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J* 2012; 18(3): 215–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647357> Dostop: 11.11.2017.
19. Franks TM, Lykke-Andersen J. The Control of mRNA Decapping and P-Body Formation. *Mol Cell* 2008; 32(5): 605–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061636> Dostop: 11.11.2017.
20. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 2005; 169(6): 871–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967811> Dostop: 11.11.2017.
21. Yekta S, Shih I-H, Bartel DP. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004; 304(5670): 594–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105502> Dostop: 11.11.2017.
22. Eystathioy T, Chan EKL, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ. A

- Phosphorylated Cytoplasmic Autoantigen, GW182, Associates with a Unique Population of Human mRNAs within Novel Cytoplasmic Speckles. *Mol Biol Cell* 2002; 13(4): 1338–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950943> Dostop: 11.11.2017.
23. Montani F, Bianchi F. Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. *EBioMedicine* 2016; 4–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27077096> Dostop: 8.11.2017.
24. Turchinovich A, Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol* 2012; 9(8): 1066–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22858679> Dostop: 8.11.2017.
25. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109(31): E2110–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753494> Dostop: 11.11.2017.
26. Makarova JA, Maltseva D V, Galatenko V V, Abbasi A, Maximenko DG, Grigoriev AI, et al. Exercise immunology meets MiRNAs. *Exerc Immunol Rev* 2014; 20: 135–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974725> Dostop: 12.11.2017.
27. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11(3): 145–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24492836> Dostop: 12.11.2017.
28. Rodriguez-dorantes M, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O, Salido-Guadarrama I, Hidalgo-Miranda A. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther* 2014; 7: 1327. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092989> Dostop: 12.11.2017.
29. Saikumar J, Ramachandran K, Vaidya VS. Noninvasive micromarkers. *Clin Chem* 2014; 60(9): 1158–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24407912> Dostop: 12.11.2017.
30. Laganà A, Russo F, Veneziano D, Bella S Di, Giugno R, Pulvirenti A, et al. Extracellular circulating viral microRNAs: current knowledge and perspectives. *Front Genet* 2013; 4: 120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805153> Dostop: 12.11.2017.
31. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(16): 7223–33.

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609964 Dostop: 9.11.2017.
32. Gursanscky NR, Searle IR, Carroll BJ. Mobile microRNAs hit the target. *Traffic* 2011; 12(11): 1475–82.
 33. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013 ; 33(2): 186–92. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325475 Dostop: 8.11.2017.
 34. 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. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402084 Dostop: 8.11.2017.
 35. Russo F, Di Bella S, Nigita G, Macca V, Laganà A, Giugno R, et al. miRandola: extracellular circulating microRNAs database. *PLoS One* 2012; 7(10): e47786. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23094086 Dostop: 9.11.2017.
 36. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(12): 5003–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383194 Dostop: 9.11.2017.
 37. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* 2013; 4: 2980. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356509 Dostop: 11.11.2017.
 38. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MAJ, Sadek P, Sie D, et al. Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes. *Cell Rep* 2014; 8(6): 1649–58. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242326 Dostop: 11.11.2017.
 39. Frank F, Sonenberg N, Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 2010; 465(7299): 818–22. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20505670 Dostop: 11.11.2017.
 40. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 2012; 22(3): 125–32. http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001.
 41. Saleem SN, Abdel-Mageed AB. Tumor-derived exosomes in oncogenic reprogramming and cancer progression. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(1): 1–10. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25156068 Dostop: 12.11.2017.

42. SATO-KUWABARA Y, MELO SA, SOARES FA, CALIN GA. The fusion of two worlds: Non-coding RNAs and extracellular vesicles - diagnostic and therapeutic implications (Review). *Int J Oncol* 2015; 46(1): 17–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338714> Dostop: 12.11.2017.
43. Eichelser C, Stückrath I, Müller V, Milde-Langosch K, Wikman H, Pantel K, et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget* 2014; 5(20): 9650–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25333260> Dostop: 12.11.2017.
44. Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology* 2012; 56(5): 1946–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22684891> Dostop: 12.11.2017.
45. Sheinerman KS, Tsivinsky VG, Umansky SR. Analysis of organ-enriched microRNAs in plasma as an approach to development of Universal Screening Test: feasibility study. *J Transl Med* 2013; 11: 304. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24330742> Dostop: 12.11.2017.
46. Taguchi Y, Murakami Y. Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases? *BMC Res Notes* 2014; 7(1): 581. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25176111> Dostop: 12.11.2017.
47. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010; 285(33): 25103–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501658> Dostop: 11.11.2017.
48. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous Bone Remodeling Occurs in Specialized Compartments Lined by Cells Expressing Osteoblastic Markers. *J Bone Miner Res* 2001; 16(9): 1575–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11547826> Dostop: 12.11.2017.
49. BONEWALD LF. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1116(1): 281–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646259> Dostop: 12.11.2017.
50. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. Spatial Distribution of Bax and Bcl-2 in Osteocytes After Bone Fatigue: Complementary Roles in Bone Remodeling Regulation? *J Bone Miner Res* 2002; 17(5): 907–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12009022> Dostop: 12.11.2017.

51. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss. *J Bone Miner Res* 2006; 21(4): 605–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16598381> Dostop: 12.11.2017.
52. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, et al. Catabolic Effects of Continuous Human PTH (1–38) *in Vivo* Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation. *Endocrinology* 2001; 142(9): 4047–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517184> Dostop: 12.11.2017.
53. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289(5484): 1504–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10968780> Dostop: 12.11.2017.
54. Tran Van P, Vignery A, Baron R. An electron-microscopic study of the bone-remodeling sequence in the rat. *Cell Tissue Res* 1982; 225(2): 283–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7105150> Dostop: 12.11.2017.
55. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-β1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 2009; 15(7): 757–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584867> Dostop: 12.11.2017.
56. Robey P. BA. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. American Society of Bone and Mineral Research, Washington, DC. 2008; 32–8.
57. Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 2005; 19(9): 1093–104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833911> Dostop: 12.11.2017.
58. Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2008; 5(1) :49–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460846> Dostop: 12.11.2017.
59. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: A compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos* 2013; 8(1–2).
60. Szulc P, Bouxsein ML. Overview of osteoporosis: epidemiology and clinical management. *Vertebr Fract Initiat Resour Doc* 2011.

61. Kocjan T, Preželj J, Pfeifer M, Jensterle Sever M, Čokolič M, Zavratnik A. Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. *Zdr Vestn* 2013; 82(4): 207–17.
62. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int* 2014; 25(10): 2359–81.
63. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2009; 9(8): 1137–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7976495> Dostop: 12.11.2017.
64. Kanis JA, Harvey NC, Cooper C, Johansson H, Odén A, McCloskey E V. A systematic review of intervention thresholds based on FRAX : A report prepared for the National Osteoporosis Guideline Group and the International Osteoporosis Foundation. *Arch Osteoporos* 2016; 11(1): 25.
65. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003; 35(3): 215–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528307> Dostop: 12.11.2017.
66. Ji X, Chen X, Yu X. MicroRNAs in osteoclastogenesis and function: Potential therapeutic targets for osteoporosis. *Int J Mol Sci* 2016; 17(3).
67. Arfat Y, Xiao W-Z, Ahmad M, Zhao F, Li D-J, Sun Y-L, et al. Role of microRNAs in osteoblasts differentiation and bone disorders. *Curr Med Chem* 2015; 22(6): 748–58 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386816> Dostop: 11.11.2017.
68. Wang Y, Li L, Moore BT, Peng X-H, Fang X, Lappe JM, et al. MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* 2012; 7(4): e34641. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506038> Dostop: 12.11.2017.
69. Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng X-H, Lappe JM, Recker RR, et al. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* 2014; 9(5): e97098. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24820117> Dostop: 12.11.2017.
70. Qu B, Xia X, Yan M, Gong K, Deng S, Huang G, et al. miR-218 is involved in the negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by partial suppression of p38MAPK-c-Fos-NFATc1 signaling: Potential role for osteopenic diseases. *Exp Cell Res* 2015; 338(1): 89–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216483> Dostop: 12.11.2017.

71. Chen C, Cheng P, Xie H, Zhou H-D, Wu X-P, Liao E-Y, et al. MiR-503 Regulates Osteoclastogenesis via Targeting RANK. *J Bone Miner Res* 2014; 29(2): 338–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23821519> Dostop: 12.11.2017.
72. Panach L, Mifsut D, Tarín JJ, Cano A, García-Pérez MÁ. Serum Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture. *Calcif Tissue Int* 2015; 97(5): 495–505. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26163235> Dostop: 12.11.2017.
73. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, et al. Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 2014; 29(8): 1718–28.
74. Weilner S, Skalicky S, Salzer B, Keider V, Wagner M, Hildner F, et al. Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* 2015; 79: 43–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026730> Dostop: 11.11.2017.
75. Bedene A, Bedrač SM, Ješe L, Marc J, Vrtačnik P, Preželj J, et al. MiR-148a the epigenetic regulator of bone homeostasis is increased in plasma of osteoporotic postmenopausal women. *Wien Klin Wochenschr* 2016; 128(7): 519–26.
76. Cao M-Q, Chen D-H, Zhang C-H, Wu Z-Z. Screening of specific microRNA in hippocampus of depression model rats and intervention effect of Chaihu Shugan San. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2013; 38(10): 1585–9.
77. Ling W, Xu X, Liu J. A causal relationship between the neurotherapeutic effects of miR182/7a and decreased expression of PRDM5. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 490(1): 1–7. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X17310410> Dostop: 11.11.2017.
78. Hu C-H, Sui B-D, Du F-Y, Shuai Y, Zheng C-X, Zhao P, et al. miR-21 deficiency inhibits osteoclast function and prevents bone loss in mice. *Sci Rep* 2017; 7: 43191. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28240263> Dostop: 11.11.2017.
79. Panach L, Mifsut D, Tarín JJ, Cano A, García-Pérez MÁ. Serum Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture. *Calcif Tissue Int* 2015; 97(5):495–505. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26163235> Dostop: 11.11.2017.
80. Wu T, Zhou H, Hong Y, Li J, Jiang X, Huang H. miR-30 Family Members Negatively Regulate Osteoblast Differentiation. *J Biol Chem* 2012; 287(10): 7503–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253433> Dostop: 12.11.2017.

81. Zaragozi L-E, Wdziekonski B, Brigand K Le, Villageois P, Mari B, Waldmann R, et al. Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol* 2011; 12(7): R64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767385> Dostop: 12.11.2017.
82. Kocjan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R, et al. Circulating microRNA Signatures in Patients With Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(11): 4125–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27552543> Dostop: 11.11.2017.
83. Kelch S, Balmayor ER, Seeliger C, Vester H, Kirschke JS, van Griensven M. miRNAs in bone tissue correlate to bone mineral density and circulating miRNAs are gender independent in osteoporotic patients. *Sci Rep* 2017; 7(1): 15861. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29158518> Dostop: 2.1.2017.
84. Cheng P, Chen C, He H-B, Hu R, Zhou H-D, Xie H, et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J Bone Miner Res* 2013; 28(5): 1180–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225151> Dostop: 11.11.2017.
85. Bedene A, Mencej Bedrač S, Ješe L, Marc J, Vrtačnik P, Preželj J, et al. MiR-148a the epigenetic regulator of bone homeostasis is increased in plasma of osteoporotic postmenopausal women. *Wien Klin Wochenschr* 2016; 128(S7): 519–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27900532> Dostop: 11.11.2017.
86. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, et al. Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 2014; 29(8): 1718–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24431276> Dostop: 12.11.2017.
87. Hong L, Zhao X, Shao X, Zhu H. miR-590 regulates WT1 during proliferation of G401 cells. *Mol Med Rep* 2017; 16(1): 247–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28498419> Dostop: 11.11.2017.
88. Ou C, Sun Z, Li X, Li X, Ren W, Qin Z, et al. MiR-590-5p, a density-sensitive microRNA, inhibits tumorigenesis by targeting YAP1 in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2017; 399: 53–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28433598> Dostop: 11.11.2017.
89. EXIQON. miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Instruction manual

v6.2. 2016.

90. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 2009; 67(1): 6–20.
91. Cawthon PM. Gender differences in osteoporosis and fractures. *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469(7): 1900–5.
92. Hutchinson ML. Nutrition and Aging. Academic Press 2012; 310.
93. Sheikholeslami H, Sotodeh M, Javadi A, Nasirian N, Kazemifar AM, Abbasi M. Relationship between Bone Mineral Density and Maturity Index in Cervical Smears, Serum Estradiol Levels and Body Mass Index. *Glob J Health Sci* 2013; 5(6): 209–13.
94. El Maghraoui A, Rezqi A, El Mrahi S, Sadni S, Ghozlani I, Mounach A. Osteoporosis, vertebral fractures and metabolic syndrome in postmenopausal women. *BMC Endocr Disord* 2014; 14(1): 93. <http://bmcedendocrdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6823-14-93>.
95. Ji M-X, Yu Q. Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic Dis Transl Med* 2015; 1(1): 9–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29062981> Dostop: 9.1.2018.
96. Zhao L-J, Liu Y-J, Liu P-Y, Hamilton J, Recker RR, Deng H-W. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(5): 1640–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299077> Dostop: 9.1.2018.
97. 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): 553–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231354> Dostop: 11.11.2017.
98. Weilner S, Skalicky S, Salzer B, Keider V, Wagner M, Hildner F, et al. Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* 2015; 79: 43–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026730> Dostop: 12.11.2017.
99. Hu C-H, Sui B-D, Du F-Y, Shuai Y, Zheng C-X, Zhao P, et al. miR-21 deficiency inhibits osteoclast function and prevents bone loss in mice. *Sci Rep* 2017; 7: 43191. Dostop: 11.11.2017.
100. Pitari MR, Rossi M, Amodio N, Botta C, Morelli E, Federico C, et al. Inhibition of miR-21 restores RANKL/OPG ratio in multiple myeloma-derived bone marrow stromal cells and impairs the resorbing activity of mature osteoclasts. *Oncotarget*

- 2015; 6(29): 27343–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160841> Dostop: 28.11.2017.
101. Mencej Bedrač, Simona; Ostanek, Barbara; Mlakar, Vid; Zupan, Janja; Kocjan, Tomaž; Preželj, Janez; Marc J. Up-to-date insight on the development of osteoporosis. Farm Vestn 2012; 269-278. http://ricinus2.mf.uni-lj.si/bs/neva.exe?name=bs_cx_f_en&e=id=166887.
 102. Sun M, Zhou X, Chen L, Huang S, Leung V, Wu N, et al. The Regulatory Roles of MicroRNAs in Bone Remodeling and Perspectives as Biomarkers in Osteoporosis. Biomed Res Int 2016; 2016: 1652417. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27073801> Dostop: 28.11.2017.
 103. Zhu S, Yao F, Qiu H, Zhang G, Xu H, Xu J. Coupling factors and exosomal packaging microRNAs involved in the regulation of bone remodelling. Biol Rev 2017. <http://doi.wiley.com/10.1111/brv.12353>.
 104. Wu M, Chen G, Li Y-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. Bone Res 2016; 4: 16009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27563484> Dostop: 28.11.2017.
 105. Yang L, Cheng P, Chen C, He H-B, Xie G-Q, Zhou H-D, et al. miR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization. J Bone Miner Res 2012; 27(7): 1598–606. <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.1621> Dostop: 28.11.2017.
 106. Felber K, Elks PM, Lecca M, Roehl HH. Expression of osterix Is Regulated by FGF and Wnt/ β -Catenin Signalling during Osteoblast Differentiation. Kim J-E, editor. PLoS One 2015; 10(12): e0144982. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0144982> Dostop: 28.11.2017.
 107. Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. Gene 2012; 492(1): 1–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079544> Dostop: 28.11.2017.

8 PRILOGE

Priloga 1: Vrednosti normaliziranih cq izbranih miRNA v vzorcih

	miRN A 21	miRNA 93	miRNA 576	miRNA 590	miRNA 125b	miRNA 148a	miRNA 30d	miRNA 7a
Vzorec								
18	-0.395	-0.378	-1.218	0.215	-2.243		1.393	6.715
21	3.835	3.523	0.892	3.395	2.763	4.575	2.253	10.545
22	4.510	3.482	1.013	4.445	2.358	2.995	3.218	6.295
23	1.135	2.787	0.337	10.955	2.767	0.040	0.127	8.530
25	4.635	2.958	1.583	2.490	3.523	-0.825	2.598	7.675
26	4.905	2.878	4.868	3.745	3.708		2.818	10.735
28	4.945	1.753	3.028	3.620	2.903	-1.275	1.923	13.050
29	4.185	2.683	2.853	3.475	2.808	-1.045	2.913	8.425
30	3.485	4.023	2.853	3.615	3.418	1.340	1.633	6.330
31	4.990	3.278	5.913	3.685	4.203	3.615	2.168	9.795
33	4.995	4.728	3.763	4.390	4.148	-0.275	2.413	9.960
34	5.330	4.558	6.108	4.355	4.768	-2.400	3.218	12.805
35	7.750	3.713	2.322	4.600	4.118	5.550	1.378	10.560
37	5.030	2.673	2.523	4.495	3.413	3.125	1.518	10.485
38	5.245	2.778	2.623	3.375	3.383	0.770	1.548	12.505
39	4.755	2.558	2.148	3.940	2.343	2.845	1.688	8.515
42	6.610	4.333	11.143	7.555	4.538	2.160	4.213	9.855
43	6.025	3.513	1.698	4.570	3.663	3.355	3.613	8.145
46	5.580	4.523	2.403	4.985	3.163	1.550	2.753	9.910
47	5.125	4.677	3.003	4.455	3.308	-0.885	2.818	6.970
52	5.855	4.173	3.908	4.160	1.933	2.440	3.443	8.390
53	5.505	4.138	5.867	4.985	3.428		4.118	7.385
	12.23							
55	5	2.443	1.618	3.125	3.613	-0.385	1.938	7.260
56	7.010	3.168	4.782	5.095	4.273	2.415	2.698	6.705
57	5.705	3.998	4.588	6.080	4.253	2.685	2.638	5.060
58	5.595	4.163	4.163	5.860	3.688	2.415	2.643	8.355
60	5.175	3.428	3.008	3.910	-6.163	0.545	1.523	2.595
62	5.545	3.608	3.818	4.765	5.033	4.645	3.103	8.835
63	5.030	3.723	5.718	3.850	4.668	-0.105	2.688	5.625
64	4.435	1.373	2.658	2.695	2.913	-0.710	2.523	4.535
65	4.195	2.853	4.778	4.930	4.008	-1.165	1.838	5.420
66	4.845	1.213	0.472	3.420	3.283	-3.190	1.228	8.160
67	6.180	6.033	3.422	9.060	5.503	0.770	2.293	7.720
68	5.435	4.463	4.467	7.195	10.328	-0.450	1.753	11.405
69	4.960	5.598	1.428	9.495	5.198	-1.460	1.773	5.970
71	6.830	2.008	1.413	2.735	2.308	-0.140	1.468	5.090
73	5.540	3.128	1.423	4.175	3.448	0.195	2.153	6.760
74	5.645	1.912	0.662	3.185	2.813	-2.930	1.898	5.535

75	6.300	4.088	6.952	4.805	3.418	1.090	2.403	6.500
76	9.090	2.543	4.888	3.865	2.443	-2.715	2.953	6.170
77	2.740	1.928	1.118	3.115	2.208	0.070	1.683	5.390
78	5.760	4.178	-7.708	3.940	4.738	3.065	2.573	8.535
79	6.110	3.193	3.088	4.180	4.153	0.720	2.963	7.335
80	4.555	1.688	3.532	4.555	3.753	2.640	1.933	6.165
81	6.075	3.142	4.668	3.595	3.868	1.815	2.783	6.595
	12.20							
83	0	2.878	2.113	3.600	4.518	0.865	2.538	6.915
85	4.010	3.043	0.987	3.890	2.293	-0.505	1.758	4.220
86	4.640	1.717	2.847	2.295	2.013	-4.535	1.238	4.875
87	5.075	2.853	1.318	5.020	2.883	-3.165	2.043	6.025
89	4.120	3.438	4.708	5.385	3.713	-3.215	2.078	4.585
90	5.960	4.228	2.287	5.275	4.148	2.525	2.443	5.585
91	2.550	2.468	-0.363	1.815	1.933	2.895	2.368	2.360
93	3.090	3.273	0.902	3.945	4.643	-3.980	1.893	4.370
94	4.745	3.943	4.577	2.340	4.653	0.215	1.728	4.810
96	4.345	3.528	3.193	5.550	3.588	-2.925	2.398	5.035
97	3.090	3.028	1.248	3.815	4.528	-3.495	1.433	4.575
98	5.055	3.233	1.998	2.560	-6.738	-2.405	2.233	4.560
99	6.910	4.972	2.887	6.425	6.513	-4.220	3.233	9.050
101	2.325	-0.593	-0.883	1.215	2.163	-4.155	0.973	3.370
102	2.835	1.508	-0.663	2.300	1.913	-6.420	1.213	3.415
103	2.300	1.933	-0.078	2.060	2.413	-6.030	0.463	2.560
105	4.425	3.298	1.133	4.390	4.273	-3.465	1.428	4.290
106	2.560	1.988	1.357	5.685	2.493	-1.410	0.852	2.955
107	5.635	4.608	-0.418	6.255	8.083	0.570	2.118	4.880
108	2.210	2.143	-1.518	3.915	2.053	-3.175	-0.182	2.400
109	3.195	0.697	0.047	3.125	2.033	-1.025	1.158	4.080
110	4.150	3.048	5.248	3.300	3.313	-3.015	0.748	5.085
112	3.905	0.572	1.183	4.220	1.968	-3.720	1.533	3.080
113	0.795	2.513	-1.178	2.775	2.023	-5.805	-1.203	1.450
115	3.185	1.988	3.278	8.110	2.223	-0.455	0.623	3.395
116	1.980	1.392	-1.213	2.195	2.278	-3.175	-0.017	2.145
117	2.560	1.288	0.587	2.150	1.983	-2.295	-0.832	1.575
119	5.000	-0.653	-1.248	0.385	1.863	-6.515	-0.858	0.760
121	1.330	1.737	-0.913	1.135	2.343	-3.165	-0.108	0.020
123	2.255	1.233	-0.568	2.705	4.138	-4.960	-0.802	1.555
125	1.865	2.968	0.062	3.230	3.898	-3.950	0.633	1.335
127	3.390	2.413	1.842	4.490	4.513	-4.760	0.938	3.295
128	2.760	4.023	0.263	4.020	4.553	-5.325	-0.612	3.135
129	3.370	2.682	-0.393	4.875	3.983	-2.855	0.317	2.735
130	3.455	3.393	-0.708	4.520	3.773	-1.230	-0.212	1.585
135	3.405	3.313	4.033	5.520	2.988	-0.210	-0.227	1.950
136	1.998	1.450	1.432	1.523	2.258	6.093	1.843	3.043
137	2.928	2.415	2.062	2.678	1.658	-1.328	1.363	4.963

138	1.108	0.800	-0.773	1.003	0.928	-1.878	1.243	3.303
139	2.933	1.610	0.712	1.717	1.308	-2.528	1.517	3.447
140	2.553	2.405	1.057	2.133	2.468	-1.953	1.883	3.863
143	0.322	0.205	-1.483	-0.138	-0.458	-1.423	0.352	0.832
146	-0.223	-0.345	-1.518	0.493	0.278	-5.103	0.468	1.508
148	1.473	1.175	0.517	1.338	1.563	-3.433	0.972	2.263
151	1.683	1.150	-0.398	2.038	1.533	-3.798	1.563	2.858
153	1.092	1.050	-0.223	1.912	1.303	0.252	1.722	2.918
155	3.603	3.095	2.007	3.128	2.798	8.033	1.213	4.803
156	0.262	1.165	0.537	0.817	1.083	-4.253	-0.018	0.922
157	0.607	1.165	0.467	0.862	0.993	-2.853	1.908	2.163
158	-0.383	0.180	-0.733	0.087	-2.098	-5.808	0.747	2.173
159	2.188	1.625	0.932	2.423	1.568	-2.183	1.487	2.988
161	0.992	1.105	-0.198	0.872	1.412	-3.558	2.228	2.487
163	2.467	1.250	0.897	1.993	1.093	-2.643	1.758	3.223
164	2.057	3.200	1.807	3.108	1.733	1.883	1.732	2.713
165	1.063	0.385	-0.518	0.272	-0.283	-4.648	0.902	0.487
166	1.693	2.670	1.607	2.107	0.802	-2.153	1.963	3.353
168	0.887	3.220	3.177	2.748	1.508	-2.103	1.358	3.433
169	1.303	2.690	1.177	1.878	2.003	-1.413	1.473	3.233
170	2.168	2.020	-0.388	1.863	1.353	-3.343	2.238	2.863
171	0.127	0.210	-0.993	-0.248	-0.273	-5.593	0.897	0.852
172	2.123	1.830	1.697	1.448	1.833	0.043	1.193	2.618
174	-0.378	-0.420	-0.723	-0.903	0.822	-5.808	0.357	1.003
175	1.193	0.895	-0.233	1.403	1.273	-3.848	0.982	2.618
176	0.042	-1.900	-2.578	-1.003	-0.322	-6.188	-0.723	0.768
177	-0.353	-0.315	-1.153	-0.083	0.732	-5.913	0.242	0.047
178	1.323	0.915	-0.678	1.093	0.982	-4.823	0.537	2.023
179	-0.203	0.550	0.522	0.692	-0.458	-5.953	0.242	2.108
180	-1.033	0.495	-2.213	0.967	0.397	-5.983	0.372	0.397
187	-0.693	-0.530	-2.153	-0.363	-0.423	-6.923	-0.638	0.242
188	-1.203	0.140	-0.318	0.472	0.328	-5.413	-0.243	0.217
189	4.038							
191	-0.493	0.340	0.222	0.742	0.723	-4.483	0.452	1.673
192	-1.898	-1.450	-1.648	-1.573	-0.843	-1.568	0.727	-0.243
193	-1.633	-1.460	-3.238	-1.268	-1.028	-6.503	0.032	-1.503
196	1.013	1.185	0.542	1.363	1.793	1.798	1.463	2.533
198	0.627	-0.050	0.977	1.463	0.653	-4.023	0.852	2.158
199	1.743	1.785	1.172	2.433	1.783	-2.008	1.578	4.688
200	-2.223	-2.545	-1.018	-1.623	-0.848	-6.218	-0.333	-0.168
201	-0.063	-0.550	-0.438	0.277	0.967	-5.518	0.667	1.883
203	1.233	1.275	0.872	1.488	1.648	-1.563	1.393	3.848
204	2.563	2.285	3.012	2.388	2.728	-1.998	2.843	3.158
205	2.293	1.960	2.697	2.522	2.843	-3.838	1.548	3.313
206	-1.618	-0.745	0.282	-0.233	-1.338	-7.143	0.717	0.637
207	0.743	0.695	-0.413	1.103	-0.648	-7.223	1.133	1.293

208	0.777	0.400	0.537	0.472	1.353	-5.478	0.712	0.397
209	2.013	0.640	0.372	1.662	2.093	-5.408	1.658	1.658
210	0.897	-0.705	-1.723	1.108	-0.317	-6.743	1.088	0.883
211	1.583	-0.805	-1.403	0.637	0.052	-5.973	-0.048	0.628
212	1.653	-0.205	-1.128	1.033	1.068	-5.948	0.542	2.203