UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Hradci Králové

MikroRNA jako biomarkery a regulátory senescence a osteoporózy

Květa Vrablíková

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Klinická biochemie

Hradec Králové

2026

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Klinická biochemie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: PhDr. Květa Vrablíková, MBA
Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta University Karlovy v Hradci Králové

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Palička, Ph.D., dr. h. c.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta University Karlovy v Hradci Králové

Konzultant: Ing. Helena Párová, Ph.D.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta University Karlovy v Hradci Králové

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Klinické biochemie dne 17. 3. 2026 Hradci Králové od 11.30 hod.

Tato práce vznikla za podpory Cooperatio Programu, výzkumná oblast DIAG a MH CZ – DRO (UHHK, 00179906).

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

doc. MUDr. Radomír Hyšpler, Ph.D.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací

v doktorském studijním programu Klinická biochemie

Garant studijního programu

1. OBSAH

1. OBSAH 3
2. SOUHRN 5
3. SUMMARY 6
4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY 7
   - Osteoporóza 7
   - Diagnostika osteoporózy 7
   - Kostní remodelace 8
   - Senescence 8
   - RNA a nekódující transkriptom 9
   - MikroRNA – základní údaje 9
5. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE 10
   - Obecný cíl 10
   - Specifické cíle 10
6. MATERIÁL A METODIKA 11
   - Design studie 11
   - Studijní populace 11
   - Sběr vzorků kostí 11
   - Homogenizace vzorků kostí a izolace RNA 12
   - Panel miRNA související s osteoporózou 12
   - Kvantitativní real-time PCR mikroRNA 12
   - Statistické analýzy 13
7. VÝSLEDKY 14
   - Vstupní charakteristiky souboru 14
   - Analýza exprese mikroRNA v lidské kostní tkáni 14
   - Nezávislé asociace mezi expresí miRNA a klinickými parametry 15
8. DISKUZE 16
   - Základní vstupní charakteristiky souboru 16
   - Markery kostního obratu sledovaného souboru 17
   - Integrace molekulárních a klinických dat 17
   - Biologický význam deregulovaných kandidátních miRNA 18
9. ZÁVĚRY 18
10. POUŽITÁ LITERATURA 20
11. PŘEHLED PUBLIKACÍ 25

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

Ostatní práce v impaktovaném časopise

Ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

Další odborné práce autora

2. SOUHRN

Osteoporóza je onemocnění často spojené se stárnutím, které je charakterizováno poruchou kostní remodelace a buněčnou senescencí. MikroRNA představují důležité regulátory těchto procesů. Cílem práce bylo identifikovat se senescencí asociované miRNA v kostní tkáni pacientů s osteoporózou a zhodnotit jejich vztah ke klinickým parametrům.

Do jednocentrické průřezové studie bylo zařazeno 46 pacientů podstupujících totální endoprotézu kyčelního kloubu, z toho 21 s osteoporotickou frakturou (OP) a 25 s osteoartrózou bez fraktury jako kontrolní skupina. Z bioptických vzorků krčku femuru byla izolována RNA a pomocí qRT-PCR analyzován předdefinovaný panel 11 miRNA spojených se senescencí a osteoporózou. Exprese byla hodnocena pomocí ΔCt, relativních hladin exprese (2^−ΔCt), relativních změn exprese (fold change; 2^−ΔΔCt), t-testu, korelací a zobecněných lineárních modelů (GLM).

V základní analýze byla v OP skupině signifikantně upregulována miR-106a-5p, zatímco miR-34a-5p, miR-218-5p a miR-155-5p byly signifikantně downregulovány; miR-92a-3p vykazovala pouze trend k upregulaci a miR-181a-5p trend k downregulaci. Po adjustaci na klinické parametry v GLM zůstala miR-106a-5p nezávisle pozitivně asociována s osteoporózou, zatímco miR-34a-5p a miR-218-5p vykázaly nezávislou negativní asociaci; po adjustaci se rovněž prokázala nezávislá pozitivní asociace miR-92a-3p a negativní asociace miR-181a-5p s osteoporózou.

Síťová analýza ukázala, že deregulované miRNA cílí na geny zapojené do odpovědi na poškození DNA a regulace buněčného cyklu (*ATM, AURKA, CUX1, ALDH9A1, AGO1/AGO4)*, tedy klíčové komponenty drah ATM–p53–p21 a p16–CDK4/6–RB podílejících se na senescenci kostní tkáně.

Zásadní přidanou hodnotou této studie je analýza expresních profilů miRNA přímo z biopsií lidské kostní tkáně u jednoho z největších dosud publikovaných souborů pacientů. Studie umožňuje přímé propojení molekulárních nálezů s klinickými parametry onemocnění. Poskytuje tak biologicky vysoce relevantní vhled do molekulárních mechanismů osteoporózy přímo v lidské kostní tkáni a eliminuje omezení spojená s extrapolací dat ze zvířecích modelů nebo periferních biologických materiálů.

3. SUMMARY

MicroRNAs as Biomarkers and Regulators of Senescence and Osteoporosis

Osteoporosis is an age-related disease characterized by impaired bone remodeling and cellular senescence. MicroRNAs represent important regulators of these processes. The aim of this study was to identify senescence-associated miRNAs in the bone tissue of patients with osteoporosis and to evaluate their relationships with clinical parameters.

A total of 46 patients undergoing total hip arthroplasty were included in this single-center cross-sectional study, comprising 21 patients with osteoporotic fracture (OP) and 25 patients with osteoarthritis without fracture as a control group. RNA was isolated from femoral neck bone biopsy specimens, and a predefined panel of 11 miRNAs associated with senescence and osteoporosis was analyzed using qRT-PCR. Expression was evaluated using ΔCt values, relative expression levels (2^−ΔCt), relative changes in expression (fold change; 2^−ΔΔCt), t-tests, correlation analyses, and generalized linear models (GLM).

In the primary analysis, miR-106a-5p was significantly upregulated in the OP group, whereas miR-34a-5p, miR-218-5p, and miR-155-5p were significantly downregulated; miR-92a-3p showed only a trend toward upregulation, and miR-181a-5p showed a trend toward downregulation. After adjustment for clinical parameters in the GLM, miR-106a-5p remained independently positively associated with osteoporosis, whereas miR-34a-5p and miR-218-5p showed independent negative associations; after adjustment, an independent positive association of miR-92a-3p and an independent negative association of miR-181a-5p with osteoporosis were also demonstrated.

Network analysis revealed that deregulated miRNAs target genes involved in the DNA damage response and cell-cycle regulation (ATM, AURKA, CUX1, ALDH9A1, AGO1/AGO4), representing key components of the ATM–p53–p21 and p16–CDK4/6–RB pathways implicated in bone tissue senescence.

A key added value of this study is the analysis of miRNA expression profiles directly from human bone tissue biopsies in one of the largest patient cohorts published to date. The study enables direct linkage of molecular findings with clinical parameters of the disease. It therefore provides a biologically highly relevant insight into the molecular mechanisms of osteoporosis directly in human bone tissue and eliminates limitations associated with extrapolation of data from animal models or peripheral biological materials.

4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Osteoporóza

Osteoporóza je chronické systémové metabolické onemocnění kostí charakterizované úbytkem kostní hmoty, porušením mikroarchitektury a zhoršením kvality kostní tkáně, což vede ke zvýšenému riziku nízkotraumatických zlomenin. Nejzávažnější jsou zlomeniny obratlů a proximálního femuru, které jsou spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou. Onemocnění dlouho probíhá bez příznaků a prvním projevem bývá často až zlomenina, přestože je osteoporóza dobře diagnostikovatelná, léčitelná a z velké části preventabilní [1, 2, 3]. Celosvětově se odhaduje, že zlomeninu související s osteoporózou utrpí 1 ze 3 žen a 1 z 5 mužů nad 50 let [4]. Osteoporotické zlomeniny významně snižují kvalitu života seniorů, prodlužují hospitalizaci a zvyšují riziko invalidity i ztráty soběstačnosti [5, 6, 7]. Základním diagnostickým nástrojem je měření kostní minerální denzity (BMD) metodou dvouenergiové rentgenové absorpciometrie (DXA), nicméně BMD odráží pouze část celkového rizika fraktury; pacienti s recentní zlomeninou jsou ve velmi vysokém riziku opakované fraktury nezávisle na výchozím T-skóre [8, 9].

Rizikové faktory osteoporózy zahrnují neovlivnitelné faktory (věk, ženské pohlaví, pozitivní rodinná anamnéza fraktury proximálního femuru, prodělané nízkotraumatické fraktury po 50. roce věku, opakované pády) a ovlivnitelné faktory (nízké BMI, snížená mobilita, kouření, abusus alkoholu, deficit vitaminu D, nízký příjem vápníku, hyponatrémie jako marker špatného celkového zdravotního stavu) [9, 10].

Nízkotraumatická (osteoporotická) zlomenina je klinicky definována jako zlomenina vzniklá při minimálním traumatu, při němž by u zdravého jedince ke zlomenině nedošlo. Nejčastější jsou fraktury obratlů, proximálního femuru, proximálního humeru a distálního předloktí; vertebrální fraktury jsou navíc významně poddiagnostikovány. Nerozpoznané zlomeniny následně zvyšují riziko dalších fraktur, z nichž nejzávažnější jsou zlomeniny proximálního femuru [10, 11].

Diagnostika osteoporózy

Diagnostika osteoporózy zahrnuje cílenou anamnézu, klinické vyšetření včetně hodnocení ztráty výšky a zobrazovací metody. Pro odhad desetiletého rizika fraktury se běžně používá nástroj FRAX. Výstupem kalkulátoru FRAX je percentuální vyjádření desetiletého rizika zlomeniny jednak proximálního konce kosti stehenní, jednak některé z hlavních osteoporotických zlomenin [12, 13].

Zobrazovací metody zahrnují skiagrafii páteře při podezření na kompresivní zlomeninu a zejména DXA jako zlatý standard. Diagnostická klasifikace je standardně založena na T-skóre (norma, osteopenie, osteoporóza). Součástí diagnostiky jsou laboratorní testy: základní biochemie (ionty, jaterní testy, krevní obraz, kreatinin, celková bílkovina), tyreoidální

hormony, 25(OH) vitamin D a markery kostní remodelace, zejména CTX-I (resorpce) a P1NP spolu s ALP-KI (formace) [8, 12].

Kostní remodelace

Kost je metabolicky aktivní orgán, jehož homeostáza je udržována rovnováhou mezi resorpcí a tvorbou kosti. Remodelaci řídí především osteoklasty, osteoblasty a osteocyty a probíhá cyklicky ve fázích aktivace, resorpce, reverze a tvorby [14]. Osteoklasty jsou vícejaderné buňky monocytárně-makrofágové linie, jejichž diferenciace a aktivita je regulována osou RANKL–RANK za podpory M-CSF; klíčovým inhibičním regulátorem je osteoprotegerin (OPG) působící jako „decoy" receptor pro RANKL [15, 16, 17]. Osteoblasty podporují tvorbu nové kostní matrix a zajišťují její mineralizaci. Osteoblasty se diferencují z mezenchymálních kmenových buněk, jejich diferenciaci podporuje WNT signalizace a transkripční faktory Runx2 a osterix; WNT je inhibována sklerostinem a DKK1 [18]. Osteocyty jsou dlouhověké mechanosenzorické buňky uložené v mineralizované matrix; produkují RANKL a zároveň sklerostin a DKK1, čímž významně ovlivňují osteoklastogenezi i osteoblastickou aktivitu [19]. S věkem dochází k postupnému úbytku trabekulární i kortikální kosti, k poruchám mikroarchitektury, ke změnám lakunárně-kanálkového systému a k omezení mechanosenzorické odpovědi osteocytů. K úbytku kostní hmoty přispívá také pokles pohlavních steroidů, změny hormonální regulace, snížení WNT signalizace a nárůst adipozity kostní dřeně [20, 21]. Významnou roli v regulaci remodelace a diferenciace buněk kostní tkáně hrají i mikroRNA, které mohou ovlivňovat osteoblastickou diferenciaci (včetně regulace Runx2) i osteoklastogenezi [22].

Senescence

Buněčná senescence byla popsána Hayflickem a Moorheadem jako stav ireverzibilní zástavy buněčného cyklu, typicky ve fázi G1, při zachované životaschopnosti a metabolické aktivitě buněk [23, 24]. Senescentní buňky vykazují rozsáhlé změny v expresi genů a sekreční aktivitě a produkují SASP (senescence-associated secretory phenotype), který zahrnuje prozánětlivé cytokiny, chemokiny, růstové faktory a matrix-remodelující enzymy; SASP může být krátkodobě protektivní, avšak při chronické akumulaci senescentních buněk přispívá k perzistujícímu zánětu a tkáňové dysfunkci [25]. Senescence může být replikativní (zkracování telomer) nebo stresem indukovaná (SIPS), např. v důsledku poškození DNA, oxidačního stresu či zánětlivých signálů. Klíčové regulační dráhy zahrnují p53/p21 a p16/RB; aktivace kinázy ATM vede ke stabilizaci p53 a indukci p21, zatímco p16 inhibuje CDK4/6 a zabraňuje fosforylaci RB, čímž se blokuje přechod G1/S [25, 26]. Ve skeletu se senescentní buňky hromadí se stárnutím (age-associated) a mohou se objevovat i v souvislosti s poraněním (injury-related). Bylo popsáno, že senescence spojená se stárnutím je více zprostředkována p16, zatímco při akutním poškození může přechodně dominovat p21. I relativně malý počet senescentních buněk v kosti může prostřednictvím SASP negativně ovlivnit okolní tkáň a přispívat ke zhoršení kvality kosti [25, 26, 27]. Z těchto důvodů se senescentní buňky a SASP uvažují jako terapeutické cíle; pro jakýkoli zásah je však nezbytné porozumět induktorům a biomarkerům stárnutí kosti, včetně deregulace miRNA [27, 28, 29].

RNA a nekódující transkriptom

Výzkum nekódujících RNA ukázal, že lidský genom je z velké části transkripčně aktivní, zatímco pouze menší část transkriptomu je překládána do proteinů. Nekódující RNA (ncRNA) byly původně považovány za „junk“, avšak dnes je zřejmé, že plní zásadní strukturální i regulační funkce. NcRNA se často klasifikují podle délky na dlouhé (lncRNA) a malé (sncRNA), přičemž mezi klíčové regulační sncRNA patří siRNA, piRNA a zejména mikroRNA. Variabilní exprese miRNA a jejich propojení se signálními drahami z nich činí perspektivní biomarkery a potenciální terapeutické cíle i u onemocnění souvisejících se stárnutím, včetně osteoporózy [30, 31].

MikroRNA – základní údaje

MikroRNA jsou krátké nekódující RNA (typicky 19–22 nukleotidů), které regulují genovou expresi na posttranskripční úrovni vazbou na cílové mRNA a následnou inhibicí translace nebo degradací mRNA [30]. Tím ovlivňují diferenciaci, proliferaci, odpověď na stres i buněčnou senescenci. Průlomové objevy miRNA lin-4 a let-7 prokázaly univerzální význam tohoto mechanismu a otevřely oblast RNA interference [31]. Stabilita cirkulujících miRNA v biologických vzorcích dále umožnila jejich využití v klinických studiích a biobankách [32, 33]. Nomenklatura miRNA je standardizovaná: prefix označuje druh (např. hsa), číselné označení reflektuje pořadí objevu, písmena (a/b/c) označují příbuzné izoformy a přípona -3p/-5p určuje, z kterého raménka prekurzoru miRNA vzniká zralá miRNA [34]. Biogeneze miRNA probíhá dominantně kanonickou dráhou: pri-miRNA je v jádře zpracována komplexem Drosha/DGCR8 na pre-miRNA s vlásenkovou strukturou, exportována do cytoplazmy (Exportin-5/Ran-GTP) a dále štěpena enzymem Dicer na miRNA duplex. Funkční vlákno je následně začleněno do komplexu RISC s Argonaute proteinem, který zprostředkovává tlumení cílové mRNA. Vedle kanonické dráhy existují i nekanonické mechanismy, např. miRtrony a agotrony [35, 36]. Rozpoznání cíle je založeno zejména na „seed region“ (nukleotidy 2–8). Jedna miRNA může regulovat řadu různých cílů a jedna mRNA může být současně cílem více miRNA, což zásadně zvyšuje komplexitu interpretačních závěrů a vyžaduje integraci molekulárních dat s patofyziologickým kontextem [35, 36, 37].

5. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Obecný cíl

Cílem práce je identifikovat miRNA spojené se senescencí, které jsou přítomné v kostní tkáni pacientů s osteoporózou, a zhodnotit jejich patofyziologický význam a potenciální klinickou využitelnost jako markerů buněčné senescence u osteoporózy.

Specifické cíle

A. Molekulární analýza lidské kostní tkáně – identifikace se senescencí a osteoporózou asociovaných miRNA:

Cílem je identifikovat v kostní tkáni pacientů s osteoporózou deregulované miRNA spojené se senescencí a vyhodnotit jejich možnou roli v kostní tkáni pacientů s osteoporózou.

B. Analýza vztahu miRNA a klinických parametrů osteoporózy:

Cílem je zjistit, zda deregulované se senescencí asociované miRNA v lidské kostní tkáni korelují s klinickými charakteristikami pacientů s osteoporózou (věk, pohlaví, kouření, BMD, BMI, markery kostního obratu, přítomnost zlomenin) ve srovnání s kontrolní skupinou.

6. MATERIÁL A METODIKA

Design studie

Studie byla koncipována jako jednocentrická průřezová observační studie a byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (201905 S10P). Schválený protokol zahrnoval odběr krve v rámci předoperačního vyšetření a odběr bioptického vzorku z krčku femuru po jeho vynětí během operace. Všichni účastníci před zařazením do studie podepsali informovaný souhlas. Riziko zlomenin bylo hodnoceno pomocí dotazníku FRAX vyplněného na základě údajů od pacientů. Biopsie krčku femuru byly prováděny u pacientů podstupujících totální endoprotézu kyčelního kloubu buď pro osteoporózu manifestovanou nízkotraumatickou frakturou proximálního femuru, nebo z elektivních indikací, zejména pro osteoartrózu.

Studijní populace

Účastníci (N = 46) byli zařazováni na ortopedickém oddělení Pardubické nemocnice v letech 2020 až 2022. Postmenopauzální ženy a muži ve věku 49–88 let (průměr ± SD věk: 70,4 ± 7,8 let), kteří byli indikováni k totální endoprotéze kyčelního kloubu, byli rozděleni do dvou skupin dle indikace jejich operace (Obr. 8.): (1) Pacienti se zlomeninou proximálního femuru vyvolanou nízkým traumatem (osteoporotické). Tato skupina byla definována jako OP (n = 21); (2) Pacienti indikováni k elektivnímu chirurgickému zákroku kvůli osteoartróze (bez osteoporotických zlomenin v anamnéze) jako kontrolní skupina (n = 25).

Tyto dvě skupiny byly testovány na základě nulové hypotézy, že mezi nimi neexistuje rozdíl v expresi sady miRNA spojených se stárnutím a osteoporózou. Screening ve studii zahrnoval odběr anamnézy, provedení denzitometrického vyšetření metodou DXA a odběr krve na stanovení biochemických parametrů v séru: kalcia (Ca), fosforu (P), kostního izoenzymu alkalické fosfatázy (ALP-KI), CTX-I, P1NP, kalcidiolu (25-hydroxyvitamin D; 25(OH) vitamin D), celkové bílkoviny, volného tyroxinu (fT4) a tyreostimulačního hormonu (TSH).

Sběr vzorků kostí

Biopsie krčku femuru byly odebrány během implantace totální endoprotézy kyčelního kloubu, což zajistilo, že odběr nepředstavoval pro pacienta žádnou další zátěž. Operační přístup byl v obou skupinách veden anterolaterálním Bauerovým přístupem. Po kapsulotomii byla provedena osteotomie na bázi krčku femuru. Po dokončení osteotomie byla končetina umístěna do addukce, což umožnilo přístup do dřeňové dutiny krčku femuru a hlavice stehenní kosti. U pacientů se zlomeninami byla dřeňová dutina přístupná i bez osteotomie.

Vzorky kostí byly získány pomocí bioptické soupravy s vnitřním průměrem 3 mm s ostrými zuby na špičce. Odebírán byl cylindrický vzorek kosti z krčku femuru. Kost z bezprostřední blízkosti osteotomie byla odstraněna, aby se minimalizovalo riziko mechanického nebo tepelného poškození způsobeného oscilační pilou; vlastní cylindrický vzorek o délce 5–8 mm byl odebrán z centrální části krčku femuru. Odebraný vzorek byl vložen do předem připravené

zkumavky s 1,5 ml činidla TRIzol™ (Invitrogen, Gaithersburg, MD) a uchováván při −80 °C do dalšího zpracování.

Homogenizace vzorků kostí a izolace RNA

Vzorky kostní tkáně byly přeneseny do homogenizačních zkumavek (SeptiFast Lys Kit) obsahujících 850 µl lyzačního činidla QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) a homogenizovány na přístroji MagNA Lyser (Roche) 90 sekund při 7 000 × g. Při nedostatečné homogenizaci byl postup prodloužen o dalších 30 sekund. Zkumavky byly po homogenizaci okamžitě umístěny na zmrazený stojan. Homogenáty byly centrifugovány za účelem odstranění nerozpuštěných částic a buněčných zbytků. Následně bylo 700 µl supernatantu přeneseno do nové mikrozkumavky a inkubováno 5 minut při pokojové teplotě pro úplnou disociaci nukleoproteinových komplexů.

Izolace celkové RNA byla provedena pomocí soupravy miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) dle protokolu výrobce s drobnými úpravami. Tento postup umožňuje efektivní obohacení frakce miRNA a RNA kratších než 200 nukleotidů. K homogenátu bylo přidáno 140 µl chloroformu (chloroform s isoamylalkoholem), vzorek byl promíchán alespoň 15 sekund a inkubován 2–3 minuty při pokojové teplotě. Po centrifugaci 15 minut při 12 000 × g a 4 °C byla vodní fáze opatrně přenesena do nové mikrozkumavky. Následně byl přidán 96% ethanol v objemu 1,5násobku vodní fáze (typicky 525 µl) a směs byla promíchána pipetováním. Z každého vzorku bylo 700 µl směsi naneseno na kolonu a centrifugováno 15 sekund při 8 000 × g při pokojové teplotě; krok byl dvakrát opakován. Poté byla kolona promyta 700 µl pufru RWT a následně 500 µl pufru RPE, vždy s centrifugací 15 sekund při 8 000 × g. RNA včetně frakce miRNA byla eluována v 30 µl vody bez RNáz. Vzorky byly buď ihned dále zpracovány, nebo skladovány při −80 °C.

Koncentrace a čistota izolované RNA byly stanoveny spektrofotometricky pomocí NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) měřením absorbance při 260 a 280 nm a výpočtem poměru A260/280.

Panel miRNA související s osteoporózou

Pro tuto studii byl sestaven panel cílových miRNA, které byly vybrány tak, aby se podílely na procesech relevantních jak pro osteoporózu, tak pro buněčnou senescenci. Výběr byl založen na datech z databáze miRNet a dostupné literatury.

Kvantitativní real-time PCR mikroRNA

Syntéza cDNA byla provedena pomocí TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit s univerzálními reverzně transkripčními primery (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dle protokolu výrobce, s použitím 8–10 ng celkové RNA na reakci. Kvantitativní real-time PCR byla provedena pomocí TaqMan® Fast Advanced Master Mix a specifických TaqMan® Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems) na přístroji Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Byly kvantifikovány maturované sekvence: hsa-let-7g-5p, hsa-miR-15a-3p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-218-5p a hsa-miR-455-3p. Jako endogenní kontroly byly použity hsa-miR-361-5p a hsa-miR-16-5p. Všechny reakce byly provedeny v triplikátech, reakční objem byl 10 µl včetně 2,5 µl vzorku.

Reakční podmínky odpovídaly protokolu výrobce: aktivace enzymu při 95 °C po dobu 20 s, následovaná 40 cykly denaturace při 95 °C po dobu 3 s a nasedání/extenze při 60 °C po dobu 30 s. Fluorescenční data byla vyhodnocena v softwaru Rotor-Gene Q Series Software. Exprese jednotlivých miRNA byla vyjádřena pomocí ΔCt, přičemž normalizace byla provedena vůči hladinám hsa-miR-361-5p a hsa-miR-16-5p. Tento postup byl zvolen v souladu s doporučeními výrobce a dostupnou literaturou pro volbu endogenních kontrol v TaqMan® Advanced miRNA Assays.

Statistické analýzy

Základní charakteristiky souboru byly popsány jako průměr ± směrodatná odchylka (SD). Porovnání středních hodnot mezi skupinou OP a kontrolní skupinou bylo provedeno Studentovým t-testem pro nezávislé výběry. Všechny testy byly dvoustranné a hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

Statistické analýzy exprese miRNA byly provedeny v softwaru STATISTICA, verze 13 (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, USA). Exprese miRNA byla stanovena z hodnot Ct získaných qRT-PCR, přičemž pro další výpočty byla použita průměrná hodnota Ct z triplikátních měření. Normalita rozložení dat byla ověřena pomocí Shapiro–Wilkova testu. Pro porovnání exprese miRNA mezi skupinami byly použity hodnoty ΔCt, přičemž nižší ΔCt odpovídá vyšší expresi. Ke statistickému porovnání ΔCt mezi skupinami byl použit Studentův t-test; nulová hypotéza předpokládala absenci rozdílu v expresi mezi skupinami.

Relativní změny exprese mezi skupinami byly vyjádřeny jako fold change (FC) metodou relativní kvantifikace s použitím vybrané endogenní kontroly. Statisticky významná upregulace byla definována jako $p < 0,05$ a $FC > 2,0$, zatímco statisticky významná downregulace byla definována jako $p < 0,05$ a $FC < 0,5$ ve vztahu ke kontrolní skupině. Pro grafické znázornění změn exprese byly hodnoty FC transformovány na $\log_2(FC)$ a vizualizovány pomocí volcano plotu.

Pro posouzení vztahů mezi expresí miRNA a klinickými parametry byly nejprve provedeny jednorozměrné korelační analýzy. Proměnné s p-hodnotou < 0,25 byly následně zahrnuty do vícerozměrného zobecněného lineárního modelu (GLM), kde byla exprese jednotlivých miRNA považována za závislou proměnnou a klinické charakteristiky souboru za proměnné nezávislé. Věk a příslušnost ke skupině (OP vs. kontrola) byly zahrnuty jako povinné nezávislé proměnné ve všech modelech. Vícerozměrné analýzy byly provedeny v softwaru R Commander a statistická významnost byla stanovena na hladině $p < 0,05$.

7. VÝSLEDKY

Vstupní charakteristiky souboru

Soubor tvořilo 46 pacientů podstupujících totální endoprotézu kyčelního kloubu, z toho 21 pacientů s osteoporózou a osteoporotickou frakturou a 25 pacientů s osteoartrózou bez fraktury jako kontrolní skupina. Průměrný věk pacientů s osteoporózou činil 72 ± 7,29 roku, zatímco v kontrolní skupině to bylo 69 ± 8,06 roku; rozdíl nebyl statisticky významný. Zastoupení žen i mužů bylo mezi skupinami srovnatelné, stejně jako prevalence kuřáctví.

Hodnoty BMI byly u pacientů s osteoporózou statisticky významně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou (27 ± 3,43 vs. 30 ± 4,65 kg/m²). Hodnoty BMD proximálního femuru se mezi skupinami nelišily, což umožnilo posuzovat molekulární a biochemické rozdíly nezávisle na absolutní denzitometrické hodnotě.

Biochemické parametry kostního metabolismu poukázaly na zvýšený kostní obrat u osteoporotické skupiny. Hladiny CTX-I byly u pacientů s osteoporózou signifikantně vyšší a průměrná hodnota přesahovala horní hranici laboratorního referenčního rozmezí, zatímco kontrolní skupina se nacházela v jeho horním pásmu. Hladiny P1NP byly v osteoporotické skupině rovněž vyšší, přičemž průměrná hodnota přesahovala referenční interval, avšak rozdíl mezi skupinami nedosáhl statistické významnosti. Tyto nálezy svědčí pro zvýšený kostní obrat s převahou resorpční složky u osteoporotických pacientů.

Hladiny 25(OH) vitaminu D byly v obou skupinách pod referenčním rozmezím, bez významného rozdílu mezi skupinami. Sérové kalcium bylo u osteoporotické skupiny statisticky významně nižší a průměrná hodnota se nacházela pod dolní hranicí referenčního intervalu, zatímco kontrolní skupina se pohybovala těsně při jeho dolní hranici. Hodnoty fosforu a ALP-KI byly v obou skupinách v rámci referenčních mezí. Hladina celkové bílkoviny byla u pacientů s osteoporózou nižší a pohybovala se těsně pod dolní hranicí referenčního rozmezí.

Endokrinologické parametry ukázaly vyšší hladiny fT4 u pacientů s osteoporózou, přesto se průměrné hodnoty v obou skupinách nacházely v rámci referenčního rozmezí. Hladiny TSH byly mezi skupinami srovnatelné a v normálním rozmezí.

Parametry FRAX se mezi skupinami nelišily, a to jak pro riziko velké osteoporotické zlomeniny, tak pro riziko zlomeniny kontralaterálního krčku femuru. Denzitometrická analýza prokázala u osteoporotické skupiny významně nižší hodnoty T-skóre a Z-skóre v oblasti proximálního femuru, zatímco v oblasti bederní páteře nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Analýza exprese mikroRNA v lidské kostní tkáni

Exprese vybraných miRNA byla analyzována přímo z bioptických vzorků lidské kostní tkáně krčku femuru, což představuje zásadní přidanou hodnotu studie a umožňuje přímé propojení molekulárních nálezů s klinickými charakteristikami pacientů. U části pacientů nebylo možné spolehlivě kvantifikovat expresi některých miRNA zahrnutých v panelu; tyto chybějící

hodnoty nebyly imputovány a daní pacienti nebyli zahrnuti do finálních molekulárních analýz, aby se předešlo zkreslení výsledků v multivariačních modelech.

V základní analýze byly mezi skupinami zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi miR-34a-5p, miR-106a-5p, miR-155-5p a miR-218-5p. U miR-92a-3p a miR-181a-5p nebyla dosažena hranice statistické významnosti, nicméně jejich p-hodnoty naznačovaly trend k rozdílné expresi. Ostatní analyzované miRNA nevykazovaly mezi skupinami významné rozdíly.

Relativní změny exprese byly hodnoceny pomocí metody 2^−ΔΔCt. Nejvýraznější změnu vykazovala miR-106a-5p, která byla u osteoporotických pacientů přibližně čtyřnásobně upregulována. Naopak miR-34a-5p byla výrazně downregulována, s přibližně čtyřnásobně nižší expresí ve srovnání s kontrolní skupinou. Downregulace byla rovněž pozorována u miR-155-5p, miR-181a-5p a miR-218-5p, zatímco ostatní miRNA vykazovaly minimální nebo žádné změny exprese.

Nezávislé asociace mezi expresí miRNA a klinickými parametry

Za účelem identifikace nezávislých vztahů mezi expresí jednotlivých miRNA a klinickými charakteristikami souboru byly nejprve provedeny univariační korelační analýzy. Proměnné s p-hodnotou < 0,25 byly následně zahrnuty do multivariačních zobecněných lineárních modelů. Tento přístup umožnil zohlednit potenciální konfundační faktory a identifikovat skutečně nezávislé asociace. Věk a příslušnost ke skupině byly zahrnuty do všech modelů povinně.

Po multivariační adjustaci nebyly zjištěny žádné nezávislé asociace pro miR-15a-3p, miR-15a-5p, miR-125b-5p, miR-155-5p ani miR-455-3p. Naopak exprese miR-34a-5p vykázala po adjustaci na věk a přítomnost osteoporózy statisticky významnou negativní asociaci s osteoporózou. MiR-106a-5p zůstala i po adjustaci na klinické a biochemické parametry nezávisle pozitivně asociována s osteoporózou. Exprese miR-92a-3p prokázala po multivariační adjustaci pozitivní nezávislou asociaci s osteoporózou. MiR-181a-5p a miR-218-5p vykázaly statisticky významnou negativní nezávislou asociaci s osteoporózou, přičemž u miR-181a-5p byla současně prokázána vazba na markery kostního obratu.

8. DISKUZE

Úplné porozumění patofyziologii osteoporózy je komplexní a vyžaduje integraci poznatků napříč jednotlivými úrovněmi výzkumu, od molekulárních mechanismů až po klinické projevy onemocnění. Samostatná molekulární analýza ani izolované klinické hodnocení neposkytují dostatečně komplexní obraz; klíčové poznatky vznikají až jejich vzájemným propojením. V této práci se podařilo propojit výsledky molekulárních analýz získaných přímo z lidské kostní tkáně s detailními klinickými a biochemickými daty reálných pacientů, což významně zvyšuje vypovídací hodnotu zjištění, a to i s ohledem na velikost analyzovaného souboru.

Základní vstupní charakteristiky souboru

Základní demografické charakteristiky obou sledovaných skupin byly ve většině parametrů dobře vyvážené. Skupiny se nelišily ve věku, zastoupení pohlaví ani v prevalenci kuřáctví, čímž se minimalizuje riziko zkreslení výsledků těmito faktory. Tyto skutečnosti umožňují interpretovat rozdíly v molekulárních a biochemických parametrech jako specificky spojené s přítomností osteoporózy a fraktury, nikoli jako důsledek rozdílného demografického složení souboru.

BMI se ukázalo jako jediný demografický parametr s významným rozdílem mezi skupinami, přičemž pacienti s osteoporózou měli nižší BMI než kontroly. Tento nález je v souladu s dlouhodobě popsaným vztahem mezi tělesnou hmotností a kostní denzitou, kdy vyšší BMI bývá spojeno s vyšší BMD v důsledku mechanického zatížení skeletu a hormonálních faktorů, včetně vyšší periferní konverze estrogenů v tukové tkáni. Současně je však nutné zdůraznit, že protektivní efekt vyšší hmotnosti není univerzální, zejména u starších osob, kde může vyšší BMI maskovat sarkopenii a zhoršenou kvalitu kostní tkáně. V analyzovaném souboru však nižší BMI u osteoporotických pacientů představuje konzistentní nález odpovídající zvýšenému riziku kostní fragility [38, 39].

Přestože absolutní hodnoty BMD proximálního femuru byly mezi skupinami srovnatelné, u pacientů s osteoporotickou frakturou byly zjištěny signifikantně nižší hodnoty T-skóre a Z-skóre v oblasti proximálního femuru. Tento rozpor odráží klinickou realitu, kdy značná část osteoporotických zlomenin vzniká u jedinců s BMD v pásmu osteopenie nebo dokonce v normálním rozmezí. Diagnóza osteoporózy tak nemůže být založena výhradně na absolutní hodnotě BMD, ale musí zohledňovat i klinický kontext a přítomnost nízkotraumatické fraktury [12].

FRAX skóre v tomto souboru neprokázalo rozdíly mezi skupinami a ve většině případů nedosahovalo běžně používaných intervenčních prahů. Tento nález naznačuje, že FRAX mohl u části pacientů podhodnocovat skutečné riziko fraktury, zejména u osob s již manifestní osteoporózou a s faktory, které tento nástroj nezohledňuje, jako je dynamika kostního obratu nebo kvalita kostní mikroarchitektury. Skutečnost, že zvýšené riziko fraktury kyčle nebylo plně reflektováno rozdíly v celkovém FRAX skóre, podtrhuje známá omezení tohoto nástroje [15].

Tyto výsledky společně poukazují na omezenou schopnost samotné denzitometrie a klinických predikčních modelů zachytit skutečné riziko zlomenin. Kostní minerální denzita představuje

pouze jednu složku kostní pevnosti a neodráží změny kvality kostní tkáně, které jsou řízeny na buněčné a molekulární úrovni a úzce souvisejí s procesy buněčné senescence.

Markery kostního obratu sledovaného souboru

Interpretace markerů kostního obratu vyžaduje zohlednění věku sledované populace. Běžně používané laboratorní referenční intervaly, definované pro široké věkové rozpětí dospělé populace, neodrážejí fyziologické změny kostního metabolismu u osob vyššího věku [41]. V analyzovaném souboru byly hladiny CTX-I a P1NP zvýšené ve srovnání s univerzálními referenčními intervaly, což však odpovídá věkovým charakteristikám populace kolem 70 let.

U pacientů s osteoporózou byly hladiny CTX-I výrazně vyšší než u kontrol a přesahovaly horní hranice věkově specifických intervalů, zatímco kontrolní skupina se pohybovala v jejich horním pásmu. Podobný trend byl pozorován i u P1NP. Tyto nálezy svědčí pro zvýšený kostní obrat s dominancí resorpční složky u osteoporotických pacientů a odpovídají klinickému obrazu pacientů s nízkotraumatickou frakturou proximálního femuru.

Integrace molekulárních a klinických dat

U pacientů s osteoporózou vykazovala nejvýznamnější upregulaci miR-106a-5p s FC kolem 4. miR-92a-3p a miR-15a-5p vykazovaly tendenci k upregulaci s hodnotami FC mírně nad 1. Naproti tomu miR-34a-5p byla silně downregulována, s FC blízkou 0,25, což ukazuje na 4krát nižší expresi ve skupině OP ve srovnání s kontrolou. miR-155-5p, miR-181a-5p a miR-218-5p byly downregulovány méně, s hodnotami FC 0,33, 0,49 a 0,41.

Minimální či žádnou deregulaci vykazovaly let-7g-5p, miR-15a-3p, miR-125b-5p a miR-455-3p, bez statisticky významných změn v expresi mezi OP a kontrolní skupinou.

Po stanovení expresních profilů miRNA byla jejich exprese hodnocena ve vztahu ke klinickým a biochemickým parametrům pomocí multivariačních modelů. Tento přístup umožnil identifikovat nezávislé asociace, které nejsou vysvětlitelné pouze věkem, BMD nebo markery kostního obratu. Zatímco univariační analýza nám přinesla přehled o rozdílech mezi skupinami, multivariační GLM umožnila odlišit miRNA, které skutečně nesou nezávislou informaci o patofyziologii osteoporózy.

Výsledky ukazují, že miR-106a-5p a miR-92a-3p jsou u pacientů s osteoporózou po fraktuře upregulovány a vykazují pozitivní nezávislou asociaci s osteoporózou. Naopak miR-34a-5p, miR-181a-5p a miR-218-5p jsou downregulovány a jejich exprese vykazuje inverzní vztah k osteoporóze, přičemž u miR-181a-5p byla navíc prokázána inverzní vazba na marker kostní resorpce CTX-I. Tyto nálezy podporují hypotézu, že deregulace specifických miRNA odráží nejen přítomnost osteoporózy, ale i aktivaci senescenčních a stresových drah v kostní tkáni.

I přesto, že u downregulované miR-181a-5p byl prokázán inverzní vztah s markerem kostní resorpce CTX-I a tedy můžeme předpokládat vazbu na kostní remodelaci, na základě dostupných dat nelze jednoznačně rozlišit, zda pozorované změny exprese miRNA souvisejí primárně s osteoporózou, nebo zda odrážejí přítomnost nízkotraumatické fraktury. Toto

omezení studie je třeba zohlednit při interpretaci výsledků a představuje oblast pro další výzkum.

Biologický význam deregulovaných kandidátních miRNA

Síťová analýza miRNA–cílový gen provedená v miRNet ukázala robustní propojení mezi deregulovanými miRNA a jejich cílovými geny a identifikovala genové „hub“ uzly regulované více miRNA. Integrační schéma dále znázornilo zapojení kandidátních miRNA do drah odpovědi na poškození DNA a regulace buněčného cyklu, zejména osy ATM–p53–p21 a následné regulace CDK/RB/E2F, včetně stabilizace zástavy buněčného cyklu prostřednictvím p16 a RB represorového komplexu.

Analýza identifikovala několik klíčových cílových genů (AGO1/AGO4, ALDH9A1, AURKA, ATM a CUX1) zapojených do regulace buněčné senescence, odpovědi na stres, buněčného cyklu a osteogenní diferenciace. ATM byl predikovaně propojen s více kandidátními miRNA (miR-106a-5p, miR-218-5p, miR-92a-3p a miR-181a-5p), což odpovídá jeho centrální roli v odpovědi na poškození DNA a indukci buněčné senescence. AGO1 byl v síti propojen s miR-34a-5p, miR-92a-3p, miR-106a-5p a miR-218-5p, zatímco AGO4 s miR-92a-3p, miR-155-5p a miR-181a-5p, což podporuje význam Argonaute proteinů jako síťových uzlů v miRNA-mediované regulaci. ALDH9A1, spojovaný s buněčným metabolismem a odpovědí na stres, byl cílovým genem pro miR-34a-5p, miR-92a-3p, miR-155-5p a miR-181a-5p. AURKA byla predikovaně cílená miR-106a-5p, miR-155-5p a miR-92a-3p a je popisována jako regulátor mitotické aktivity a proliferace. CUX1, transkripční faktor a zásadní represor p16INK4a, byl predikovaně propojen s miR-92a-3p, miR-155-5p a miR-218-5p.

Propojení těchto genů s diferencovaně exprimovanými miRNA podporuje existenci komplexních regulačních okruhů, jejichž narušení může přispívat k poruše kostní homeostázy u osteoporózy, zejména integrací signálů spojených s opravou DNA, oxidačním stresem a regulací osteoblastické aktivity [41, 42, 43, 44, 45].

9. ZÁVĚRY

Ve své disertační práci jsem si vytyčila jednak obecný cíl a dále dva specifické cíle (A a B), které se mi podařilo splnit.

Obecným cílem práce bylo identifikovat miRNA spojené s buněčnou senescencí v kostní tkáni pacientů s osteoporózou a zhodnotit jejich patofyziologický význam a potenciální klinickou využitelnost.

Specifickým cílem A byla identifikace se senescencí a osteoporózou asociovaných miRNA v lidské kostní tkáni. Porovnáním expresních profilů miRNA mezi osteoporotickou a kontrolní skupinou jsem prokázala signifikantní upregulaci miR-106a-5p a signifikantní downregulaci miR-34a-5p, miR-218-5p a miR-155-5p.

Specifickým cílem B byla analýza vztahů mezi expresí miRNA a klinickými parametry osteoporózy. Pomocí univariačních a multivariačních statistických modelů s adjustací na věk, BMD, BMI a markery kostního obratu jsem identifikovala nezávislé pozitivní asociace miR-

106a-5p a miR-92a-3p s osteoporózou a nezávislé negativní asociace miR-34a-5p, miR-218-5p a miR-181a-5p s osteoporózou, zatímco u ostatních analyzovaných miRNA nebyly zjištěny významné nezávislé vztahy.

V rámci mé disertační práce se mi podařilo shromáždit rozsáhlý soubor lidské kostní tkáně, který představuje ojedinělý materiál pro studium molekulárních mechanismů osteoporózy přímo v cílové tkáni. Buněčná senescence i osteoporóza představují aktuální a klinicky relevantní témata v kontextu stárnutí populace. Získané výsledky potvrzují, že molekulární nálezy nelze interpretovat izolovaně bez zohlednění klinických parametrů pacientů, a zdůrazňují význam komplexního přístupu, který propojuje molekulární data s klinickými charakteristikami pacientů.

Současně je nutné reflektovat limity studie. MikroRNA se vyznačují pleiotropním účinkem – jedna miRNA může regulovat více genů a jeden gen může být ovlivňován několika miRNA současně, což nakonec ukázala i síťová analýza provedená pomocí platformy miRNet. Tato komplexita ztěžuje jednoznačný výklad kauzálních vztahů. Další omezení představuje absence longitudinálního sledování změn exprese v čase. Navzdory těmto limitacím představují získaná data významný příspěvek k pochopení molekulárního pozadí osteoporózy a senescenčních procesů v lidské kostní tkáni.

Závěrem lze říci, že tato práce rozšiřuje současné poznatky o úloze miRNA v regulaci procesů spojených se senescencí kostních buněk a osteoporózou. Avšak vzhledem k charakteru studijního designu nelze s jistotou určit, zda zjištěné deregulace miRNA jsou specificky asociovány s osteoporózou, nebo zda jsou ovlivněny přítomností fraktury. Tato skutečnost představuje limitaci studie a vyžaduje další cílené zkoumání. Přesto identifikace specifických deregulovaných miRNA a jejich vazba na klinické charakteristiky pacientů otevírá prostor pro další výzkum v oblasti predikce rizika zlomenin, lepší stratifikace pacientů a vývoje cílených terapeutických přístupů zaměřených na senescenční dráhy. Celkově práce zdůrazňuje nutnost vnímat osteoporózu jako komplexní onemocnění, u něhož je nutné posuzovat molekulární změny v širším klinickém a biologickém kontextu.

10. POUŽITÁ LITERATURA

[1] Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994;843:1-129. PMID: 7941614.

[2] Ferrari S, Reginster JY, Brandi ML, Kanis JA, Devogelaer JP, Kaufman JM, et al. Unmet needs and current and future approaches for osteoporotic patients at high risk of hip fracture. Arch Osteoporos. 2016 Dec;11(1):37. doi: 10.1007/s11657-016-0292-1. Epub 2016 Oct 31. Erratum in: Arch Osteoporos. 2017 Dec;12(1):25. doi: 10.1007/s11657-017-0319-2. PMID: 27800591; PMCID: PMC5306171.

[3] Kroupova K, Palicka V, Rosa J. Monoclonal antibodies for treatment of osteoporosis. Drugs Today (Barc). 2023 Mar;59(3):195-204. doi: 10.1358/dot.2023.59.3.3453905. PMID: 36847627.

[4] Händel MN, Cardoso I, von Bülow C, Rohde JF, Ussing A, Nielsen SM, et al. Fracture risk reduction and safety by osteoporosis treatment compared with placebo or active comparator in postmenopausal women: systematic review, network meta-analysis, and meta-regression analysis of randomised clinical trials. BMJ. 2023 May 2;381:e068033. doi: 10.1136/bmj-2021-068033. PMID: 37130601; PMCID: PMC10152340.

[5] Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. Arch Osteoporos. 2021 Jun 2;16(1):82. doi: 10.1007/s11657-020-00871-9. PMID: 34080059; PMCID: PMC8172408.

[6] Choo YW, Mohd Tahir NA, Mohamed Said MS, Makmor Bakry M. Health-related quality of life in osteoporosis: a systematic review of measurement properties of the QUALEFFO-41. Osteoporos Int. 2024 May;35(5):745-757. doi: 10.1007/s00198-023-07005-0. Epub 2024 Jan 9. PMID: 38194151.

[7] Olshansky SJ. From Lifespan to Healthspan. JAMA. 2018 Oct 2;320(13):1323-1324. doi: 10.1001/jama.2018.12621. PMID: 30242384.

[8] Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY; Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). Executive summary of the European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Calcif Tissue Int. 2019 Mar;104(3):235-238. doi: 10.1007/s00223-018-00512-x. PMID: 30796490; PMCID: PMC6422308.

[9] Kanis JA, McCloskey EV, Harvey NC, Cooper C, Rizzoli R, Dawson-Hughes B, et al. The need to distinguish intervention thresholds and diagnostic thresholds in the management of osteoporosis. Osteoporos Int. 2023 Jan;34(1):1-9. doi: 10.1007/s00198-022-06567-9. Epub 2022 Oct 25. PMID: 36282342.

[10] Pikner R, Palička V, Vyskocil V, Zikán V, et al. Definice osteoporotické (křehké) zlomeniny: stanovisko Společnosti pro metabolická onemocnění skeletu České lékařské společnosti J. E. Purkyně (SMOS ČLS JEP). *Clinical Osteology*. 2020;25(2):83–84.

[11] Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA 3rd, Berger M. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. J Bone Miner Res. 2000 Apr;15(4):721-39. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.4.721. PMID: 10780864.

[12] Společnost pro metabolická onemocnění skeletu České lékařské společnosti J. E. Purkyně (SMOS ČLS JEP). Doporučené postupy pro diagnostiku a léčbu osteoporózy. Praha: SMOS ČLS JEP; 2023. Dostupné z: https://smos.cz/wp-content/uploads/2023/12/doporucene_postupy_osteoporoza_2023.pdf.

[13] Fracture Risk Assessment Tool, FRAX®, © Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, 2023. [cited 2025 Sep 29] Available from: Frax Calculator | FRAXplus®

[14] Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. J Clin Invest. 2003 Apr;111(8):1221-30. doi: 10.1172/JCI17215. PMID: 12697741; PMCID: PMC152939.

[15] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003 May 15;423(6937):337-42. doi: 10.1038/nature01658. PMID: 12748652.

[16] Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 15;97(4):1566-71. doi: 10.1073/pnas.97.4.1566. PMID: 10677500; PMCID: PMC26475.

[17] Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 1998 Apr 17;93(2):165-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81569-x. PMID: 9568710.

[18] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002 Jan 11;108(1):17-29. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00622-5. PMID: 11792318.

[19] Zuo C, Huang Y, Bajis R, Sahih M, Li YP, Dai K, et al. Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. Osteoporos Int. 2012 Jun;23(6):1653-63. doi: 10.1007/s00198-012-1909-x. PMID: 22290242.

[20] Tourkova IL, Larrouture QC, Onwuka KM, Liu S, Luo J, Schlesinger PH, et al. Age-related decline in bone mineral transport and bone matrix proteins in osteoblasts from stromal stem cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2023 Sep 1;325(3):C613-C622. doi: 10.1152/ajpcell.00227.2023. Epub 2023 Jul 31. PMID: 37519232; PMCID: PMC10635645.

[21] Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev. 2000 Apr;21(2):115-37. doi: 10.1210/edrv.21.2.0395. PMID: 10782361.

[22] Loh HY, Norman BP, Lai KS, Cheng WH, Nik Abd Rahman NMA, Mohamed Alitheen NB, et al. Post-Transcriptional Regulatory Crosstalk between MicroRNAs and Canonical TGF-β/BMP Signalling Cascades on Osteoblast Lineage: A Comprehensive Review. Int J Mol Sci. 2023 Mar 29;24(7):6423. doi: 10.3390/ijms24076423. PMID: 37047394; PMCID: PMC10094338.

[23] Farr JN, Khosla S. Skeletal changes through the lifespan--from growth to senescence. Nat Rev Endocrinol. 2015 Sep;11(9):513-21. doi: 10.1038/nrendo.2015.89. Epub 2015 Jun 2. PMID: 26032105; PMCID: PMC4822419.

[24] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res. 1961 Dec;25:585-621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6. PMID: 13905658.

[25] Tripathi U, Misra A, Tchkonia T, Kirkland JL. Impact of Senescent Cell Subtypes on Tissue Dysfunction and Repair: Importance and Research Questions. Mech Ageing Dev. 2021 Sep;198:111548. doi: 10.1016/j.mad.2021.111548. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34352325; PMCID: PMC8373827.

[26] Farr JN, Khosla S. Cellular senescence in bone. Bone. 2019 Apr;121:121-133. doi: 10.1016/j.bone.2019.01.015. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30659978; PMCID: PMC6485943.

[27] Pignolo RJ, Law SF, Chandra A. Bone Aging, Cellular Senescence, and Osteoporosis. JBMR Plus. 2021 Apr 2;5(4):e10488. doi: 10.1002/jbm4.10488. PMID: 33869998; PMCID: PMC8046105.

[28] Chaib S, Tchkonia T, Kirkland JL. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. Nat Med. 2022 Aug;28(8):1556-1568. doi: 10.1038/s41591-022-01923-y. Epub 2022 Aug 11. PMID: 35953721; PMCID: PMC9599677.

[29] Kaur J, Saul D, Doolittle ML, Farr JN, Khosla S, Monroe DG, et al. Identification of a suitable endogenous control miRNA in bone aging and senescence. Gene. 2022 Aug 15;835:146642. doi: 10.1016/j.gene.2022.146642. Epub 2022 Jun 11. PMID: 35700807; PMCID: PMC9533812.

[30] Chen LL, Kim VN. Small and long non-coding RNAs: Past, present, and future. Cell. 2024 Nov 14;187(23):6451-6485. doi: 10.1016/j.cell.2024.10.024. PMID: 39547208.

[31] The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. Nobel Prize for the discovery of microRNA and its role in post-transcriptional gene regulation: press release. Stockholm: Karolinska Institutet; 2024 [cited 2025 Sep 8]. Available from: https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2024/press-release.

[32] Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, Oggiano A, Baralla A, Pasella S, et al. miRNA Stability in Frozen Plasma Samples. Molecules. 2015 Oct 20;20(10):19030-40. doi: 10.3390/molecules201019030. PMID: 26492230; PMCID: PMC6331950.

[33] Matias-Garcia PR, Wilson R, Mussack V, Reischl E, Waldenberger M, Gieger C, et al. Impact of long-term storage and freeze-thawing on eight circulating microRNAs in plasma samples. PLoS One. 2020 Jan 14;15(1):e0227648. doi: 10.1371/journal.pone.0227648. PMID: 31935258; PMCID: PMC6959605.

[34] Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, et al. miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. Trends Genet. 2015 Nov;31(11):613-626. doi: 10.1016/j.tig.2015.09.002. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26453491; PMCID: PMC4639415.

[35] Novák J. MikroRNA v kardiologii – přehled pro klinickou praxi. Kardiol Rev Int Med. 2016;18(4):258–267.

[36] Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev. 2004 Dec 15;18(24):3016-27. doi: 10.1101/gad.1262504. Epub 2004 Dec 1. PMID: 15574589; PMCID: PMC535913.

[37] O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. Front Endocrinol (Lausanne). 2018 Aug 3;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402. PMID: 30123182; PMCID: PMC6085463.

[38] Kerkadi A, Lathief S, Khial Y, Teleb T, Attieh G, Rahman MM et al. The Relationship Between Bone Mineral Density and Body Composition Among Qatari Women With High Rate of Obesity: Qatar Biobank Data. Front Nutr. 2022 Apr 5;9:834007. doi: 10.3389/fnut.2022.834007. PMID: 35479749; PMCID: PMC9037149.

[39] Santos VRD, Christofaro DGD, Gomes IC, Júnior IFF, Gobbo LA. Relationship between obesity, sarcopenia, sarcopenic obesity, and bone mineral density in elderly subjects aged 80 years and over. Rev Bras Ortop. 2017 Sep 22;53(3):300-305. doi: 10.1016/j.rboe.2017.09.002. PMID: 29892580; PMCID: PMC5993911.

[40] Jenkins N, Black M, Paul E, Pasco JA, Kotowicz MA, Schneider HG. Age-related reference intervals for bone turnover markers from an Australian reference population. Bone. 2013 Aug;55(2):271-6. doi: 10.1016/j.bone.2013.04.003. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23603243.

[41] Choi EJ, Ren J, Zhang K, Wu W, Lee YS, Lee I, et al. The Importance of AGO 1 and 4 in Post-Transcriptional Gene Regulatory Function of tRF5-GluCTC, an Respiratory Syncytial Virus-Induced tRNA-Derived RNA Fragment. Int J Mol Sci. 2020 Nov 20;21(22):8766. doi: 10.3390/ijms21228766. PMID: 33233493; PMCID: PMC7699471.

[42] Končitíková R, Vigouroux A, Kopečná M, Šebela M, Moréra S, Kopečný D. Kinetic and structural analysis of human ALDH9A1. Biosci Rep. 2019 Apr 26;39(4):BSR20190558. doi: 10.1042/BSR20190558. PMID: 30914451; PMCID: PMC6487263.

[43] Yin Y, Chen F, Li J, Yang J, Li Q, Jin P. AURKA Enhances Autophagy of Adipose Derived Stem Cells to Promote Diabetic Wound Repair via Targeting FOXO3a. J Invest Dermatol. 2020 Aug;140(8):1639-1649.e4. doi: 10.1016/j.jid.2019.12.032. Epub 2020 Jan 29. PMID: 32004564.

[44] Zhao J, Zhang L, Lu A, Han Y, Colangelo D, Bukata C, et al. ATM is a key driver of NF-κB-dependent DNA-damage-induced senescence, stem cell dysfunction and aging. Aging (Albany NY). 2020 Mar 22;12(6):4688-4710. doi: 10.18632/aging.102863. Epub 2020 Mar 22. PMID: 32201398; PMCID: PMC7138542.

[45] Jiang D, Sun W, Wu T, Zou M, Vasamsetti SB, Zhang X, et al. Post-GWAS functional analysis identifies CUX1 as a regulator of $p16^{INK4a}$ and cellular senescence. Nat Aging. 2022 Feb;2(2):140-154. doi: 10.1038/s43587-022-00177-0. Epub 2022 Feb 17. PMID: 37117763; PMCID: PMC10154215.

11. PŘEHLED PUBLIKACÍ

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

IF 5.9

Doolittle ML, Saul D, Kaur J, Rowsey JL, Eckhardt B, Vos S, Grain S, **Kroupova K**, Ruan M, Weivoda M, Oursler MJ, Farr JN, Monroe DG, Khosla S. Skeletal Effects of Inducible ERα Deletion in Osteocytes in Adult Mice. J Bone Miner Res. 2022 Sep;37(9):1750-1760. doi: 10.1002/jbmr.4644. Epub 2022 Jul 22. PMID: 35789113; PMCID: PMC9474695.

Ostatní práce v impaktovaném časopise

IF 2.06

Kroupova K, Palicka V, Rosa J. Monoclonal antibodies for treatment of osteoporosis. Drugs Today (Barc). 2023 Mar;59(3):195-204. doi: 10.1358/dot.2023.59.3.3453905. PMID: 36847627.

Ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

Kroupová K, Palička V. The Role of Senescence in Development of Osteoporosis and Osteoarthritis. Clin Osteol. 2023;28(1–2):19–23.

Kroupová K, Palička V. "Treat to target" in Postmenopausal Osteoporosis Treatment or How Long to Treat Osteoporosis. Farmakoter Revue. 2018;3:1–5.

Vrablíková K, Palička V, Pikner R. Systém koordinované péče o osteoporotické pacienty v České republice. Clin Osteol. 2024;29(1–2):5–11.

Vrablíková K. Jsme připraveni na program koordinované péče Fracture Liaison Services. Medicína po promoci. 2025;2.

Další odborné práce autora

Vrablíková, Květa. *Přístup sester k programu koordinované péče „Fracture Liaison Service"*. Rigorózní práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, České Budějovice, 2024.

Vrablíková, Květa. *Quality of care for patients with osteoporosis.* MBA thesis. Prague: Business Institute Prague, March 2025.