Doktorský studijní program
Klinická biochemie

MikroRNA jako biomarkery a regulátory senescence a osteoporózy

MicroRNAs as Biomarkers and Regulators of Senescence and Osteoporosis

PhDr. Květa Vrablíková, MBA

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Palička, Ph.D., dr. h. c.
Konzultant: Ing. Helena Párová, Ph.D.

Hradec Králové, 2026

Prohlášení autora

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a tam užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2026 PhDr. Květa Vrablíková, MBA

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 změn (2^−ΔCt), 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 negativní asociace miR-92a-3p a pozitivní 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.

Summary

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. miRNA expression was evaluated using ΔCt values, relative expression levels (2^−ΔCt), 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 negative association of miR-92a-3p and an independent positive 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.

Obsah

Seznam zkratek 10

1 Úvod do problematiky 14

1.1 Osteoporóza 14

1.1.1 Diagnostika osteoporózy 17

1.2 Kostní remodelace 21

1.2.1 Osteoklasty 21

1.2.2 Osteoblasty 22

1.2.3 Osteocyty 22

1.2.4 Proces remodelace 23

1.3 Senescence 24

1.3.1 Spouštěče a druhy buněčné senescence 25

1.3.2 Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) 27

1.3.3 Skeletální senescence 28

1.3.4 Senescentní buňky jako cíl léčby osteoporózy 28

1.4 RNA 29

1.4.1 Kódující a nekódující RNA 29

1.5 mikroRNA – základní údaje 33

1.5.1 Objev a terminologie 33

1.5.2 Biogeneze miRNA 34

1.5.3 Role miRNA 36

2 Cíle disertační práce 37

2.1 Obecný cíl 37

2.1.1 Specifické cíle 37

3 Metodika 38

3.1 Design studie 38

3.2 Studijní populace ... 38
3.3 Sběr vzorků kostí ... 39
3.4 Homogenizace vzorků kostí a izolace RNA ... 41
3.5 Panel miRNA související s osteoporózou ... 42
3.6 Kvantitativní Real-time PCR mikroRNA ... 42
3.7 Statistické analýzy ... 43
4 Výsledky ... 45
4.1 Vstupní charakteristiky souboru ... 45
4.2 Exprese mikroRNA ... 49
4.3 Relativní exprese miRNA (fold change) ... 52
4.4 Nezávislé asociace mezi expresí mikroRNA a základními charakteristikami souboru ... 55
5 Diskuse ... 59
5.1 Vstupní charakteristiky souboru ... 59
5.1.1 Parametr BMI ... 59
5.1.2 BMD, T-skóre, Z-skóre a FRAX jako prediktory rizika zlomenin ... 60
5.1.3 Markery kostního obratu ... 61
5.1.4 Další biochemické parametry ... 63
5.2 Deregulovaná relativní exprese miRNA u pacientů s osteoporózou ... 64
5.3 miRNA vykazující asociaci s klinickými charakteristikami pacientů s osteoporózou ... 64
5.4 Biologický význam deregulovaných miRNA ... 65
5.4.1 miR-106a-5p ... 69
5.4.2 miR-34a-5p ... 70
5.4.3 miR-218-5p ... 71
5.4.4 miR-92a-3p ... 72

5.4.5 miR-181a-5p 72
5.4.6 miR-155-5p 73
5.4.7 let-7g-5p, miR-15a-3p, miR-125b-5p a miR-455-3p 73
5.5 Potenciální cílové geny pro kandidátní miRNA 74
5.5.1 *AGO1* a *AGO4* 74
5.5.2 ALDH9A1 75
5.5.3 AURKA 75
5.5.4 ATM 75
5.5.5 CUX1 76
6 Závěr 78
7 Seznam použité literatury 80
8 Přílohy 1
8.1 Informovaný souhlas 1
8.2 Žádanka na vyšetření 1

Poděkování

Děkuji svému školiteli, panu profesoru MUDr. Vladimírovi Paličkovi, CSc., dr.h.c. za důvěru, kterou mi dal, a za podporu, která mě provázela po celou dobu mého doktorského studia. Velmi si vážím jeho odborného vedení, cenných rad i lidského přístupu, kterým mě povzbuzoval a motivoval nejen po odborné stránce, ale i v náročnějších obdobích této cesty.

Poděkování patří také mým kolegyním z laboratoře (Mgr. Marcele Slavíčkové (Chmelařové), Ph.D., Ing. Heleně Párové (Kovaříkové), Ph.D., RNDr. Ivaně Baranové, Ph.D. a Albíně Přikrylové), které mě zasvětily do světa molekulární biologie od úplných začátků. S velkou trpělivostí a ochotou mne učily práci v laboratoři molekulární biologie a předávaly mi své zkušenosti, kterých si nesmírně cením. Zvláštní poděkování patří Heleně Párové (Kovaříkové), která na mě po celou dobu studia odborně dohlížela, systematicky se mnou konzultovala jednotlivé kroky této práce a poskytovala mi nepřetržitou odbornou podporu.

Zvláštní a upřímné poděkování patří primáři MUDr. Petru Hozovi z Ortopedického oddělení Pardubické nemocnice, bez jehož podpory by tato práce nemohla vzniknout. Bez jeho osobního nasazení a nadšení by totiž nebylo možné shromáždit takto výjimečně rozsáhlý soubor lidské kostní tkáně.

Ráda bych rovněž poděkovala Lékařské fakultě v Hradci Králové za možnost absolvovat stáž na Mayo Clinic (Rochester, Minnesota), která pro mě znamenala mimořádně cennou zkušenost nejen z profesního, ale i osobního hlediska. Přinesla mi nejen nové odborné poznatky, ale také zásadně rozšířila mé vnímání možností a úrovně, na jaké lze vědu realizovat. Otevřela mi zcela nové obzory a pohled na to, jak komplexně, precizně a systematicky může být vědecká práce koncipována. Zvláštní poděkování patří panu prof. Zelalemu Temesgenovi za to, že mi umožnil pracovat v jedné z nejlepších laboratoří základního výzkumu na Mayo Clinic, a také jeho manželce Darině a dcerám Isabelle a Zoey – za jejich důvěru, podporu a vstřícnost, kterou mi projevovali nejen během mého pobytu v Rochesteru.

A zároveň patří mé hluboké poděkování a vděčnost panu profesoru Khoslovi (prof. Sundeep Khosla, M.D.) z Mayo Clinic, který mi od samého začátku projevoval důvěru a

poskytl mi jedinečnou příležitost podílet se na vědecké práci v jeho laboratoři na té nejvyšší úrovni. Velmi si vážím nejen jeho odborného vedení, ale také jeho otevřenosti, podpory a lidského přístupu, které mi po celou dobu mého pobytu projevoval. Byl pro mne významnou inspirací a motivací a zároveň mi poskytoval neocenitelnou pomoc při přípravě odborných publikací i této disertační práce.

Upřímně děkuji rovněž celému jeho týmu v divizi Endocrinology, Diabetes, Metabolism, & Nutrition za vřelé přijetí, vstřícnost, ochotu sdílet své znalosti a podporu, kterou mi poskytovali během mého působení v laboratoři. O to více si vážím skutečnosti, že s některými z nich zůstávám v kontaktu dodnes.

A nyní se dostávám k tomu nejdůležitějšímu – své rodině, bez níž by tato cesta nebyla možná. Děkuji svým rodičům za výchovu k samostatnosti, odhodlání a víře ve vlastní schopnosti, a za to, že mě nikdy neodrazovali od mých cílů. Zvláště děkuji své mamince, která mi byla oporou po celou dobu studia a neúnavně mi fandila.

Největší poděkování patří mému manželovi Michalovi a dětem za jejich nekonečnou trpělivost, pochopení a toleranci. Děkuji jim za všechny ty víkendy, večery i dovolené, které jsem nemohla trávit s nimi, protože jsem je věnovala práci v laboratoři, psaní publikací a disertační práce. Velmi si vážím jejich podpory a jen doufám, že jsem svým dětem – Emmě, Filipovi i Danielovi – alespoň malým příkladem vytrvalosti a odhodlání.

Tato práce byla podpořena programem spolupráce, výzkumná oblast DIAG a MH CZ – DRO (UHHK, 00179906).

Seznam zkratek

3´UTR	nepřekládaná oblast (z anglického *untranslated region)*
ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family member A1
ALP	alkaline phosphatase (alkalická fosfatáza)
ALT	alanine aminotransferase (alaninaminotransferáza)
ALP-KI	alkalická fosfatáza – kostní izoenzym
AST	aspartate aminotransferase (aspartátaminotransferáza)
ATM	ataxia telangiectasia mutated
AURKA	Aurora kinase A
BMD	bone mineral density (kostní minerální denzita)
BMI	body mass index (index tělesné hmoty)
BMP2	bone morphogenetic protein 2 (kostní morfogenetický protein 2)
BMSCs	bone marrow-derived mesenchymal stem cells (kostní mezenchymální kmenové buňky)
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A (inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1A)
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2 A (inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A)
CDK	cyclin-dependent kinase (cyklin-dependentní kináza)
CKP	cervikokapitální endoprotéza
CRISPR-Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9
CSF-1R	colony-stimulating factor-1 receptor (receptor faktoru stimulujícího kolonie-1)
CTX-I	C-terminal telopeptide of type I collagen (C terminální telopeptid kolagenu typu I)
CUX1	Cut-like homeobox 1

DDR	DNA Damage Response (odpověď na poškození DNA)
DKK1	Dickkopf-1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DXA	dual-energy X-ray absorptiometry (dvouenergiová rentgenová absorpciometrie)
EMA	European Medicines Agency
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
FC	fold change
FDA	Food and Drug Administration
GLM	Generalized Linear Model (vícerozměrný zobecněný lineární model)
IGF-1	insulin-like growth factor 1 (inzulinu podobný růstový faktor typu I)
LDN	léčebna dlouhodobě nemocných
lncRNA	long non-coding RNA (dlouhá nekódující RNA)
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor (faktor stimulující růst makrofágových kolonií)
MDM2	Murine Double Minute 2
miRISC	microRNA-induced silencing complex (mikroRNA-indukovaný tlumící komplex)
miRNA, miR	mikroRNA
MMP	matrix metalloproteinases (matrixové metaloproteinázy)
mRNA	messenger RNA (messengerová/informační RNA)
ncRNA	non-coding RNA (nekódující RNA)
OPG	osteoprotegerin
OP	osteoporóza
Osx	osterix
piRNA	PIWI-interacting RNA (RNA interagující s PIWI proteiny)

pRb	retinoblastoma protein (retinoblastomový protein)
pre-miRNA	prekurzorová miRNA
pri-miRNA	primární miRNA
P1NP	procollagen type I N-terminal propeptide (aminoterminální propeptid kolagenu typu 1)
PTH	parathormon
RANK/RANKL	receptor activator of nuclear factor κB / receptor activator of nuclear factor κB ligand (receptor aktivátoru nukleárního faktoru κB / ligand receptoru aktivátoru nukleárního faktoru κB)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SASP	senescence-associated secretory phenotype (fenotyp spojený se senescencí)
SIPS	stress-induced premature senescence (stresem indukovaná předčasná senescence)
siRNA	small-interfering RNA (malá interferující RNA)
sncRNA	small non-coding RNA (malá nekódující RNA)
snRNA	small-nuclear RNA (malá jaderná RNA)
snoRNA	small-nucleolar RNA (jadérkové RNA)
TALEN	transcription activator-like effector nucleases
TEP	totální endoprotéza kyčelního kloubu
TGF-β1	transforming growth factor β1 (transformující růstový faktor β1)
TNF	tumor necrosis factor α (faktor nekrózy nádoru)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TSH	thyroid-stimulating hormone (tyreotropní hormon)

T-skóre	počet směrodatných odchylek, o které se BMD liší od průměru mladé referenční populace
ZFN	zinc-finger nucleases (zinkové prstové nukleázy)

1 Úvod do problematiky

1.1 Osteoporóza

Osteoporóza je chronické systémové metabolické onemocnění kostí charakterizované úbytkem kostní hmoty, poškozením mikroarchitektury kostní tkáně a zhoršením její kvality, což vede ke zvýšenému riziku nízkotraumatických zlomenin [1]. Mezi nimi jsou nejzávažnější zlomeniny obratlů a proximálního femuru, které představují nejvyšší riziko morbidity a mortality pacientů s osteoporózou. Toto onemocnění probíhá dlouhou dobu tiše a bez bolesti, a právě zlomeniny jsou jeho nejzávažnější komplikací – přestože osteoporóza je onemocnění dobře diagnostikovatelné, léčitelné a ve značné míře preventabilní [2, 3].

Odhaduje se, že celosvětově 1 ze 3 žen a 1 z 5 mužů starších 50 let utrpí během zbývajícího života zlomeninu spojenou s osteoporózou [4]. Údaje z USA ukazují, že roční náklady související s hospitalizací v důsledku osteoporotických zlomenin činí přibližně 5,1 miliardy USD. Pro srovnání, u infarktu myokardu dosahují náklady 4,3 miliardy USD, u cévní mozkové příhody 3,0 miliardy USD a u rakoviny prsu 0,5 miliardy USD [5]. Kostní patologie asociované se stárnutím, zejména osteoporóza, představují významný faktor podílející se na snížení kvality života seniorů. Tyto stavy jsou často spojeny s prodlouženou hospitalizací, zvýšeným rizikem invalidity a postupnou ztrátou soběstačnosti [6, 7, 8]. Zlatým standardem pro diagnostiku osteoporózy, sledování účinnosti léčby a hodnocení rizika zlomenin je měření kostní minerální denzity (BMD) pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie (DXA) [9]. Hodnota BMD má ovšem pouze omezenou vypovídací schopnost a odráží pouze jednu část celkového rizika vzniku zlomenin (více v kapitole Diagnostika osteoporózy) [6]. Pacienti s recentní zlomeninou jsou ve velmi vysokém riziku opakovaných zlomenin, a to nezávisle na jejich výchozím T-skóre [10]. Rizikové faktory osteoporózy se dělí na ovlivnitelné a neovlivnitelné.

Neovlivnitelné rizikové faktory:

- věk – riziko zlomenin se zvyšuje s věkem;
- ženské pohlaví;
- anamnéza zlomeniny proximálního femuru u jednoho z rodičů;

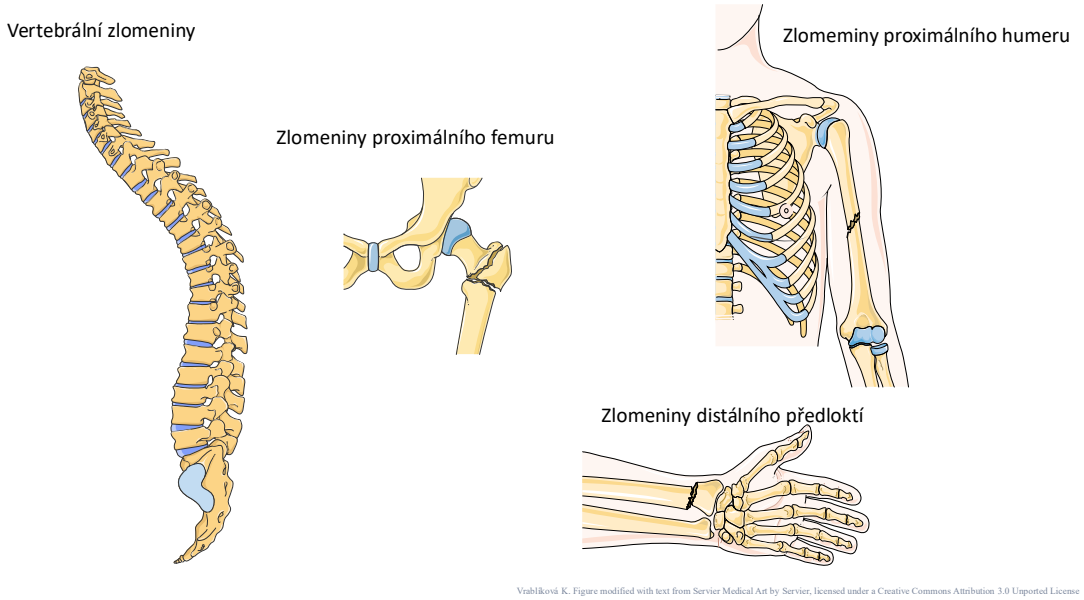
- prodělaná zlomenina obratlového těla a nevertebrální zlomenina po 50. roce věku;
- počet zlomenin obratlových těl a jejich stupeň;
- prodělaná nevertebrální nízkotraumatická zlomenina po 50. roce věku;
- anamnéza opakovaných pádů (více než jeden pád v předchozích 12 měsících) zvyšuje riziko jakékoli zlomeniny.

Ovlivnitelné rizikové faktory:

- nízká hodnota Body Mass Indexu (BMI < 20) zdvojnásobuje riziko zlomeniny proximálního femuru,
- snížení mobility,
- abúzus nikotinu a alkoholu,
- deficit vitaminu D,
- nízký příjem vápníku,
- hyponatrémie jako ukazatel špatného zdravotního stavu u starých lidí [9, 10].

Prvním příznakem osteoporózy jsou bohužel zpravidla nízkotraumatické fraktury. Dle Společnosti pro metabolická onemocnění skeletu České lékařské společnosti J. E. Purkyně (SMOS ČLS JEP) lze „nízkotraumatickou (osteoporotickou) zlomeninu klinicky definovat jako zlomeninu, která se vyskytuje v důsledku minimálního traumatu (např. pádu z výšky vstoje nebo při chůzi či pádu, ze sedu) nebo žádného identifikovatelného traumatu, při němž by u zdravého jedince zlomenina nevznikla.“

Nejtypičtější lokalizace osteoporotických zlomenin jsou obratle, proximální femur, proximální humerus a distální předloktí (Obr. 1.). Osteoporotické zlomeniny mohou ale vzniknout i na dalších místech, jako jsou žebra, pánev, distální tibie a distální femur [11, 12].



Obrázek 1. Nejtypičtější lokalizace osteoporotických zlomenin

Zdroj: Vlastní zpracování (upraveno dle: Servier Medical Art)

Vertebrální zlomeniny patří mezi nejčastější osteoporotické fraktury, avšak zůstávají významně poddiagnostikovány. Odhaduje se, že klinicky rozpoznána je pouze přibližně jedna třetina vertebrálních zlomenin, přičemž většina z nich probíhá bez akutní traumatické události nebo je mylně přisuzována degenerativním změnám páteře. Poddiagnostika vertebrálních fraktur představuje celosvětový problém, což potvrzují výsledky multicentrické studie IMPACT. Podíl vertebrálních zlomenin, které nejsou rozpoznány na rentgenovém vyšetření, dosahuje až 46 % v Latinské Americe, 45 % v Severní Americe a přibližně 29 % v Evropě, Jižní Africe a Austrálii. Přestože jsou vertebrální fraktury často provázeny bolestí, omezením mobility a významným poklesem kvality života, méně než 10 % pacientů s vertebrálními zlomeninami je hospitalizováno. Nerozpoznané vertebrální zlomeniny zároveň významně zvyšují riziko dalších budoucích fraktur, včetně fraktur kyčle, a představují klíčový prognostický faktor další skeletální morbidity [12, 13, 14].

Zlomeniny proximálního femuru jsou jednoznačně nejzávažnější komplikací osteoporózy. Pro pacienty znamenají výrazné snížení kvality života, ve většině případů závislost na pomoci blízkých osob a jsou spojeny se zvýšeným rizikem invalidity i úmrtí v důsledku komplikací souvisejících se sníženou mobilitou [14, 15]. Zlomeniny proximálního femuru představují každodenní problematiku ortopedických a traumatologických pracovišť. Operačním řešením bývá aloplastika – totální endoprotéza (TEP) nebo cervikokapitální endoprotéza (CKP). Celková doba rekonvalescence po zlomenině proximálního femuru trvá několik měsíců. Po propuštění z nemocnice či zařízení následné péče jsou pacienti dále sledováni praktickým lékařem a pravidelně kontrolováni na pracovišti, kde byla operace provedena. Zlomenina proximálního femuru představuje zásadní zásah do života nejen samotného pacienta, ale i jeho rodiny. U osob starších 65 let vyžaduje přibližně 40 % pacientů následnou dlouhodobou péči na geriatrii nebo v léčebnách dlouhodobě nemocných (LDN). U většiny pacientů dochází k dočasnému nebo trvalému snížení soběstačnosti a jsou odkázáni na pomoc rodiny nebo sociálních pracovníků. Více než polovina pacientů musí trvale používat kompenzační pomůcky, jako jsou berle, francouzské hole nebo chodítko. Úmrtnost při neoperační léčbě je přibližně čtyřikrát vyšší než při léčbě operační. Přestože za posledních dvacet let díky zkvalitnění péče o pacienty došlo k výraznému poklesu mortality po zlomeninách proximálního femuru, zůstávají tato čísla nadále nezanedbatelná [16, 17, 18].

Zlomeniny distálního předloktí se nejčastěji vyskytují u žen ve vyšším věku, zejména po 65. roce života. U mužů představují přibližně 15 % všech těchto fraktur a jejich výskyt se s narůstajícím věkem zvyšuje jen mírně. Přesto mají zlomeniny distálního předloktí u mužů významnou klinickou výpovědní hodnotu, neboť jsou považovány za časný a citlivý ukazatel fragility skeletu a zvýšeného rizika následných osteoporotických fraktur. Identifikace těchto pacientů proto představuje důležitou příležitost k časnému zahájení sekundární prevence [19].

1.1.1 Diagnostika osteoporózy

1) Anamnéza

Zaměřuje se na výskyt zlomenin proximálního femuru u rodičů (zejména v mateřské linii), na prodělané zlomeniny v dospělosti, celoživotní úroveň fyzické aktivity, anamnézu pádů a dietní návyky, včetně příjmu vápníku. Farmakologická anamnéza je

zaměřena na užívání léčiv zvyšujících riziko osteoporózy a zlomenin. U žen má zásadní význam gynekologická anamnéza se zaměřením na menopauzu a hormonální terapii estrogeny. U obou pohlaví je důležité zhodnocení případného hypogonadismu jakéhokoli původu [15].

2) Klinické vyšetření

Je zaměřeno především na hodnocení tělesné výšky a jejího snížení o ≥ 6 cm oproti maximální dosažené výšce v rané dospělosti nebo o ≥ 2 cm ve srovnání s předchozím měřením.

Pro hodnocení rizika zlomeniny se nejčastěji používá FRAX. Jeho použití je jednoduché. Výstupem kalkulátoru je percentuální vyjádření desetiletého rizika zlomeniny jednak proximálního konce kosti stehenní, jednak některé z hlavních osteoporotických zlomenin, jako je klinická zlomenina obratle, zlomenina distálního předloktí, horního konce kosti stehenní a pažní kosti. Česká verze kalkulátoru (obr. 2) je dostupná na webových stránkách Sheffieldské univerzity (Fracture Risk Assessment Tool, FRAX®, © Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, 2023) a na stránkách Společnosti pro metabolická onemocnění skeletu ČLS JEP (www.smos.cz) [9, 15, 19, 20, 21].

Nástroj pro výpočet

Odpovězte na níže uvedené otázky a vypočítejte desetiletou pravděpodobnost zlomeniny s BMD nebo bez ní.

Kontinent Evropa **Země** Česká republika

Jméno/ID Identifikace (nepovinné)

O rizikových faktorech

Osoby s rizikem zlomeniny vyhodnoceným od 1. června 2011 : 135 940

Dotazník

1. **Věk (mezi 40 a 90 lety)** Věk
2. **Pohlaví** Ženy Muži
3. **Hmotnost** kg 0 kg / cm
4. **Výška** cm 0
5. **Prodělaná zlomenina** X
6. **Zlomenina kyčle u rodičů** X
7. **V současné době kouří** X
8. **Glukokortikoidy** X
9. **Revmatoidní artritida** X
10. **Sekundární osteoporóza** X
11. **Alkohol 3 a více jednotek/den** X
12. **BMD krčku stehenní kosti** Vyberte BMD

Výpočet Přehledně

Risk factors

For the clinical risk factors a yes or no response is asked for. If the field is left blank, then a "no" response is assumed. See also notes on risk factors

The risk factors used are the following:

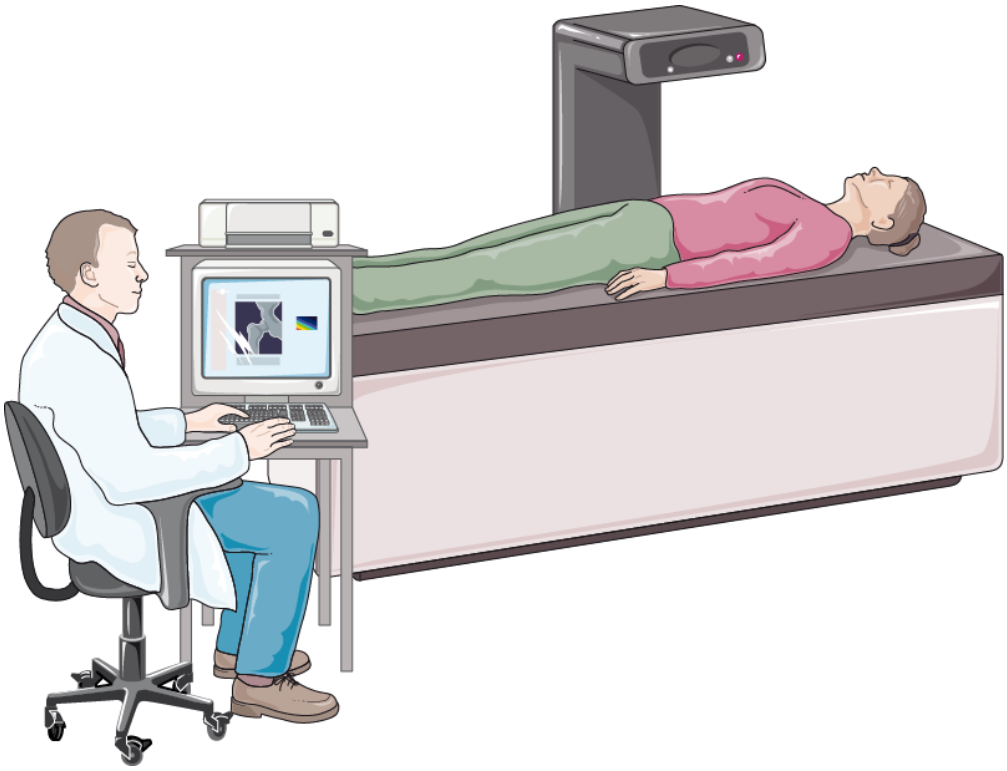
- Age
- Sex
- Weight
- Height
- Previous fracture
- Parent fractured hip
- Current smoking
- Glucocorticoids
- Rheumatoid arthritis
- Secondary osteoporosis
- Alcohol 3 or more units/day
- Bone mineral density (BMD)

Obrázek 2. Česká verze kalkulátoru rizika FRAX®

3) Zobrazovací metody

A) Skiagrafické vyšetření hrudní a bederní páteře u podezření na kompresivní zlomeninu obratlového těla, či posouzení její etiologie.

B) Denzitometrické vyšetření představuje neinvazivní metodu umožňující stanovení denzity kostního minerálu (bone mineral density, BMD). Za zlatý standard je považována dvouenergiová rentgenová absorpciometrie (DXA), která poskytuje reprodukovatelné a klinicky validované údaje (Obr. 3.). Hodnoty BMD získané metodou DXA představují významný prediktor rizika osteoporotických zlomenin a tvoří základ pro stanovení diagnózy osteoporózy. Provádění denzitometrického vyšetření metodou DXA se v České republice řídí Národními radiologickými standardy a indikačními kritérii pro kostní denzitometrii, vydanými Ministerstvem zdravotnictví České republiky a publikovanými ve Věstníku MZ ČR [21-22].



Obrázek 3. Denzitometrické vyšetření

Zdroj: Vlastní zpracování (upraveno dle: Servier Medical Art)

Standardně měřenými oblastmi zájmu je bederní páteř, krček kosti stehenní a celková oblast proximálního femuru obou femurů. Stanovená hodnota BMD je primárně vyjadřována v absolutních hodnotách (g/cm²). Diagnostický závěr je ale vyjadřován jako T– skóre vyjadřované počtem standardních odchylek (SD), naměřené hodnoty BMD mladých zdravých žen (platí pro ženy a muže ≥ 50 let věku). Hodnoty T–skóre > 1 jsou považovány za normální. Hodnoty T skóre v rozmezí –1,0 až –2,5 jsou klasifikovány jako snížení kostní minerální denzity – osteopenie, hodnoty nižší než ≤ –2,5 jako osteoporóza [9, 15, 19, 21].

4) Laboratorní testy

V rámci základního laboratorního vyšetření se standardně používá stanovení iontů (Ca, P, Na, K), jaterních testů (ALT, AST, ALP), krevního obrazu, sérového kreatininu, celkových bílkovin krevního séra, hormonů štítné žlázy a hladiny 25-hydroxyvitaminu D [25(OH)D]. Součástí hodnocení kostního metabolismu jsou dále markery kostní remodelace, zejména C-terminální telopeptid kolagenu typu I (CTX-I) jako marker kostní resorpce a aminoterminální propeptid kolagenu typu I (P1NP) spolu s kostní izoformou alkalické fosfatázy (ALP-KI) jako markery kostní formace [9, 15].

1.2 Kostní remodelace

Ukládání kostní matrix, její mineralizace a remodelace je regulována několika typy buněk.

1.2.1 Osteoklasty

Osteoklasty jsou velké vícejaderné buňky odpovědné za resorpci kosti, které se diferencují z prekurzorů monocytárně-makrofágové linie v kostní dřeni. Diferenciaci osteoklastů podporují osteoblasty, osteocyty a aktivované T lymfocyty [23] prostřednictvím sekrece ligandu receptoru aktivátoru nukleárního faktoru κB (RANKL). RANKL se váže na receptor RANK exprimovaný na povrchu osteoklastů. Exprese receptoru RANK je zvyšována faktorem stimulujícím růst makrofágových kolonií (M-CSF), který je produkován osteoblasty a stromálními buňkami kostní dřeně. M-CSF se váže na receptor colony-stimulating factor-1 (CSF-1R), známý také jako c-FMS, exprimovaný na povrchu osteoklastů, a tím podporuje jejich diferenciaci a přežívání [23, 24, 25]. Zralé osteoklasty resorbují kost sekrecí kyselin a proteolytických enzymů, které

vedou k rozpouštění kostní matrix. Diferenciaci a aktivitu osteoklastů inhibuje osteoprotegerin (OPG), jenž funguje jako solubilní „slepý“ (decoy) receptor pro RANKL a vyvazuje jej v mezibuněčném prostoru. OPG je produkován především osteoblasty a osteocyty, ale také B lymfocyty a játry [26].

1.2.2 Osteoblasty

Osteoblasty podporují tvorbu nové kostní tkáně a diferencují se z mezenchymálních kmenových buněk (BMSC) v reakci na Wnt signalizaci. Wnt signalizace se aktivuje stabilizací β-kateninu, který řídí transkripci genů zapojených do diferenciace osteoblastů, jako jsou Runt-related transkripční faktor 2 (Runx2) a osterix (Osx) [27]. Signalizaci Wnt v osteoblastech lze inhibovat sklerostinem a Dickkopf-1 (DKK1) [28]. Zralé osteoblasty vylučují osteokalcin, alkalickou fosfatázu a kolagen typu I, hlavní složku matrixu, která je pak mineralizována fosforečnanem vápenatým ve formě hydroxyapatitu [29].

1.2.3 Osteocyty

Osteocyty jsou terminálně diferencované osteoblasty uložené v mineralizované kostní matrix, vyznačují se dlouhou životností a hrají klíčovou roli ve vnímání mechanické zátěže [30]. Jsou mezi sebou propojeny hustou sítí kanálků, jejichž přerušení, například v důsledku mikrofraktury v kostní tkáni, spouští specifické signalizační procesy. Osteocyty produkují řadu signálních molekul, které mohou pozitivně i negativně regulovat kostní remodelaci [31]. Představují hlavní zdroj RANKL podporujícího osteoklastogenezi [32] a zároveň produkují sklerostin a DKK1, které antagonizují Wnt signalizaci a inhibují osteoblastickou kostní formaci [28]. Kostní dřeň obsahuje mnoho typů buněk, jako jsou buňky hematopoetických linií, včetně myeloidních (prekurzor osteoklastů), lymfoidních a erytroidních buněk, stejně jako buňky stromatu dřeně a BMSC, které se mohou diferencovat na osteoblasty, myocyty, adipocyty a chondrocyty [33]. Kost je metabolicky aktivní orgán a hraje důležitou roli při udržování homeostázy minerálů, reaguje na mechanické zatížení, hormonální i imunologické podněty. Normální remodelace kostí probíhá v celém skeletu a je v rovnováze mezi resorpcí stávající kosti (staré, slabé nebo poškozené) a ukládáním nové kosti [34]. Tento proces probíhá cyklicky v několika na sebe navazujících fázích:

1. aktivace – při níž jsou osteoklasty rekrutovány do oblasti poškozené nebo funkčně nekompetentní kosti,

2. resorpce – kdy zralé osteoklasty odbourávají kostní tkáň,

3. reverze – charakterizovaná apoptózou osteoklastů a náborem progenitorů osteoblastů,

4. tvorba – během níž zralé osteoblasty syntetizují novou kostní matrix a zajišťují její mineralizaci [35, 36, 37].

1.2.4 Proces remodelace

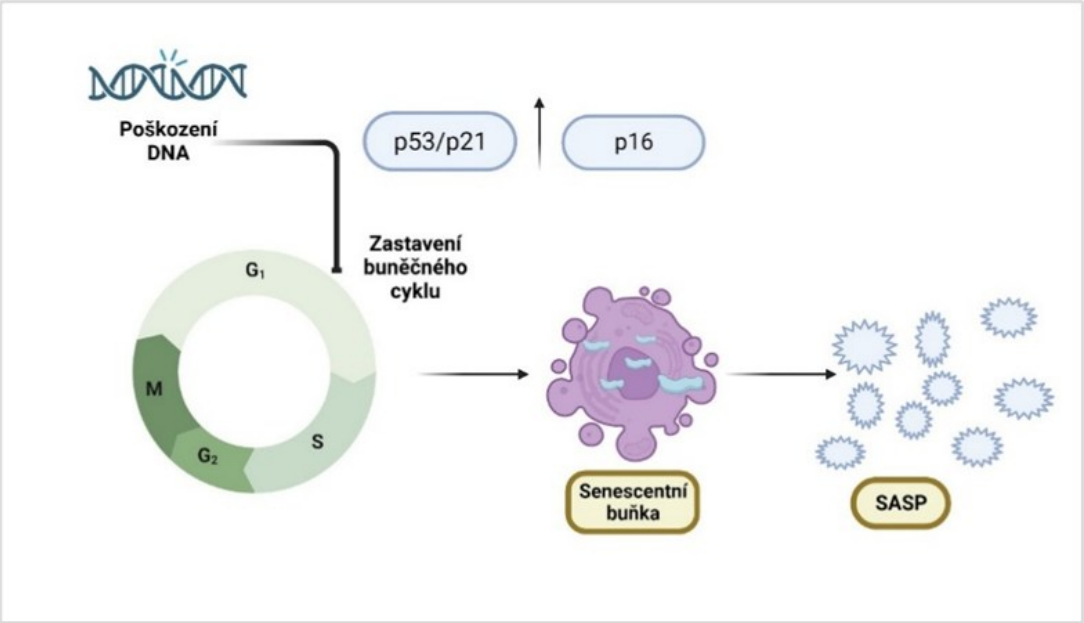
Buňky kostní matrix produkují řadu proteinů, které hrají klíčovou roli v procesu kostní remodelace. Transformující růstový faktor β1 (TGF-β1) a inzulinu podobný růstový faktor typu I (IGF-1) jsou v kostní matrix přítomny ve své latentní formě a po resorpci kosti osteoklasty se aktivují, čímž podporují diferenciaci mezenchymálních buněk ve zralé osteoblasty [38, 39]. Recentní výzkumy dále prokázaly, že významnou roli v remodelaci kostí hrají také mikroRNA (miRNA). Byly identifikovány miRNA, které přímo inhibují expresi transkripčního faktoru Runx2 v osteoblastech, přičemž většina z nich je schopna reverzibilně potlačovat osteoblastickou diferenciaci a současně ovlivňovat osteoklastogenezi a funkci osteocytů [40].

Přirozený úbytek trabekulární kostní hmoty začíná již ve třetí dekádě života u mužů i žen, přičemž u žen se výrazně zrychluje v období perimenopauzy a u mužů v souvislosti s poklesem hladin pohlavních steroidů [41, 42]. Tento proces je přímo ovlivněn zejména snížením hladin estrogenu a testosteronu, což vede k úbytku kostní hmoty a zvyšuje riziko rozvoje osteoporózy. Kostní homeostázu dále modulují i další hormony, včetně parathormonu (PTH) a kortikosteroidů [43]. Změny v trabekulární architektuře zahrnují snížení počtu trabekul, které je výraznější u žen než u mužů, dále snížení jejich tloušťky, jež je naopak výraznější u mužů, a celkovou ztrátu trabekulární konektivity. Po menopauze u žen a při nedostatku pohlavních steroidů u mužů dochází rovněž k úbytku kortikální kostní hmoty a ke změnám struktury lakunárně-kanálkového systému, což negativně ovlivňuje mezibuněčnou komunikaci a schopnost skeletu reagovat na mechanickou zátěž [44]. Lakunárně-kanálkový systém je udržován mimo jiné proteinem konexin-43, jehož snížená exprese v průběhu stárnutí vede k apoptóze osteocytů, vzniku

prázdných lakun a ke zvýšené diferenciaci osteoklastů. Tyto změny podporují hromadění mikrotrhlin v kostní tkáni a přispívají k rozvoji osteoporózy [45]. Současně se s věkem zvyšuje množství žluté tukové tkáně v dutině kostní dřeně, přičemž byla prokázána silná korelace mezi zvýšenou adipozitou kostní dřeně, sníženou kostní minerální denzitou (BMD) a vyšším rizikem osteoporotických zlomenin [46]. S přibývajícím věkem rovněž klesá aktivita Wnt signalizace, což vede ke snížení počtu osteoblastů [47, 48]. Fyzická aktivita je ve stáří často omezená, což způsobuje mechanické odlehčení skeletu a podporuje úbytek kostní hmoty, neboť osteocyty představují hlavní mechanosenzorické buňky kostní tkáně. Dlouhodobě imobilizovaní pacienti vykazují zvýšené hladiny sklerostinu v plazmě [49]. Snížení počtu osteocytů a nárůst prázdných lakun dále snižují citlivost kostní tkáně na mechanickou stimulaci. Zvýšená diferenciace a resorpční aktivita osteoklastů zprostředkovaná stromálními buňkami a osteoblasty tak představuje významný mechanismus přispívající k úbytku kostní hmoty. Mezenchymální kmenové buňky kostní dřeně (BMSCs) u starších jedinců navíc vykazují věkově podmíněný nárůst exprese RANKL a M-CSF a současně pokles exprese OPG [51, 52].

1.3 Senescence

Senescence byla poprvé popsána v roce 1961 L. Hayflickem a P. S. Moorheadem, kteří mimo jiné objasnili, že somatické nenádorové buňky mohou projít jen určitým definovaným počtem dělení (tzv. Hayflickův limit) [53]. Senescence je ireverzibilní zastavení buněčné proliferace ve fázi G1 buněčného dělení. Nedochází ovšem k indukci programované buněčné smrti, naopak buňky zůstávají velmi životaschopné a metabolicky aktivní [54]. Dochází k celé řadě změn uvnitř buňky, jako jsou změny v expresi genů, seskupení chromatinu, zastavení aktivace apoptózy a také ke změnám v sekreční činnosti buněk [55]. Senescentní buňky secernují do svého okolí signální faktory, proteázy, proteiny extracelulární matrix, neproteinové komponenty a také extracelulární vezikuly obsahující miRNA. Tento sekreční fenotyp asociovaný se senescencí (Senescence Associated Secretory Phenotype – SASP) hraje klíčovou roli v ovlivňování bezprostředního i vzdáleného okolí senescentní buňky (Obr. 4.) [55, 56, 57].



Obrázek 4. Schéma procesu senescence a vzniku SASP

Zdroj: Vlastní zpracování (vytvořeno v BioRender.com)

1.3.1 Spouštěče a druhy buněčné senescence

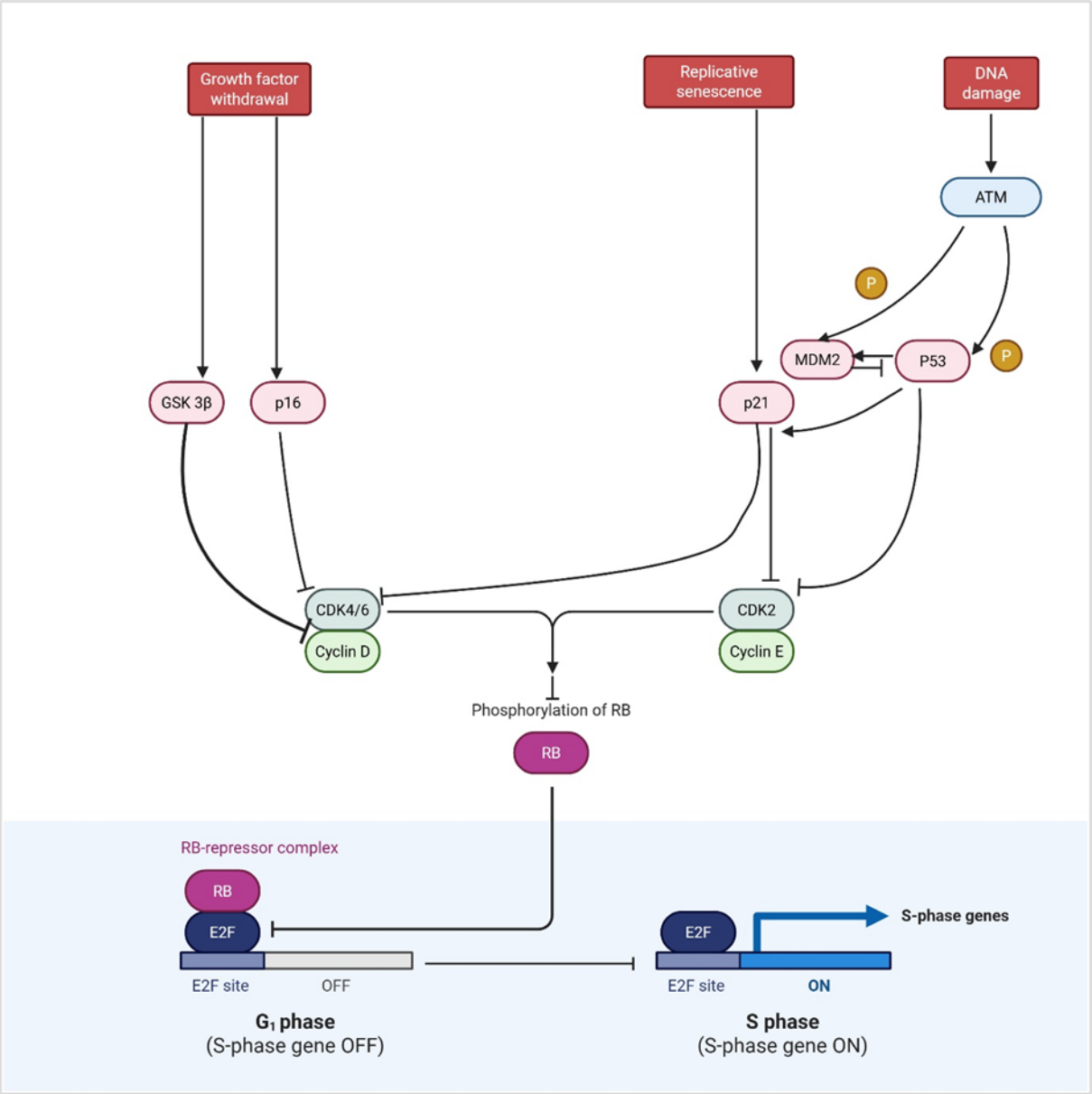
Spouštěčem buněčné senescence může být zkracování telomer jako důsledek tzv. Hayflickova limitu, což je přirozená neboli replikativní senescence [53, 58, 59]. Vedle replikativní senescence může dojít také ke stresem indukované předčasné senescenci (Stress-Induced Premature Senescence – SIPS). Příčinou je poškození DNA exogenními procesy (např. ultrafialové či ionizující záření) nebo endogenními procesy, jako je oxidační stres zprostředkovaný reaktivními formami kyslíku (Reactive Oxygen Species – ROS). Oxidační stres může být při nízkých hladinách užitečný, ale pokud se například v kosti rovnováha mezi ROS a antioxidanty naruší, vede to ke smrti osteoblastů a osteocytů a následně k destrukci kosti zvýšením diferenciace a aktivity osteoklastů [53]. Dalším spouštěčem senescence může být změna chromatinu způsobená epigenetickými změnami, růstovými faktory (např. insulin-like growth factor 1, IGF-1) či prozánětlivými cytokiny (např. TNF-α) souvisejícími se stárnutím. Mezi induktory stresem indukované předčasné senescence patří také Ras, protoonkogen kódující signální protein zásadní pro regulaci buněčného cyklu. Při krátkodobé stimulaci dochází k vyšší proliferaci buněk a

následné transformaci na nádorové buňky, při trvalé stimulaci dochází k aktivaci drah p53/p21 a p16/Rb a ke vzniku SIPS [59, 60].

Senescence je aktivovaná zejména signálními drahami zahrnujícími bílkovinné molekuly p53 a p21 (p21^CIP1) [61]. Transkripční faktor p53 je za běžných podmínek v buňce neaktivní, neboť je vázán svým negativním regulátorem ubikvitin-ligázou Murine Double Minute 2 (MDM2), která zajišťuje jeho proteazomální degradaci [62]. Ataxia teleangiektasia mutated kináza (ATM) fosforyluje p53, a tím brání jeho interakci s MDM2. Fosforylovaný p53 se tedy stabilizuje a akumuluje v buňce [63]. Zvýšená hladina aktivního p53 následně indukuje expresi p21, který inhibuje komplex cyklin D1–CDK4 (cyklin-dependentní kináza 4) a vede k zástavě buněčného cyklu ve fázi G1/S [59, 64]. Faktor p53 je kódován genem TP53, který je klasifikován jako tumor supresorový gen a negativní regulátor buněčné proliferace [65]. TP53 je lokalizovaný na chromosomu 17 [66]. Faktor p21 je kódován genem CDKN1A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A) lokalizovaným na 6. chromosomu a patří do rodiny inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CIP/KIP) [65].

Dalším proteinem, který se uplatňuje v souvislosti s buněčným stárnutím a stresem, je p16^INK4a (dále jen p16), kódovaný genem CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A) na 9. chromosomu. P16 patří do rodiny INK4 proteinů, které inhibují cyklin-dependentní kinázy CDK4 a CDK6. Při expresi p16 dojde k inhibici komplexů cyklin D–CDK4/6, a tím nedojde k fosforylaci pRb (retinoblastomový protein) a jeho uvolnění od transkripčního faktoru E2F, což vede k zástavě buněčného cyklu ve fázi G1/S (Obr. 5.) [67].

Další skupinou spouštěčů a zároveň biomarkerů senescence jsou miRNA [68].



Obrázek 5. Indukční fáze senescence

Zdroj: Vlastní zpracování (vytvořeno v BioRender.com)

1.3.2 Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP)

Při signálu poškození DNA (DNA Damage Response, DDR) se aktivují hlavní obranné mechanismy, jako jsou NF-κB, p38, mTOR a signální dráha C/EBPβ. Ty spouští expresi celé řady prozánětlivých cytokinů (například IL-1α, IL-1β, IL-6 a IL-8), chemokinů (CCL2, CCL5 a CXCL1), růstových faktorů (HGF, EGF a TGFα) a matrix-

remodelujících enzymů (matrix metalloproteinases, MMP) zejména MMP-1 a MMP-3 a dalších. Složení SASP se liší podle toho, z jakých buněk pochází, a podle toho, zda jde o časnou či perzistující senescenci. SASP může mít pozitivní i negativní dopad na organismus. Při poškození v mladém věku mohou senescentní buňky sekretující SASP včas upozornit imunitní systém a indukovat regeneraci buněk jejich proliferací a diferenciací. Avšak senescentní buňky, které se postupně hromadí s věkem, vedou k akumulaci SASP a chronickému zánětu. Dochází k zástavě proliferace buněk a šíření senescence do okolních buněk. To může vést ke zhoršení regenerace po poškození tkání a ke snížení protinádorové imunity. SASP může přispívat k proliferaci a přežívání nádorových buněk [60]. Zajímavé je, že pokud dojde k expresi p16 bez přítomnosti DDR, senescentní buňky SASP neprodukují [62, 65, 67, 68].

1.3.3 Skeletální senescence

Buňky vykazující znaky senescence, včetně zvýšení exprese CDKN1A (p21) a CDKN2A (p16), se vyskytují ve všech tkáních. V kosti se mohou vyskytovat jednak tzv. age-associated senescent cells, které se v kosti kumulují v souvislosti se stárnutím, a jednak tzv. injury-related senescent-like cells, které se vyskytují v souvislosti s poraněním kosti. Také se ukazuje, že senescence kosti spojená se stárnutím je zprostředkována především p16, zatímco po akutním poškození kosti (např. zlomenině) dochází ke zvýšení exprese p21, která se s dobou hojení snižuje. Ve stejném kolektivu bylo prokázáno, že i malý počet senescentních osteocytů a osteoklastů hromadících se ve stárnoucí kosti může mít negativní vliv prostřednictvím SASP, který poškozuje okolní tkáň. Eliminace senescentních buněk by proto mohla mít příznivý dopad nejen na kost, ale i na další tkáně [62, 69].

1.3.4 Senescentní buňky jako cíl léčby osteoporózy

Objev drah, které indukují senescenci v kosti, umožňuje postupně identifikovat biomarkery pro detekci senescentních buněk s cílem terapeuticky zasáhnout. Roste potenciál pro terapeutické intervence zaměřené na clearance senescentních buněk nebo na potlačení SASP [56, 70]. Genetická modifikace je další možností s využitím dostupných editačních metod včetně zinkových prstových nukleáz (ZFN) a efektorových nukleáz podobných transkripčním aktivátorům (TALEN). [70] Nejnovější metoda genové editace využívající systém CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short

palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) vedla k vývoji první genové terapie založené na CRISPR-Cas9, která byla schválena FDA (Food and Drug Administration) i EMA (European Medicines Agency) pro léčbu monogenních onemocnění [71, 72, 74]. Pro jakýkoli terapeutický zásah je nezbytné porozumět regulačním mechanismům, induktorům a biomarkerům stárnutí kostí, včetně deregulace exprese miRNA.

Pochopení klíčových rolí miRNA u lidských onemocnění je zásadní pro odhalení složitých mechanismů onemocnění a vývoj nových léčebných postupů [75, 76, 77, 78]. Victor Ambros a Gary Ruvkun, kteří objevili miRNA, byli v roce 2024 oceněni Nobelovou cenou za fyziologii a lékařství za svou průlomovou práci [79].

1.4 RNA

1.4.1 Kódující a nekódující RNA

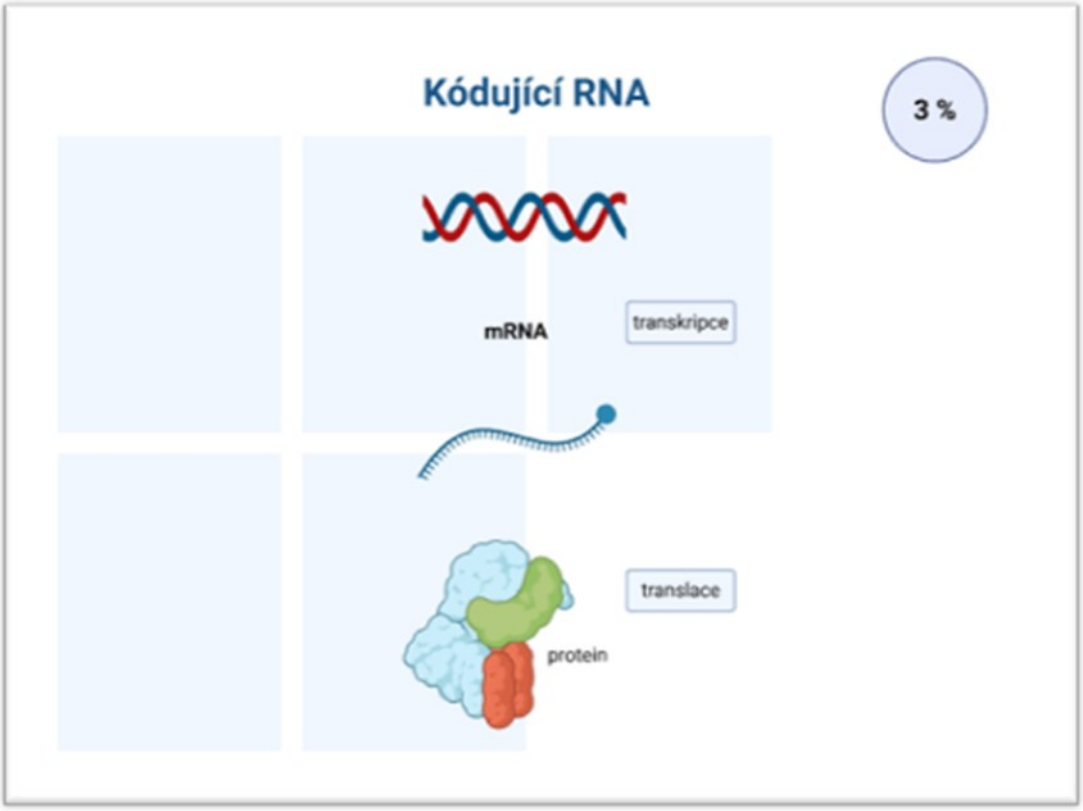
První objevy nekódujících RNA (ncRNA) sahají do poloviny 50. let 20. století, kdy George Palade a Paul Zamecnik popsali ribozomální RNA (rRNA) a transferovou RNA (tRNA), tedy molekuly nezbytné pro translaci. Tyto objevy pomohly vytvořit základní princip molekulární biologie, podle kterého – jak uvedl Francis Crick – musí existovat „adaptérová molekula“, která převádí informaci z nukleových kyselin na aminokyseliny [80].

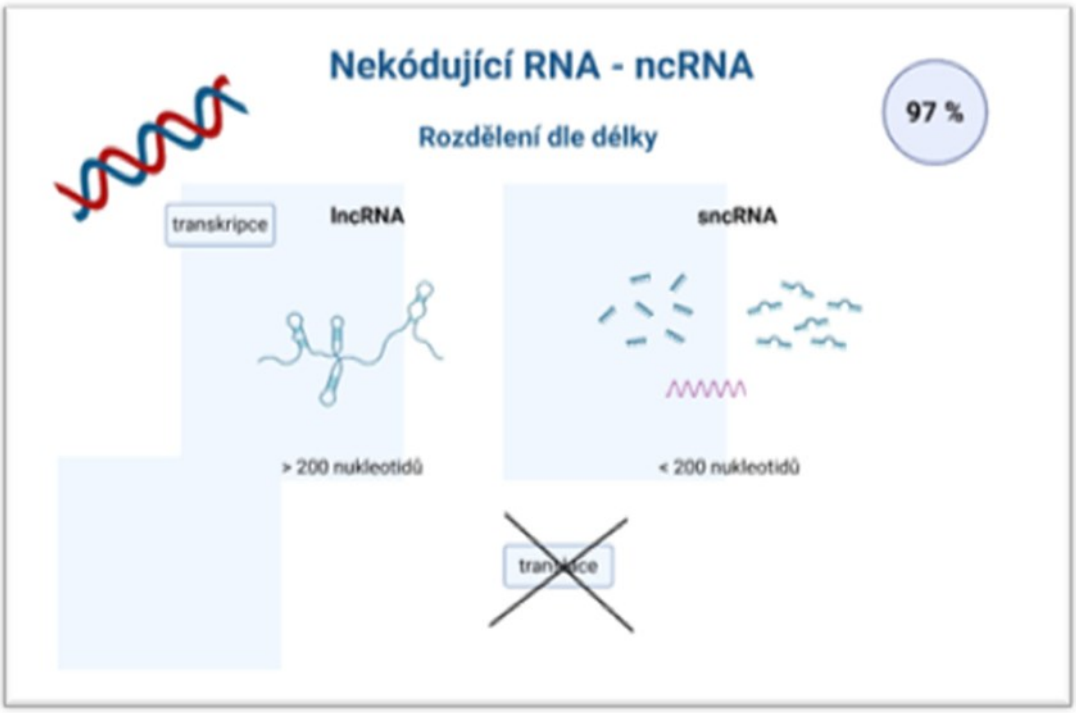
Krátce po objevu messengerové RNA (mRNA) a upřesnění teorie kódujících genů byly identifikovány tzv. housekeeping ncRNA, zejména malé jaderné RNA (snRNA) a malé jadérkové RNA (snoRNA), které hrají klíčovou roli v posttranskripčním zpracování RNA. V 70. letech byly elektronovou mikroskopií poprvé vizualizovány také cirkulární RNA (circRNA), i když byly po mnoho let považovány za vedlejší produkty bez funkčního významu. Podobně i transkripty pocházející z komplementárních sekvencí kódujících genů byly tehdy označovány jako „junk RNA“, přestože již první experimentální studie naznačovaly, že tyto sekvence nemusí být zcela bez funkce [81, 82].

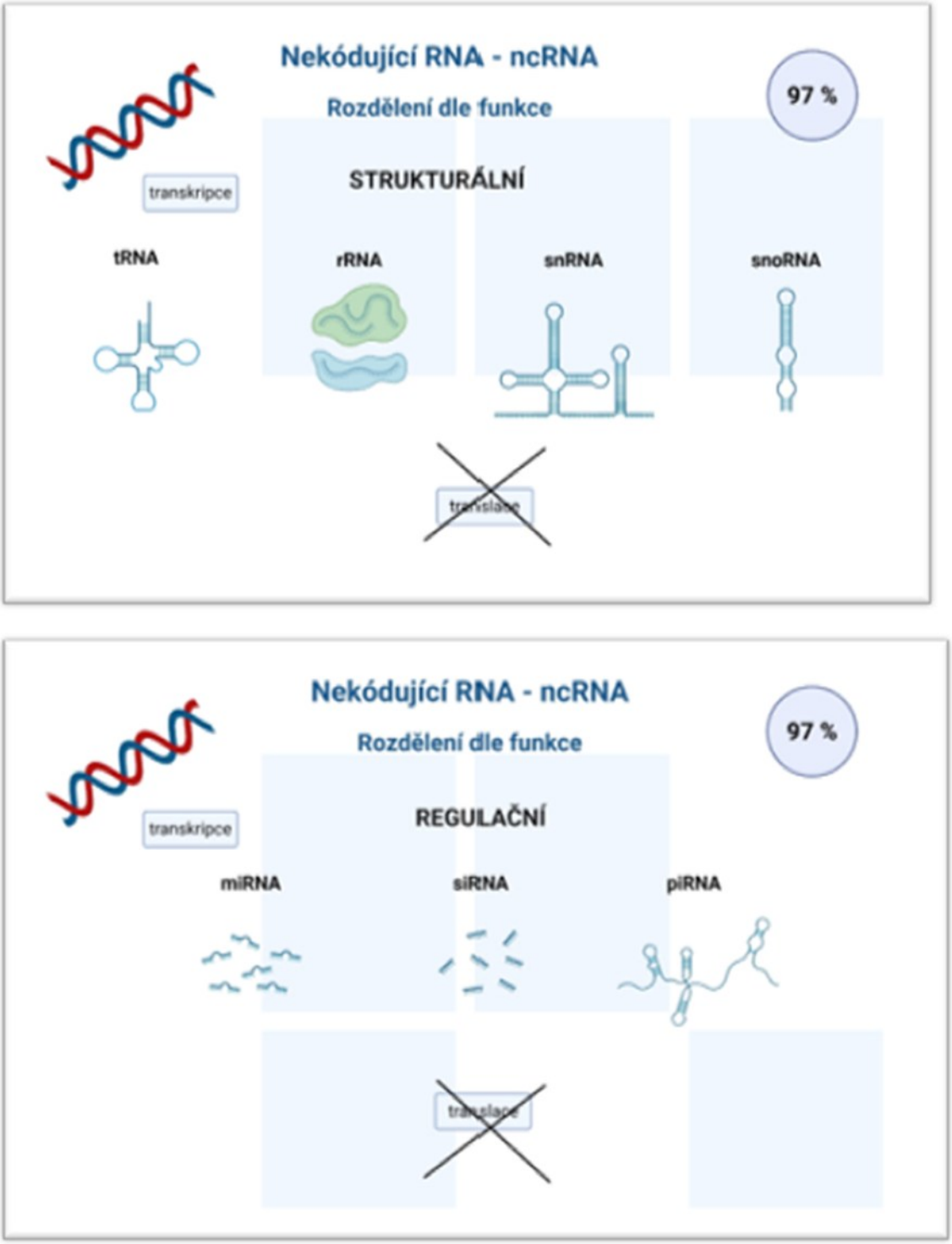
Ve 21. století byly publikovány výsledky dvou velkých genomových projektů – HUGO/Human Genome Project (HGP) a ENCODE. Tyto projekty ukázaly, že přibližně 80 % lidského genomu je transkripčně aktivních, avšak pouze 2–3 % transkriptomu jsou skutečně překládána do proteinů [83, 84]. Tato část se označuje jako kódující RNA,

zatímco zbývajících 97–98 % představuje nekódující RNA (ncRNA), které byly původně považovány za „junk RNA“ [85]. Další výzkumy však jasně prokázaly, že ncRNA mají široké spektrum biologických funkcí navzdory tomu, že nekódují proteiny.

Nekódující RNA jsou dnes klasifikovány buď podle délky na dlouhé (lncRNA) a malé (sncRNA), s hranicí 200 nukleotidů, nebo podle funkce na strukturální a regulační RNA. Strukturální ncRNA – včetně rRNA, tRNA, snRNA a snoRNA – jsou zpravidla stabilně a konstitutivně exprimovány, protože zajišťují základní buněčné procesy. Naproti tomu regulační ncRNA mají dynamickou expresi, která se mění v závislosti na vnitřních a vnějších podnětech, mezi něž patří léčiva, stresové signály nebo přítomnost onemocnění. Tato skupina zahrnuje siRNA (small interfering RNA), piRNA (Piwi-interacting RNA) a zejména mikroRNA (miRNA), které představují nejmenší, avšak funkčně zásadní podskupinu malé nekódující RNA. Jejich variabilní exprese a úzké propojení s buněčnými drahami z nich činí nejen důležité regulátory genové exprese, ale také perspektivní biomarkery a terapeutické cíle v řadě onemocnění včetně osteoporózy a dalších patologií souvisejících se stárnutím (přehled kódujících a nekódujících RNA Obr. 6.) [85, 86].


Kódující RNA
3 %
mRNA
transkripce
translace
protein


Nekódující RNA - ncRNA
97 %
Rozdělení dle délky
transkripce
lncRNA
sncRNA
> 200 nukleotidů
< 200 nukleotidů



Obrázek 6. Přehled kódujících a nekódujících RNA

Zdroj: Vlastní zpracování (vytvořeno v BioRender.com)

1.5 mikroRNA – základní údaje

1.5.1 Objev a terminologie

MikroRNA (miRNA) jsou krátké molekuly nekódující RNA, jejichž délka se obvykle pohybuje v rozmezí 19–22 nukleotidů, které se podílejí na regulaci genové exprese na posttranskripční úrovni. Jejich biologickou funkcí je jemná modulace exprese cílových genů prostřednictvím vazby na komplementární sekvence mRNA, což vede k potlačení translace nebo k degradaci cílové mRNA. Tímto mechanismem miRNA zásadně ovlivňují široké spektrum buněčných procesů, včetně diferenciace, proliferace, odpovědi na stres, buněčné senescence i patofyziologických dějů souvisejících se stárnutím. Zásadní průlom v poznání těchto molekul nastal v roce 1993, kdy výzkumná skupina Victora Ambrose popsala u hlístice Caenorhabditis elegans krátkou RNA molekulu lin-4, která reguluje časování vývojových stadií prostřednictvím posttranskripčního tlumení cílové genové exprese. Tento objev odhalil dosud neznámou úroveň genové regulace a položil základy nového směru molekulární biologie. Pozdější identifikace miRNA let-7, konzervované napříč různými živočišnými druhy včetně člověka, potvrdila univerzální význam tohoto regulačního mechanismu [79, 85, 86, 87, 88, 89]. Následné výzkumy prokázaly, že regulační mechanismus popsaný u miRNA lin-4 není specifický pouze pro tuto molekulu, ale představuje obecný princip posttranskripční regulace genové exprese zprostředkovaný malými RNA. Bylo doloženo, že krátké RNA molekuly o délce přibližně 21 nukleotidů jsou schopny tlumit expresi cílových genů prostřednictvím mechanismu známého jako RNA interference (RNAi), který představuje zásadní regulační nástroj buněčné homeostázy [87, 88, 89]. Významným milníkem v oblasti výzkumu miRNA byl následný objev miRNA let-7, která vykazuje vysoký stupeň evoluční konzervovanosti napříč živočišnými druhy, včetně člověka [90]. Tento objev potvrdil univerzální význam miRNA jako regulátorů genové exprese a odstartoval intenzivní období jejich systematické identifikace a charakterizace. V průběhu následujících let byly popsány tisíce miRNA u širokého spektra organismů a jejich biologické funkce byly postupně spojeny s regulací vývoje, diferenciace, buněčného cyklu, apoptózy, odpovědi na stres i patogeneze řady civilizačních onemocnění [88, 90]. V současnosti databáze miRBase eviduje 48 860 miRNA napříč 271 živočišnými druhy, z čehož přibližně 1 917 miRNA bylo identifikováno u člověka [91]. Další experimentální studie prokázaly, že miRNA

vykazují mimořádnou stabilitu v biologických vzorcích a jejich hladiny zůstávají zachovány i po dlouhodobém skladování při teplotách −80 °C [92], [93]. Tato vlastnost zásadním způsobem rozšířila možnosti využití archivovaných biologických vzorků a otevřela cestu k rozsáhlým retrospektivním studiím založeným na materiálu uloženém v biobankách. Současně přispěla k prudkému nárůstu prospektivních klinických studií zaměřených na hodnocení miRNA jako potenciálních biomarkerů s prediktivním a prognostickým významem v různých terapeutických oblastech.

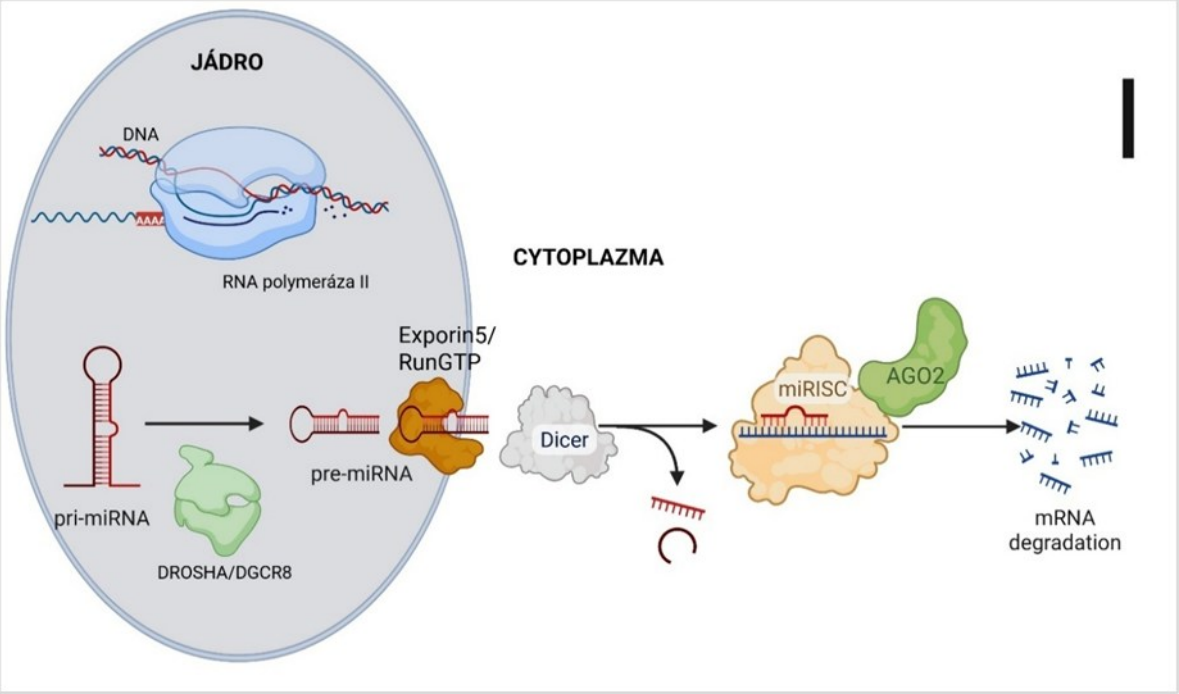
Dynamický rozvoj této oblasti si vyžádal zavedení jednotné a přísně definované nomenklatury miRNA. Standardizovaný název se skládá ze zkratky „miR“ a před ní umístěného třípísmenného prefixu označujícího druhový původ (např. hsa pro Homo sapiens, rno pro Rattus norvegicus), následovaného číselně-písmenným sufixem [94]. Číselná část odráží pořadí objevu konkrétní miRNA (např. miR-1 byla popsána dříve než miR-218), zatímco písmena a, b, c apod. označují strukturálně příbuzné izoformy s mírnou sekvenční odlišností, které mohou vykazovat rozdílné biologické cíle i funkce.

Další úroveň specifikace představuje přípona -3p nebo -5p, která označuje, ze kterého raménka prekurzorové miRNA (3’ nebo 5’) daná zralá miRNA vzniká (např. miR-15a-3p a miR-15a-5p). V některých případech lze za číselným označením nalézt ještě další číslo (např. miR-1-1 a miR-1-2), které reflektuje skutečnost, že identická miRNA může být kódována více genomovými lokusy, přičemž výsledný produkt má stejnou sekvenci, avšak pochází z odlišného genu [94, 95].

1.5.2 Biogeneze miRNA

Geny kódující miRNA jsou v lidském genomu distribuovány napříč různými chromosomy a mohou být uspořádány buď jako samostatné transkripční jednotky, nebo jako součásti miRNA klastrů, které jsou transkribovány společně. Významná část genů pro miRNA je lokalizována v intronových oblastech protein-kódujících genů či nekódujících transkriptů, a to jak jednotlivě, tak ve formě klastrů. Zvláštní postavení zaujímají specifické typy intronových miRNA, zejména tzv. miRtrony a agotrony, které využívají alternativní mechanismy vzniku nezávislé na klasickém mikroprocesorovém komplexu [95, 96]. Biogeneze miRNA probíhá v buňce několika odlišnými cestami, přičemž dominantní je tzv. kanonická dráha (Obr. 7.). V jejím rámci je gen pro miRNA transkribován RNA polymerázou II do podoby primárního transkriptu (pri-miRNA),

který je obvykle dlouhý, jednovláknový a může obsahovat jednu nebo více struktur budoucích miRNA. Pri-miRNA je následně v buněčném jádře rozpoznána mikroprocesorovým komplexem tvořeným RNázou III Drosha a jejím kofaktorem DGCR8, který zajišťuje přesné vystřižení přibližně 60–70 nukleotidů dlouhé prekurzorové miRNA (pre-miRNA) [97]. Vzniklá pre-miRNA má charakteristickou vlásenkovou strukturu tvořenou komplementárními úseky 3′ a 5′ konce, propojenými smyčkovým regionem. Tento hairpin je aktivně transportován z jádra do cytoplazmy prostřednictvím komplexu Exportin-5/Ran-GTP. V cytoplazmě dochází k dalšímu zpracování enzymem Dicer, který odstraní terminální smyčku a generuje krátký dvouvláknový miRNA duplex o délce přibližně 21–23 nukleotidů. Tento duplex je následně navázán na protein Argonaute (nejčastěji AGO2), kde dochází k selekci funkčního vlákna (guide strand), zatímco komplementární vlákno (passenger strand) je degradováno. Funkční vlákno je poté začleněno do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), který zprostředkovává posttranskripční regulaci cílové mRNA prostřednictvím její degradace nebo inhibice translace [98, 99].



Obrázek 7. Kanonická biogeneze miRNA

Zdroj: Vlastní zpracování (vytvořeno v BioRender.com)

Odchylky od výše popsané biogeneze vykazují tzv. miRtrony a agotrony.

Vedle této kanonické dráhy existují i nekanonické mechanismy biogeneze miRNA. MiRtrony představují specifickou třídu miRNA lokalizovanou v intronech hostitelských genů, které jsou po sestřihu na spliceosomu přímo formovány do pre-miRNA bez nutnosti štěpení mikroprocesorovým komplexem Drosha/DGCR8. Tyto pre-miRNA jsou následně exportovány do cytoplazmy a dále zpracovány enzymem Dicer analogicky ke kanonické dráze.

Agotrony představují ještě odlišnější mechanismus, kdy extrémně krátké introny po vystřižení během splicingu neprocházejí ani zpracováním mikroprocesorem, ani štěpením enzymem Dicer, ale jsou přímo asociovány s Argonauteovými proteiny a tvoří funkčně aktivní komplexy miRISC.

Tato komplexita biogeneze miRNA odráží jemně regulovaný charakter miRNA systému, jenž umožňuje přesnou kontrolu genové exprese v závislosti na buněčném typu, vývojovém stadiu i patofyziologickém kontextu [97, 98, 100].

1.5.3 Role miRNA

Pro rozpoznání cíle slouží tzv. kořenová sekvence (anglicky seed region), která je tvořena druhým až osmým nukleotidem v molekule miRNA. Pokud je komplementarita mezi kořenovou sekvencí a cílovou sekvencí mRNA úplná, tak vazba miRISC působí degradaci cílové mRNA, je-li komplementarita neúplná, tak miRISC zablokuje proces translace, avšak hladiny cílové mRNA neovlivní. V obou popsaných případech vede vazba miRISC na cílovou mRNA ke snížení hladin cílového proteinu a hovoříme tak o negativní posttranskripční regulaci. Cílová místa, do nichž se miRNA vážou, se ve většině případů nacházejí 3´ nepřekládané oblasti (tzv. 3´UTR z anglického untranslated region) vlastní mRNA.

Obecně platí, že jedna miRNA má většinou více různých cílů, z nichž některé mohou být např. součástí jedné signální či metabolické dráhy, a zároveň platí, že jedna mRNA může být cílem pro více miRNA, které pak vzájemně kompetují [99, 100]. Tím se zásadně komplikuje jednoznačné přiřazení funkcí jednotlivým miRNA a charakterizace jejich specifických biologických účinků.

2 Cíle disertační práce

2.1 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.

2.1.1 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.

3 Metodika

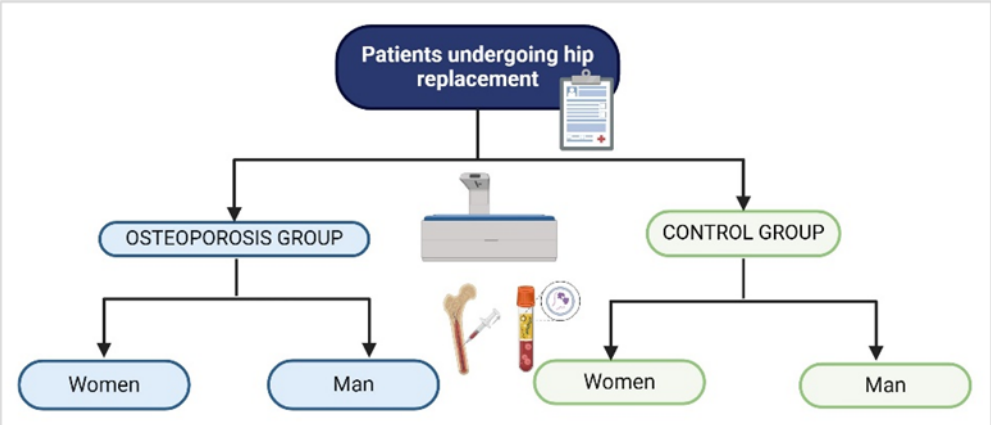
3.1 Design studie

Jednocentrická průřezová observační studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (201905 S10P). Schválené protokoly zahrnovaly odběr vzorků krve v rámci předoperačního vyšetření a odběru bioptických vzorků z krčku femuru po jeho vynětí z těla operovaného pacienta. Každý účastník poskytl písemný informovaný souhlas před zařazením do studie. Dotazník FRAX byl vyplněn na základě údajů pacientů. V naší práci byly biopsie krčku femuru stehenní kosti prováděny u pacientů podstupujících totální endoprotézu kyčelního kloubu buď z důvodu osteoporózy manifestované nízkotraumatickou frakturou proximálního femuru, nebo elektivních indikací, jako je osteoartróza.

3.2 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 (průměrný věk ± SD: 70,4 ± 7,8 let), kteří byli indikovaní 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 (osteoporotickou). 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). Vylučovací kritéria pro zařazení pacientů do studie nebyla stanovena.

Tyto dvě skupiny byly testovány na základě nulové hypotézy, že mezi těmito dvěma skupinami není žádný rozdíl v expresi sady miRNA spojených se stárnutím a osteoporózou. Screening ve studii zahrnoval odběr anamnézy, provedení DXA a odběr krve na biochemické laboratorní vyšetření. Do sledovaného panelu jsme zařadili sérové hladiny kalcia (Ca), sérového 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).



Obrázek 8. Design studie

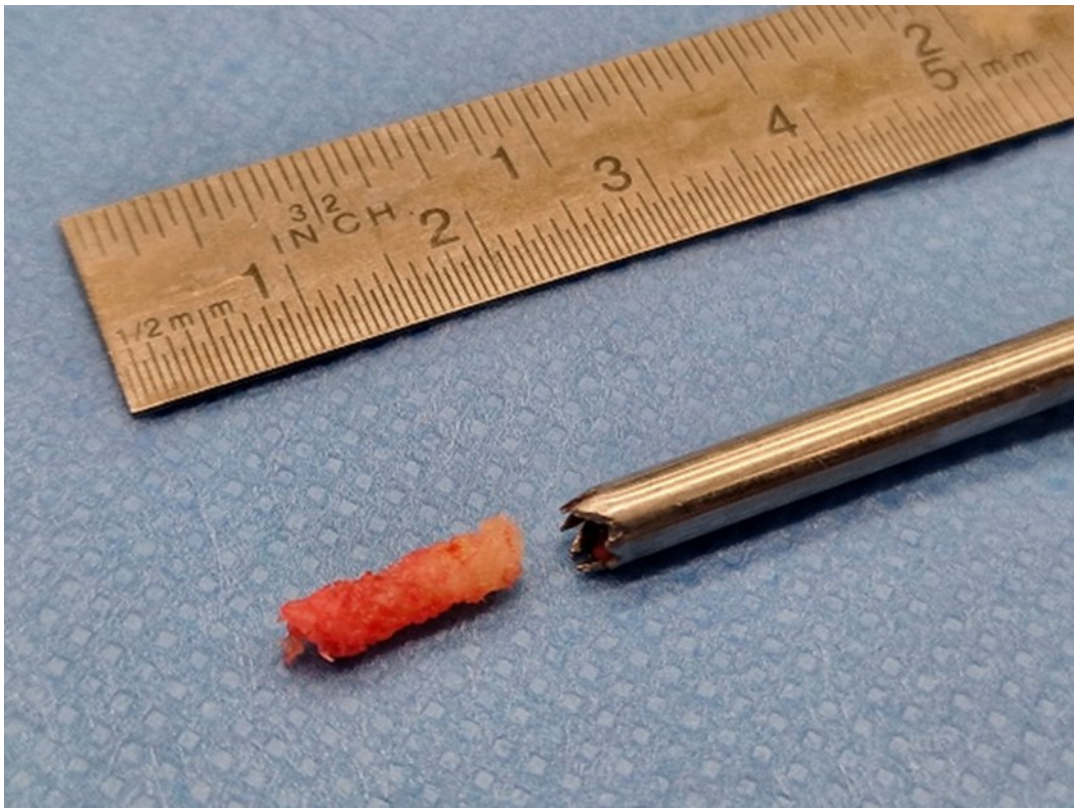
Zdroj: Vlastní zpracování (vytvořeno v BioRender.com)

3.3 Sběr vzorků kostí

V této studii byly provedeny biopsie z krčku stehenní kosti u pacientů podstupujících totální endoprotézu kyčelního kloubu buď kvůli frakturám proximálního femuru vyvolaným traumatem (n = 21), nebo kvůli elektivním indikacím, jako je osteoartróza (n = 25). Vzorky kostí byly odebírány během implantace endoprotézy, čímž bylo zajištěno, že postup nepředstavuje pro pacienta žádnou další zátěž. Totální náhrada kyčelního kloubu byla provedena anterolaterálním Bauerovým přístupem v obou skupinách. Po incizi fascia lata a odpojení musculus gluteus medius a minimus byla provedena kapsulotomie kyčelního kloubu podél osy krčku femuru s následnou resekcí kloubního pouzdra zajišťující přístup ke kosti. Byla provedena osteotomie na bázi krčku femuru, v místě, kde se připojuje k trochanterické oblasti. Po dokončení osteotomie byla končetina umístěna v addukci, což umožnilo volný přístup do dřeňové dutiny krčku femuru a hlavice stehenní kosti. U pacientů se zlomeninami byla dřeňová dutina přístupná i bez osteotomie.

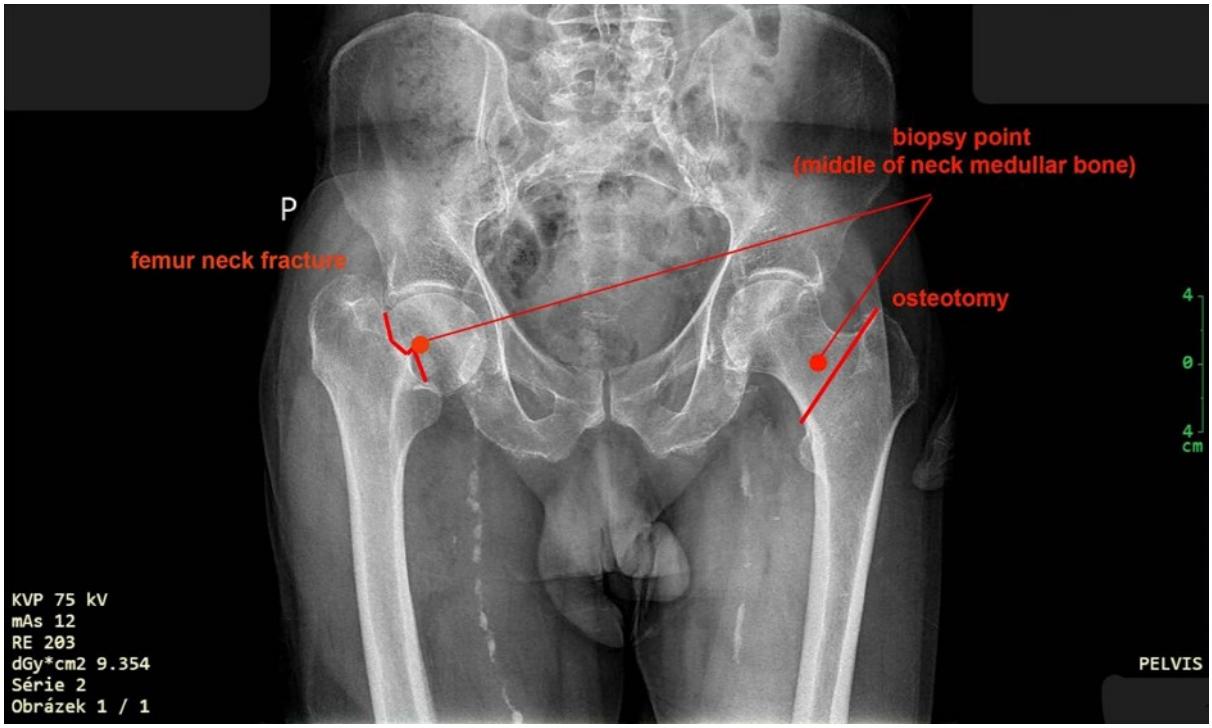
Vzorky kostí byly získány pomocí bioptické soupravy s vnitřním průměrem 3 mm, která měla na špičce ostré zuby. Byl odebrán cylindrický vzorek kosti z krčku stehenní kosti a poté vytlačen z bioptické soupravy na sterilní roušku. Kost z místa osteotomie byla ostře vyříznuta skalpelem a odstraněna, zatímco válcovitý vzorek kosti o délce 5–8 mm (Obr. 9.) byl získán z centrální části krčku femuru (Obr. 10.). Naším cílem bylo vyhnout se použití kosti z bezprostřední blízkosti osteotomie kvůli obavám z mechanického nebo

tepelného poškození způsobeného oscilační pilou. Odebraný vzorek kosti byl umístěn do předem připravené zkumavky obsahující 1,5 ml činidla TRIzol™ (Invitrogen, Gaithersburg, MD) a uchován při teplotě -80 °C až do dalšího zpracování.



Obrázek 9. Válcovitý vzorek kosti

Zdroj: S laskavým svolením MUDr. Petra Hozy z jeho osobní knihovny



Obrázek 10. Lokalita osteotomie a místa biopsie kosti

Zdroj: S laskavým svolením MUDr. Petra Hozy z jeho osobní knihovny

3.4 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 pomocí přístroje MagNA Lyser (Roche) po dobu 90 sekund při 7 000 × g. V případech nedostatečné homogenizace byly vzorky znovu homogenizovány po dobu dalších 30 sekund. Po vyjmutí z přístroje byly zkumavky okamžitě umístěny na zmrazený stojan. Homogenáty byly následně centrifugovány za účelem odstranění nerozpuštěných částic kostní tkáně a buněčných zbytků, čímž byl získán homogenní lyzát vhodný pro další zpracování. Celkem 700 µl supernatantu bylo přeneseno do nové 1,5ml mikrozkumavky a ponecháno inkubovat 5 minut při pokojové teplotě, aby došlo k úplné disociaci nukleoproteinových komplexů.

Izolace celkové RNA byla provedena pomocí soupravy miRNeasy Mini Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce s drobnými úpravami, přičemž tento postup umožňuje účinné obohacení miRNA a RNA kratších než 200 nukleotidů. K homogenátu bylo přidáno 140 µl chloroformu (chloroform s isoamylalkoholem), vzorek byl důkladně promíchán po

dobu alespoň 15 sekund a inkubován 2–3 minuty při pokojové teplotě. Následně byl centrifugován po dobu 15 minut při 12 000 × g při 4 °C za účelem fázové separace.

Vodní fáze (vrchní vrstva) byla opatrně přenesena do nové 1,5ml mikrozkumavky s důrazem na nenarušení rozhraní mezi jednotlivými fázemi. Následně byl přidán objem 96% ethanolu odpovídající 1,5násobku objemu vodní fáze (typicky 525 µl) a směs byla důkladně promíchána pipetováním. Z každého vzorku bylo 700 µl směsi přeneseno na kolonu a centrifugováno po dobu 15 sekund při 8 000 × g při pokojové teplotě; tento krok byl dvakrát opakován.

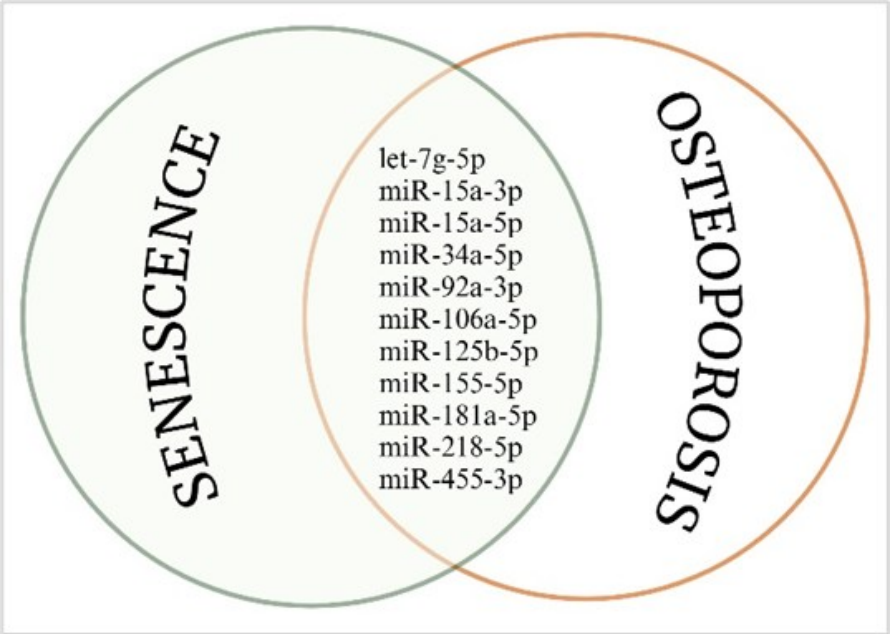
Následně bylo do kolony přidáno 700 µl pufru RWT a vzorek byl centrifugován po dobu 15 sekund při 8 000 × g. Po odstranění průtoku bylo do kolony přidáno 500 µl pufru RPE a centrifugace byla zopakována za stejných podmínek.

Izolace celkové RNA byla provedena podle protokolu výrobce s drobnými úpravami. RNA včetně frakce miRNA byla eluována v 30 µl vody bez RNáz. Po izolaci byly vzorky buď ihned dále zpracovány, nebo skladovány při −80 °C.

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

3.5 Panel miRNA související s osteoporózou

Pro tuto studii byl vytvořen unikátní panel studovaných miRNA. Tyto cílové miRNA byly vybrány tak, aby se účastnily procesů vedoucích jak osteoporóze, tak k senescenci. Výběr byl založen na datech z databáze miRNet a na literárním přehledu studií využívajících lidské vzorky (Obr. 11.).



Obrázek 11. Vybraný panel miRNA

Zdroj: Vlastní zpracování (vytvořeno v BioRender.com)

3.6 Kvantitativní Real-time PCR mikroRNA

Syntéza cDNA byla provedena pomocí TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit s univerzálními reverzními transkripčními primery (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) podle protokolu výrobce s 8–10 ng celkové RNA v reakci. PCR v reálném čase byla provedena pomocí TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a specifických TaqMan® Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) na přístroji Rotor-Gene Q (Qiagen). Byly použity sondy pro kvantifikaci maturovaných sekvencí hsa-miR-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, hsa-miR-455-3p (Tab. 1.) a hsa-miR-361-5p a hsa-miR-16-5p jako endogenní kontroly. Všechny kroky byly provedeny podle protokolu výrobce. Všechny reakce byly provedeny v triplikátech a reakční objem byl 10 µl s 2,5 µl vzorku. Reakční podmínky byly nastaveny podle protokolu výrobce a zahrnovaly aktivaci enzymu při 95 °C po dobu 20 s, po které následovalo 40 cyklů denaturace při 95 °C po dobu 3 s a nasedání/extenze při 60 °C po dobu 30 s. Fluorescenční data byla analyzována v softwaru Rotor-Gene Q Series Software. Exprese vyjádřená pomocí ΔCt každé miRNA byla stanovena pomocí metody 2^−ΔCt, s hladinami exprese

hsa-miR-361-5p a hsa-miR-16-5p pro normalizaci dat. Tento pracovní postup byl zvolen na základě přehledu literatury a doporučení výrobce pro endogenní kontroly uvedené v uživatelské příručce pro TaqMan® Advanced miRNA Assays.

Tabulka 1. Maturované sekvence vybraných miRNA

Assay ID	Assay Name	Mature miRNA Sequence	Chromosome Location
478580_mir	hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	Chr.3: 52268278 - 52268361 [-] on Build GRCh38
477928_mir	hsa-miR-15a-3p	CAGGCCAUAUUGUGCUGCCUCA	Chr.13: 50049119 - 50049201 [-] on Build GRCh38
477858_mir	hsa-miR-15a-5p	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	Chr.13: 50049119 - 50049201 [-] on Build GRCh38
478048_mir	hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	Chr.1: 9151668 - 9151777 [-] on Build GRCh38
477827_mir	hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	Chr.13: 91351314 - 91351391 [+] on Build GRCh38
478225_mir	hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	Chr.10: 134170198 - 134170278 [-] on Build GRCh38
477885_mir	hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	Chr.11: 122099757 - 122099844 [-] on Build GRCh38
483064_mir	hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU	Chr. 21 - 25573980 - 25574044 [+] on Build GRCh38
479405_mir	hsa-miR-181a-5p	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC	Chr.1: 198859044 - 198859153 [-] on Build GRCh38
477977_mir	hsa-miR-218-5p	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	Chr.4: 20528275 - 20528384 [+] on Build GRCh38
478112_mir	hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC	Chr.9: 114209434 - 114209529 [+] on Build GRCh38

Zdroj: Vlastní zpracování

3.7 Statistické analýzy

Základní charakteristiky souboru byly popsány pomocí průměru ± směrodatné odchylky (SD). Porovnání středních hodnot mezi skupinou pacientů s osteoporózou (OP) a kontrolní skupinou bylo provedeno pomocí Studentova t-testu pro nezávislé výběry. Všechny statistické testy byly dvoustranné a hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

Statistické analýzy exprese miRNA byly provedeny pomocí softwarového systému STATISTICA, verze 13 (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, USA). Hladiny exprese jednotlivých miRNA byly stanoveny na základě hodnot Ct získaných kvantitativní real-time PCR analýzou, přičemž každé měření bylo provedeno v triplikátech. Pro následné výpočty byla použita průměrná hodnota Ct každého vzorku. Normalita rozložení dat byla ověřena pomocí Shapiro–Wilkova testu.

Pro porovnání exprese miRNA mezi OP a kontrolní skupinou byly použity hodnoty ΔCt, kde nižší hodnota ΔCt odpovídá vyšší expresi dané miRNA. Ke statistickému porovnání těchto hodnot mezi skupinami byl použit Studentův t-test. Nulová hypotéza předpokládala absenci rozdílu v expresi miRNA mezi sledovanými skupinami.

Relativní změny exprese miRNA mezi skupinami byly vyjádřeny jako fold change (FC), vypočtený metodou relativní kvantifikace $2^{-\Delta Ct}$ 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 přehledné grafické znázornění změn exprese jednotlivých miRNA 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), ve kterém 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.

Všechny vícerozměrné statistické analýzy byly provedeny v softwaru R Commander. Statistická významnost byla stanovena na hladině $p < 0,05$.

4 Výsledky

4.1 Vstupní charakteristiky souboru

Základní demografické a klinické parametry souboru jsou uvedeny v Tabulce 2. Průměrný věk ve skupině s osteoporózou činil 72 ± 7,29 roku, zatímco v kontrolní skupině to bylo 69 ± 8,06 roku (p = 0,29). Podíl žen byl v obou skupinách srovnatelný: 67 % (n = 14) v OP skupině a 72 % (n = 18) v kontrolní skupině (p = 0,70). Podobně podíl mužů byl vyrovnaný: 33 % (n = 7) ve skupině s OP a 28 % (n = 7) v kontrolní skupině (p = 1,00).

Prevalence kuřáctví se mezi skupinami nelišila: 40 % (n = 10) u pacientů s OP oproti 43 % (n = 9) v kontrolní skupině (p = 0,85). Hodnoty BMI byly však statisticky významně nižší u skupiny s OP (27 ± 3,43) ve srovnání s kontrolní skupinou (30 ± 4,65; p = 0,01).

Hodnoty BMD proximálního femuru byly mezi skupinami srovnatelné (1,0 ± 0,18 g/cm³ u OP vs. 1,0 ± 0,20 g/cm³ u kontroly; p = 0,56).

Mezi OP skupinou a kontrolní skupinou nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ve věku, pohlaví ani kouření. OP skupina měla signifikantně nižší BMI (27 ± 3,43 vs. 30 ± 4,65; p = 0,01). Hodnoty BMD proximálního femuru (g/cm³) se mezi skupinami nelišily (p = 0,56).

Hladiny CTX-I byly v OP skupině vyšší (938,5 ± 646,8 ng/l) než v kontrolní skupině (594,0 ± 285,3 ng/l; p = 0,04); referenční rozmezí CTX-I pro dospělé 18–99 let v Pardubické nemocnici je 70–700 ng/l. Průměrná hodnota v OP skupině přesahovala horní hranici referenčního rozmezí, zatímco kontrolní skupina se nacházela v jeho horním pásmu.

Hladiny P1NP byly v OP skupině rovněž vyšší (93,2 ± 85,5 µg/l) než v kontrolní skupině (59,5 ± 24,4 µg/l), rozdíl však nedosáhl statistické významnosti (p = 0,07); referenční rozmezí P1NP pro dospělé 18–99 let v Pardubické nemocnici je 20–70 µg/l. Průměrná hladina P1NP v OP skupině byla nad referenčním intervalem, zatímco kontrolní skupina se nacházela v horním pásmu referenčního rozmezí.

Tabulka 2. Základní vstupní charakteristiky souboru

Parametry	OP skupina (průměr ± SD) n = 21	Kontrolní skupina (průměr ± SD) n = 25	p-hodnota
Věk (roky)	72 ± 7,29	69 ± 8,06	0,29
Žena	67 % (n = 14)	72 % (n = 18)	0,7
Muž	33 % (n = 7)	28 % (n = 7)	1
Kuřák (ano, %) [a]	40 % (n = 10)	43 % (n = 9)	0,85
BMI	27 ± 3,43	30 ± 4,65	0,01*
BMD prox. femur (g/cm³)	1,0 ± 0,18	1,0 ± 0,20	0,56
CTX-I ng/l[b]	938,5 ± 646,8	594 ± 285,3	0,04*
P1NP µg/l[b]	93,2 ± 85,5	59,5 ± 24,4	0,07

[a] Informace, které účastníci sami nahlásili

[b] Referenční rozmezí Pardubické nemocnice pro 18 až 99 let: CTX-I 70–700 ng/l P1NP 20–70 µg/l

*Statisticky významné hodnoty (p < 0,05)

Zdroj: Vlastní zpracování

Další biochemické a denzitometrické parametry jsou uvedeny v Tabulce 3.

Hladiny 25(OH) vitaminu D byly 39,4 ± 20,2 nmol/l v OP skupině a 44,1 ± 20,6 nmol/l v kontrolní skupině (p = 0,47); referenční rozmezí 75–250 nmol/l. Obě skupiny měly průměrné hodnoty pod referenčním rozmezím.

Hladina celkového kalcia v séru byla v OP skupině 2,05 ± 0,13 mmol/l a v kontrolní skupině 2,15 ± 0,12 mmol/l (p = 0,023); referenční rozmezí 2,18–2,60 mmol/l. Průměrná hodnota OP skupiny byla pod dolní hranicí referenčního intervalu, zatímco kontrolní skupina se nacházela těsně u dolní hranice referenčního rozmezí.

Hodnoty sérového fosforu činily 1,07 ± 0,22 mmol/l v OP skupině a 1,02 ± 0,15 mmol/l v kontrolní skupině (p = 0,41); referenční rozmezí 0,78–1,65 mmol/l. Průměrné hodnoty OP i kontrolní skupiny se nacházely v rámci referenčního intervalu.

Hladiny ALP-KI byly 12,6 ± 6,2 µg/l v OP skupině a 10,4 ± 3,8 µg/l v kontrolní skupině (p = 0,17). Průměrné hodnoty v obou skupinách se nacházely v rámci referenčního rozmezí (8–17,9 µg/l).

Hladina celkové bílkoviny byla v OP skupině 59,5 ± 6,2 g/l a v kontrolní skupině 64,6 ± 8,1 g/l ($p = 0,033$); referenční rozmezí 57–82 g/l. OP skupina se nacházela těsně pod dolní hranicí referenčního rozmezí, kontrolní skupina v jeho intervalu.

Hladiny volného tyroxinu (fT4) byly ve skupině OP významně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou (18,9 ± 2,0 vs. 14,9 ± 2,3 pmol/l; $p < 0,001$). Přesto se průměrné hodnoty fT4 v obou skupinách nacházely v rámci referenčního rozmezí (11,5–22,7 pmol/l).

Hladiny TSH činily 1,52 ± 0,96 mIU/l v OP skupině a 1,65 ± 1,18 mIU/l v kontrolní skupině ($p = 0,70$); referenční rozmezí 0,55–4,78 mIU/l. Průměrné hodnoty obou skupin byly v rámci referenčního rozmezí.

Parametry FRAX se mezi skupinami nelišily. Vypočtené riziko pro tzv. velkou osteoporotickou zlomeninu bylo 9,97 ± 6,52 % v OP skupině a 10,91 ± 8,94 % v kontrolní skupině ($p = 0,71$). Hodnoty rizika zlomeniny kontralaterálního krčku femuru byly 4,06 ± 4,36 % vs. 4,75 ± 5,87 % ($p = 0,68$).

Denzitometrické parametry ukázaly nižší hodnoty T-skóre a Z-skóre v oblasti proximálního femuru v OP skupině. Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány pro T-skóre femur total ($p = 0,03$), Z-skóre femur total ($p < 0,001$) a Z-skóre krčku femuru ($p = 0,003$). Pro oblast L1–L4 nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ani v T-skóre, ani v Z-skóre.

Tabulka 3. Další vstupní charakteristiky souboru

Parametry	OP skupina (průměr ± SD) n = 21	Kontrolní skupina (průměr ± SD) n = 25	p-hodnota
25(OH)D (nmol/l) [b]	39.4 ± 20.2	44.1 ± 20.6	0.47
Ca mmol/l [b]	2.05 ± 0.13	2.15 ± 0.12	**0.023***
P mmol/l [b]	1.07 ± 0.22	1.02 ± 0.15	0.41
ALP-KI µg/l [b]	12.6 ± 6.2	10.4 ± 3.8	0.17
Celková bílkovina g/l [b]	59.5 ± 6.2	64.6 ± 8.1	**0.033***
fT4 pmol/l [b]	18.9 ± 2.0	14.9 ± 2.3	**≤ 0.001***
TSH mIU/l [b]	1,52 ± 0,96	1,65 ± 1,18	0,7
FRAX velká OP (%)	9.97 ± 6.52	10.91 ± 8.94	0.71
FRAX krček femuru (%)	4.06 ± 4.36	4.75 ± 5.87	0.68
T-skóre femur total	-1.28 ± 1.03	-0.45 ± 1.30	**0.03***
T-skóre krček	-1.39 ± 1.27	-0.64 ± 1.47	0.09
Z-skóre femur total	-0.68 ± 0.93	0.73 ± 1.06	**≤ 0.001***
Z-skóre krček	-0.54 ± 0.68	0.50 ± 1.22	**0.003***
T-skóre L1–L4	-0.46 ± 1.65	-0.10 ± 1.53	0.48
Z-skóre L1–L4	0.47 ± 1.55	0.68 ± 1.36	0.64

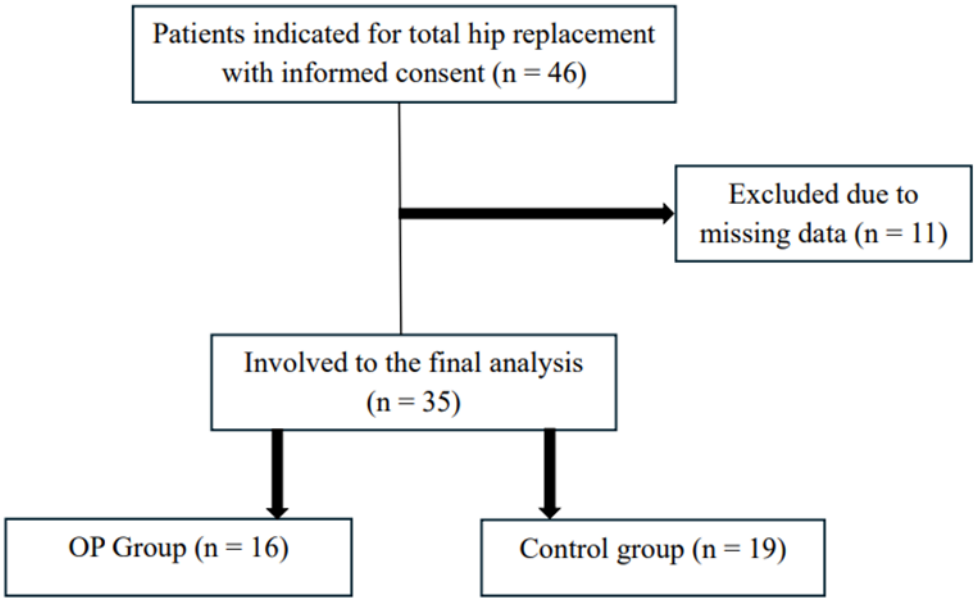
*Statisticky významné hodnoty ($p < 0,05$)

[b] Referenční rozmezí Pardubické nemocnice: 25(OH) vitamin D 75 – 250 nmol/l; Ca 2,18 – 2,6 mmol/l; P 0,78 – 1,65 mmol/l; ALP-KI 8 – 17,9 µg/l, celková bílkovina 57 - 82 g/l; fT4 11,5 – 22,7 pmol/l; TSH 0,55 – 4,78 mIU/l

Zdroj: Vlastní zpracování

4.2 Exprese mikroRNA

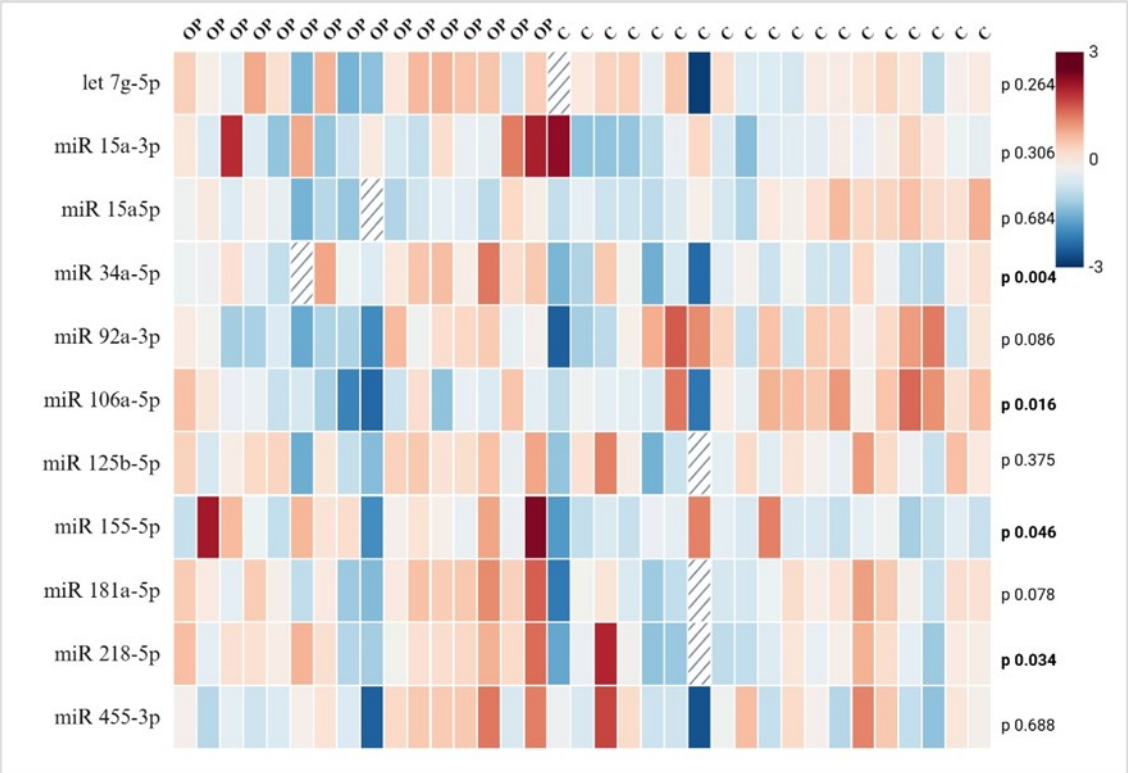
U 11 pacientů nebylo možné spolehlivě kvantifikovat expresi některých miRNA zahrnutých v panelu (Obr. 12.); tyto chybějící hodnoty nebyly imputovány. Tito pacienti proto nebyli zahrnuti do finálních molekulárních analýz, aby se předešlo zkreslení výsledků v následné multivariační analýze (GLM).



Obrázek 12. Soubor pro hodnocení úrovní exprese miRNA

Zdroj: Vlastní zpracování

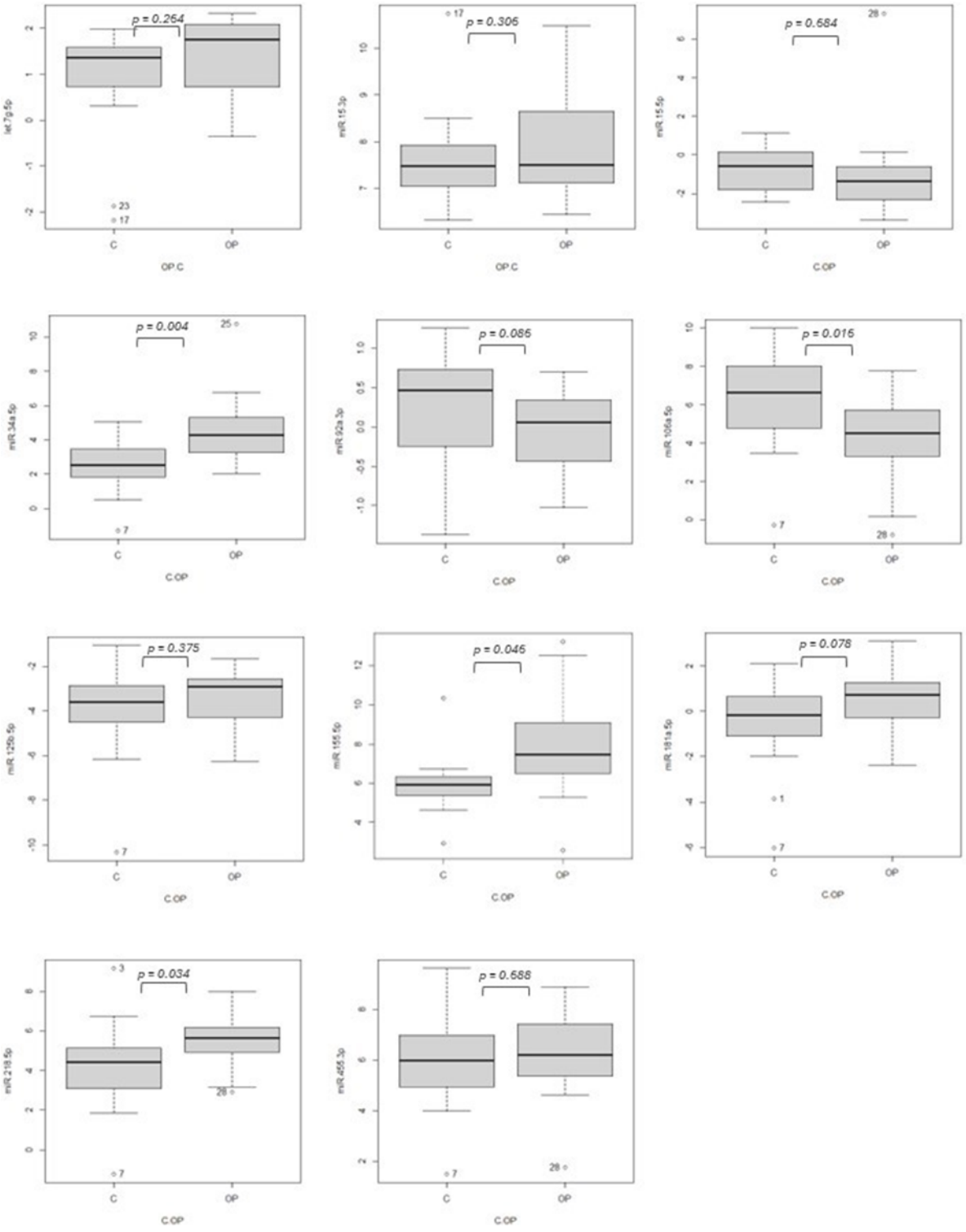
Hladiny exprese miRNA byly mezi OP a kontrolní skupinou porovnávány na základě hodnot ΔCt, kde nižší hodnoty ΔCt indikují vyšší expresi příslušné miRNA. Pro celkový přehled jsou hodnoty ΔCt jednotlivých miRNA v každém vzorku graficky znázorněny formou heatmapy (Obr. 13.). P-hodnoty < 0,05 indikují statisticky významné rozdíly v expresi mezi OP a kontrolní skupinou.



Obrázek 13. ΔCt jednotlivých miRNA celého souboru v heatmapě

Zdroj: Vlastní zpracování (vytvořeno v BioRender.com)

Statisticky významné rozdíly v expresi (vyjádřené pomocí ΔCt) mezi OP a kontrolní skupinou byly pozorovány pro miR-34a-5p (p = 0,004), miR-106a-5p (p = 0,016), miR-155-5p (p = 0,046) a miR-218-5p (p = 0,034). U miR-92a-3p (p = 0,086) a miR-181a-5p (p = 0,078) nebyl dosažen práh statistické významnosti při hladině alfa 5 %, jejich p-hodnoty však naznačují možný trend k rozdílné expresi. Naopak u let-7g-5p (p = 0,264), miR-15a-3p (p = 0,306), miR-125b-5p (p = 0,375), miR-15a-5p (p = 0,684) a miR-455-3p (p = 0,688) nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v expresi (Obr. 14.).



Obrázek 14. Boxplot hodnot ΔCt miRNA v OP vs. kontrolní skupině

Zdroj: Vlastní zpracování (R Commander)

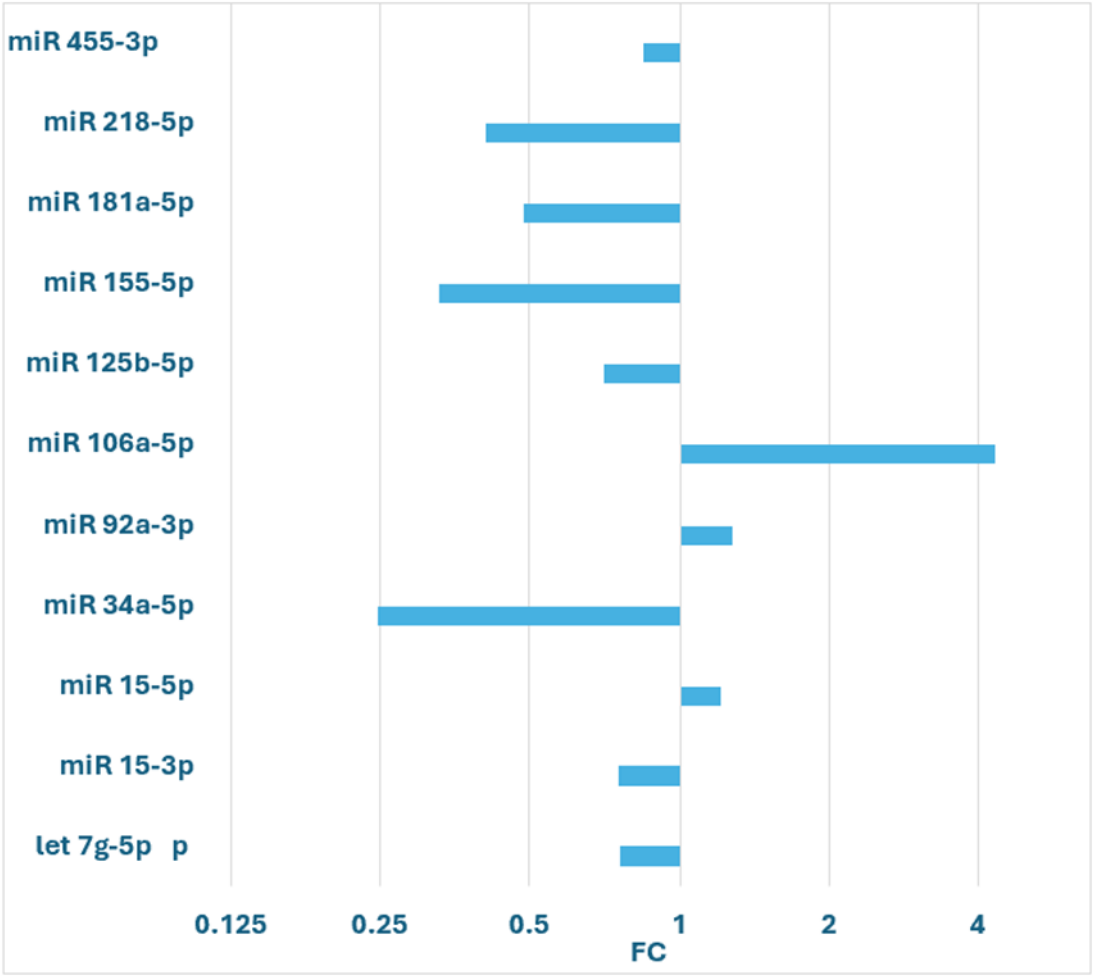
4.3 Relativní exprese miRNA (fold change)

Relativní změny exprese mezi skupinami byly vyjádřeny jako fold change (FC), vypočtené metodou relativní kvantifikace $2^{-\Delta\Delta Ct}$ s použitím vybrané endogenní kontroly. Statisticky významná upregulace byla definována jako $p < 0,05$ a $FC > 2,0$, zatímco statisticky významná downregulace byla stanovena jako $p < 0,05$ a $FC < 0,5$ ve vztahu k expresi v kontrolní skupině.

Mezi analyzovanými miRNA vykazovala miR-106a-5p nejvýraznější upregulaci ve skupině OP, s hodnotou FC přibližně 4, což odpovídá přibližně čtyřnásobnému zvýšení exprese oproti kontrolní skupině. MiR-92a-3p a miR-15a-5p vykazovaly tendenci k upregulaci, s hodnotami FC mírně nad 1, avšak bez statistické významnosti.

Naopak miR-34a-5p byla silně downregulována, s FC přibližně 0,25, což naznačuje asi čtyřnásobně nižší expresi ve skupině OP ve srovnání s kontrolou. MiR-155-5p, miR-181a-5p a miR-218-5p byly rovněž downregulovány, s hodnotami FC 0,33, 0,49 a 0,41.

Let-7g-5p ($p = 0,264$), miR-15a-3p ($p = 0,305$), miR-125b-5p ($p = 0,375$) a miR-455-3p ($p = 0,688$) vykazovaly minimální až žádnou deregulaci, bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami OP a kontrolou (Obr. 15.).



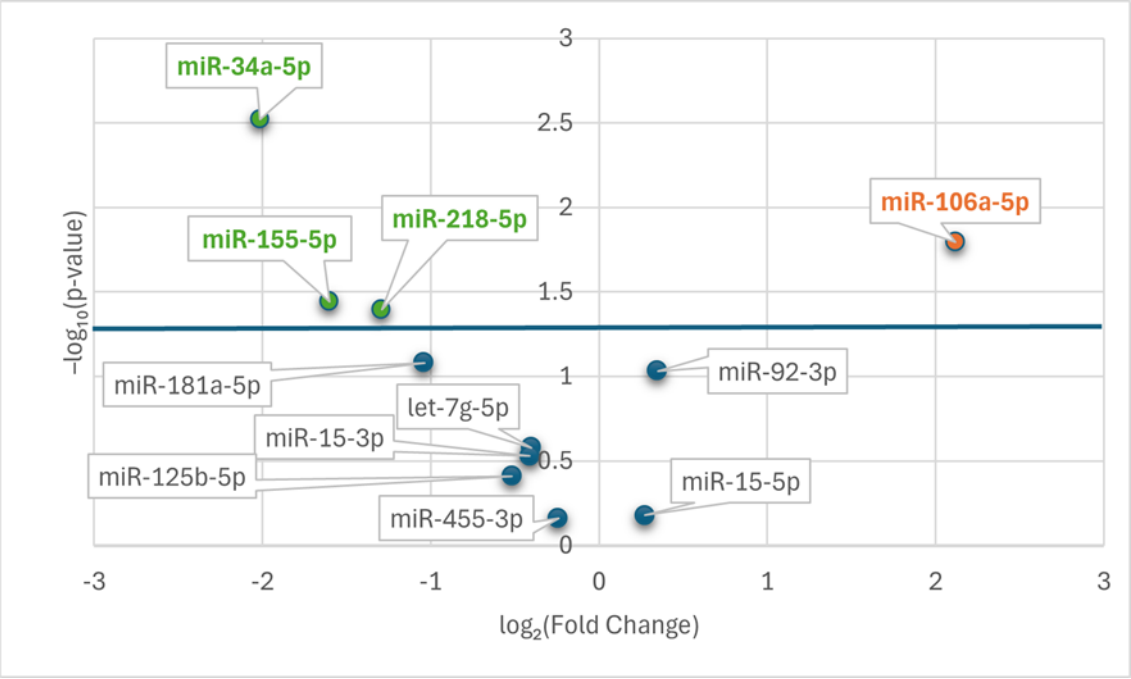
Obrázek 15. Fold Change miRNA

Zdroj: Vlastní zpracování

Pro přehledné grafické znázornění změn exprese jednotlivých miRNA byly hodnoty fold change (FC) převedeny na logaritmickou škálu (log_2FC) a zobrazeny pomocí volcano plotu (Obr. 16.). Tento typ grafu umožňuje současně posoudit směr a velikost změny exprese (osa X) i statistickou významnost rozdílů mezi skupinami (osa Y). MiRNA lokalizované dále od středové osy vykazují větší změny exprese, zatímco miRNA umístěné výše v grafu dosahují vyšší statistické významnosti.

Na základě tohoto zobrazení byla jako nejvýrazněji downregulovaná miRNA v osteoporotické skupině identifikována miR-34a-5p, která vykazovala jak výrazný pokles exprese, tak vysokou statistickou významnost. Dalšími statisticky signifikantně downregulovanými miRNA byly miR-155-5p a miR-218-5p, u nichž byla rovněž

pozorována kombinace biologicky významné velikosti efektu a statistické průkaznosti. Naopak jedinou statisticky signifikantně upregulovanou miRNA v osteoporotické skupině byla miR-106a-5p, která se v grafu nachází na pravé straně nad hranicí statistické významnosti, což svědčí pro zvýšenou expresi ve srovnání s kontrolní skupinou.



Obrázek 16. Volcano plot – logaritmická změna exprese miRNA mezi skupinami OP a kontrolou

Na ose X se zobrazuje $\log_2$(FC) a na ose Y $-\log_{10}$(p-hodnota). Horizontální modrá čára označuje hranici statistické významnosti ($p < 0,05$). Vertikální čáry vymezují prahy pro biologicky významnou regulaci ($|\log_2 FC| = 1$). Zeleně označené (vlevo) miRNA jsou statisticky signifikantně downregulované a oranžově značená (vpravo) miRNA je statisticky signifikantně upregulovaná.

Zdroj: Vlastní zpracování

4.4 Nezávislé asociace mezi expresí mikroRNA a základními charakteristikami souboru

Vybrané vstupní charakteristiky souboru (BMD, BMI, CTX-I, P1NP a věk) byly nejprve zahrnuty do korelační matice pro univariační (jednorozměrnou) analýzu (Tab. 4.). Proměnné s p-hodnotou < 0,25 byly následně považovány za potenciálně relevantní a zahrnuty do multivariačního zobecněného lineárního modelu (GLM) za účelem

identifikace nezávislých asociací mezi expresí jednotlivých miRNA (závislá proměnná) a základními vstupními charakteristikami souboru (nezávislé proměnné). Tento liberálnější práh pro p-hodnotu (0,25) je běžně a záměrně používán, aby se předešlo předčasnému vyřazení proměnných s možným konfundačním nebo nezávislým efektem, jehož význam se může projevit až po vzájemné adjustaci proměnných v multivariačním modelu.

Tabulka 4. Korelační matice panelu miRNA a nezávislých proměnných

	BMD g/cm³	BMI	CTX-I ng/l	P1NP µg/l	VĚK
miR-7g-5p	0,0996	0,2207	0,1249	0,6414	0,5158
miR-15a-3p	0,9877	0,2956	0,88	0,1976	0,2097
miR-15a-5p	0,0253	0,9371	0,6459	0,5187	0,8111
miR-34a-5p	0,8914	0,7794	0,4456	0,9746	0,8995
miR-92a-3p	0,0403	0,3904	0,0752	0,1145	0,7638
miR-106a-5p	0,3975	0,408	0,0118	0,1161	0,8703
miR-125b-5p	0,9503	0,7887	0,0572	0,8016	0,5935
miR-155-5p	0,064	0,0231	0,8353	0,57	0,8533
miR-181a-5p	0,3088	0,2275	0,0704	0,5401	0,9214
miR-218-5p	0,8757	0,2355	0,4038	0,6126	0,6951
miR-455-3p	0,8769	0,6865	0,1233	0,2861	0,473

Žlutě jsou označeny p-hodnoty < 0,25, které byly použity výhradně pro předvýběr proměnných do multivariačního GLM. Tyto hodnoty nepředstavují kritérium statistické významnosti.

Zdroj: Vlastní zpracování

Věk a příslušnost ke skupině (osteoporóza vs. kontrolní skupina) byly zahrnuty jako povinné nezávislé proměnné do všech GLM modelů bez ohledu na výsledek univariační analýzy. V multivariačním GLM byla exprese jednotlivých miRNA použita jako závislá proměnná, zatímco vybrané klinické a biochemické parametry představovaly nezávislé proměnné.

Vlastní statistická významnost nezávislých asociací v multivariačním modelu byla hodnocena při hladině $p < 0,05$, která byla považována za kritérium pro finální interpretaci výsledků.

Na základě výsledků univariační analýzy byly vybrané proměnné následně zahrnuty do multivariačního GLM, jehož výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5. A-E.

Tabulka 5. A-E Vztah mezi miRNA (jako závislými proměnnými) a vybranými nezávislými proměnnými identifikovanými z univariační analýzy v GLM

A

miR-34a-5p	Odhad	Std. chyba	Hodnota t	Pr (>|t|)
OP vs. kontrolní skupina	2,16127	0,63502	3,403	**0,001****
Věk	-0,03976	0,04129	-0,963	0,342

B

miR-92a-3p	Odhad	Std. chyba	Hodnota t	Pr (>|t|)
OP vs. kontrolní skupina	0,4677021	0,2148362	2,177	**0,0381***
Věk	-0,0042617	0,0139515	-0,305	0,7623
BMI	-0,030362	0,0233737	-1,299	0,2045
CTX-I ng/l	-0,0001657	0,0003253	-0,509	0,6144
P1NP µg/l	-0,0017455	0,0027133	-0,643	0,5252
BMD g/cm³	-1,1148821	0,5802152	-1,921	0,0649

C

miR-106a-5p	Odhad	Std. chyba	Hodnota t	Pr (>|t|)
OP vs. kontrolní skupina	1,831315	0,858984	2,132	**0,0413***
Věk	0,04721	0,054233	0,871	0,3909
CTX-I ng/l	-0,00234	0,001339	-1,747	0,0909
P1NP µg/l	-0,0018	0,011513	-0,156	0,8768

D

miR-181a-5p	Odhad	Std. chyba	Hodnota t	Pr (>|t|)
OP vs. kontrolní skupina	-1,2820072	0,6276807	-2,042	**0,05***
Věk	-0,0150333	0,0371913	-0,404	0,6889
CTX-I ng/l	-0,0019578	0,0007724	-2,535	**0,0167***
BMI	-0,0465289	0,0664208	-0,701	0,489

E

miR-218-5p	Odhad	Std. chyba	Hodnota t	Pr (>|t|)
OP vs. kontrolní skupina	-1,5165204	0,6889477	-2,201	**0,0356***
Věk	-0,0413704	0,0408215	-1,013	0,319
BMI	-0,0425845	0,0729041	-0,584	0,5635
CTX-I ng/l	-0,0012531	0,0008478	-1,478	0,1498

Statisticky významné hodnoty: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Zdroj: Vlastní zpracování

Odhad se vztahuje k odhadované hodnotě každého koeficientu pro prediktory (nezávislé proměnné) v modelu. Tyto odhady představují vztah mezi každým prediktorem a odpovědí (závislou proměnnou).

Std. chyba (standardní chyba) je mírou variability nebo přesnosti odhadovaných koeficientů pro každou proměnnou prediktoru.

t-hodnota je testovací statistika pro každý koeficient prediktoru. Pomáhá určit, zda konkrétní prediktorová proměnná významně přispívá k vysvětlení rozptylu v proměnné odezvy.

Pr(>|t|) představuje p-hodnotu spojenou s t-statistikou pro konkrétní koeficient v modelu. Tato p-hodnota udává pravděpodobnost, že se pozorovaný koeficient liší od nuly čistě náhodou.

Po adjustaci na příslušné nezávislé proměnné nebyla zjištěna žádná významná asociace pro miR-15a-3p, miR-15a-5p, miR-125b-5p, miR-155-5p ani miR-455-3p.

Exprese miR-34a-5p, po adjustaci na věk a přítomnost osteoporózy, vykázala statisticky signifikantní ($p < 0,05$) negativní asociaci s OP.

Exprese miR-92a-3p, po adjustaci na BMD, BMI, CTX-I, P1NP, věk a OP, vykázala statisticky signifikantní ($p < 0,05$) pozitivní nezávislou asociaci s OP.

Exprese miR-106a-5p, po adjustaci na CTX-I, P1NP, věk a OP, rovněž vykázala statisticky signifikantní ($p < 0,05$) pozitivní nezávislou asociaci s OP.

Exprese miR-181a-5p, po adjustaci na BMI, CTX-I, věk a OP, prokázala statisticky signifikantní negativní ($p < 0,05$) nezávislou asociaci s OP a CTX-I.

Exprese miR-218-5p, po adjustaci na BMI, CTX-I, věk a OP, prokázala statisticky signifikantní ($p < 0,05$) negativní nezávislou asociaci s OP.

5 Diskuse

Úplné porozumění patofyziologii osteoporózy je náročné a vyžaduje průběžné propojování poznatků z různých úrovní výzkumu, od základního až po klinický. Molekulární analýzy a klinická vyšetření samostatně nestačí, nejpřesnější obraz vzniká až jejich společnou interpretací. Nám se podařilo propojit výsledky molekulárních analýz lidské kostní tkáně s klinickými daty reálných pacientů, což výrazně zvyšuje vypovídací hodnotu zjištění, i s ohledem na velikost souboru.

5.1 Vstupní charakteristiky souboru

Vstupní charakteristiky obou sledovaných skupin byly ve většině parametrů dobře vyvážené. Průměrný věk pacientů s osteoporózou (72 ± 7,29 roku) a kontrol (69 ± 8,06 roku) se statisticky nelišil, což minimalizuje zkreslení související s věkem. Rovněž zastoupení pohlaví bylo v obou skupinách obdobné; ženy tvořily 67 % v OP skupině a 72 % v kontrolní skupině, podíl mužů byl také totožný (33 % vs. 28 %). Prevalence kuřáctví byla mezi skupinami srovnatelná (40 % vs. 43 %), což vylučuje významnější ovlivnění kostního metabolismu tímto faktorem.

5.1.1 Parametr BMI

BMI se ukázal jako jediný demografický parametr s významným rozdílem mezi skupinami, přičemž pacienti s osteoporózou měli nižší BMI (27 ± 3,43) než kontroly (30 ± 4,65). Tento nález odpovídá dlouhodobě popsanému vztahu mezi tělesnou hmotností a kostní denzitou, kdy vyšší BMI – zejména v pásmu nadváhy či mírné obezity – bývá spojeno s vyšší BMD díky mechanickému zatížení skeletu a hormonálním faktorům (např. vyšší periferní konverzi estrogenů v tukové tkáni) [101, 102].

Je však třeba zdůraznit, že protektivní efekt vyšší hmotnosti není univerzální. U starších osob může být přítomna tzv. sarkopenická obezita, kdy se vyšší BMI pojí s nízkou svalovou hmotou a horší kvalitou kostní struktury. V takových případech může být riziko pádu i fraktury paradoxně vyšší, přestože absolutní hodnota BMI stoupá [103]. V našem souboru však rozdíl BMI jednoznačně ukazuje na to, že pacienti s osteoporózou měli nižší tělesnou hmotnost, což lze považovat za konzistentní s jejich zvýšeným rizikem kostní fragility.

5.1.2 BMD, T-skóre, Z-skóre a FRAX jako prediktory rizika zlomenin

Přestože byly absolutní hodnoty BMD proximálního femuru v obou skupinách srovnatelné (1,0 ± 0,18 g/cm³ v OP skupině vs. 1,0 ± 0,20 g/cm³ v kontrolní skupině; p = 0,56), u pacientů s osteoporotickou frakturou byly při denzitometrickém vyšetření zjištěny signifikantně nižší hodnoty T-skóre a Z-skóre v oblasti proximálního femuru. Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány pro T-skóre femur total (p = 0,03), Z-skóre femur total (p < 0,001) a Z-skóre krčku femuru (p = 0,003). Tento nález odpovídá klinické realitě, neboť diagnózu osteoporózy lze stanovit i u pacientů s relativně zachovanou absolutní hodnotou BMD v případě přítomnosti nízkotraumatické zlomeniny. Z klinické praxe i populačních studií je navíc známo, že významná část osteoporotických zlomenin vzniká u jedinců s hodnotami BMD v pásmu osteopenie [15].

Zde je nutné podotknout, že zatímco BMD vyjadřuje absolutní množství minerálu v kostní tkáni, T-skóre popisuje odchylku této hodnoty od průměru mladé zdravé populace a sloužilo ke klasifikaci kostního nálezu v našem souboru. Z-skóre porovnává BMD pacienta s hodnotami osob stejného věku a pohlaví. Vzhledem k tomu, že se jednalo o starší postmenopauzální populaci srovnatelného věku (72 ± 7,29 vs. 69 ± 8,06 roku; p = 0,29), bylo Z-skóre v této studii hodnoceno výhradně jako doplňkový parametr a nebylo použito k diagnostickému zařazení pacientů [1, 9, 10, 15, 16].

Hodnocení rizika zlomenin pomocí nástroje FRAX neprokázalo mezi skupinami statisticky významné rozdíly. Desetileté riziko hlavní osteoporotické fraktury činilo 9,97 ± 6,52 % v OP skupině a 10,91 ± 8,94 % v kontrolní skupině, tedy hodnoty odpovídající převážně nízkému až střednímu riziku, které nedosahovaly běžně používaného intervenčního prahu pro zahájení farmakologické léčby (≥ 20 %). Tyto výsledky naznačují, že nástroj FRAX mohl v tomto souboru podhodnocovat skutečné dlouhodobé riziko fraktury, zejména u pacientů s již manifestní osteoporózou a dalšími rizikovými faktory, které FRAX nezohledňuje.

Desetileté riziko kontralaterální fraktury krčku femuru dosahovalo hodnot 4,06 ± 4,36 % v OP skupině a 4,75 ± 5,87 % v kontrolní skupině. Přestože ani zde nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami, u části pacientů se hodnoty rizika pohybovaly na úrovni nebo nad hranicí 3 %, která je v doporučeních National Osteoporosis Foundation uváděna jako práh pro zvážení farmakologické léčby. Tento

nález zdůrazňuje klinický význam hodnocení rizika fraktury kyčle, neboť právě fraktury proximálního femuru jsou spojeny s nejvyšší morbiditou a mortalitou. Skutečnost, že zvýšené riziko fraktury kyčle nebylo plně reflektováno rozdíly v celkovém FRAX skóre, dále podtrhuje známá omezení tohoto nástroje, zejména jeho neschopnost zohlednit počet a závažnost vertebrálních fraktur, dynamiku kostního obratu a faktory zvyšující krátkodobé riziko fraktury [5, 6, 15].

Souhrnně tyto výsledky poukazují na omezenou schopnost samotného denzitometrického vyšetření a FRAX skóre postihnout skutečné riziko zlomenin. Kostní minerální denzita představuje pouze jednu ze složek kostní pevnosti a neodráží změny kvality kostní tkáně, jako jsou poruchy mikroarchitektury, akumulace mikrotrhlin, změny materiálových vlastností kosti ani alterace buněčné komunikace. Tyto procesy jsou řízeny na molekulární a buněčné úrovni a úzce souvisejí s poruchami kostní remodelace, odpovědí na buněčný stres a mechanismy buněčné senescence.

Z tohoto pohledu je studium molekulárních signálních drah v lidské kostní tkáni, včetně regulace genové exprese zprostředkované mikroRNA, klíčové pro hlubší pochopení patofyziologie osteoporózy. Umožňuje objasnit mechanismy, které přispívají ke zvýšené křehkosti skeletu a vzniku nízkotraumatických zlomenin i u pacientů s relativně zachovanou kostní denzitou [45].

5.1.3 Markery kostního obratu

Při interpretaci hladin markerů kostního obratu v našem souboru je nutné zohlednit, že běžně používané laboratorní referenční intervaly jsou definovány pro velmi široké věkové rozpětí (v Pardubické nemocnici 18–99 let) a nereflektují specifika starší populace kolem 70 let. Z populačních studií je dobře známo, že koncentrace markerů kostní resorpce i formace se s věkem systematicky zvyšují a že u osob starších 60–70 let dosahují výrazně vyšších hodnot než u mladších dospělých. U žen ve věku ≥50 let je uváděn referenční interval pro CTX-I 100–700 ng/l, přičemž u žen nad 70 let bývají hodnoty dokonce ještě vyšší, a to v důsledku vyššího kostního obratu. Podobně je pro P1NP u žen ve věku 50–69 let popisováno rozmezí 15–75 µg/l, zatímco u žen starších 70 let jsou hodnoty obvykle vyšší. U mužů nad 60 let je referenční rozmezí CTX-I přibližně 100–600 ng/l a pro P1NP u mužů ve věku 25–70 let 15–80 µg/l, přičemž i zde platí tendence k vyšším hodnotám u mužů nad 70 let.

V souladu s těmito poznatky byly v našem souboru hladiny CTX-I a P1NP zvýšené ve srovnání s laboratorním intervalem Pardubické nemocnice (CTX-I 70–700 ng/l; P1NP 20–70 µg/l), který vychází z heterogenní populace dospělých a není věkově specifický. U žen nad 70 let jsou uváděny fyziologické hodnoty CTX-I zhruba v rozmezí 300–600 ng/l a hodnoty P1NP přibližně mezi 40–80 µg/l. Tato rozmezí významně přesahují tzv. univerzální referenční intervaly používané pro dospělou populaci [104].

V tomto kontextu odpovídají zvýšené hladiny markerů kostního obratu v našem souboru věkovým charakteristikám populace. OP skupina měla u CTX-I průměrné hodnoty 938,5 ± 646,8 ng/l, které převyšovaly horní hranici věkově specifických intervalů, zatímco kontrolní skupina (594,0 ± 285,3 ng/l) se pohybovala v horním pásmu hodnot popsaných u žen ve věku 70–80 let. Obdobně hladiny P1NP v OP skupině (93,2 ± 85,5 µg/l) přesahovaly rozmezí 60–80 µg/l uváděné pro starší postmenopauzální ženy, zatímco kontrolní skupina (59,5 ± 24,4 µg/l) se pohybovala na horní hranici těchto intervalů.

Celkově vstupní charakteristiky ukazují, že skupina pacientů s osteoporózou se vyznačovala nižším BMI, zvýšeným obratem kostního metabolismu s akcentací osteoresorpce, mírnými odchylkami v biochemických parametrech a signifikantně nižšími denzitometrickými hodnotami v oblasti proximálního femuru. Tyto nálezy odpovídají klinickému obrazu pacientů s nízkotraumatickou frakturou femuru.

Po změření exprese miRNA a porovnání výsledků mezi oběma skupinami jsme dále analyzovali vztah jejich exprese s klinickými daty reálných pacientů. Pro zajištění důkladného posouzení nezávislé asociace byly všechny miRNA hodnoceny pomocí multivariačního modelu (GLM). Pro hodnocení korelací mezi proměnnými byly provedeny jednorozměrné analýzy. Zatímco univariační analýza poskytuje pouze přehled o rozdílech v expresi miRNA mezi OP a kontrolní skupinou, GLM zahrnuje další kovariantní proměnné, jako je věk, CTX-I a P1NP, což se jeví jako klíčové pro rozlišení reálných biomarkerů, které vykazují vztah s expresí určité miRNA. Do GLM vstupovaly proměnné s p-hodnotami < 0,25 v univariační analýze.

5.1.4 Další biochemické parametry

Analýza laboratorních parametrů prokázala výrazný deficit vitaminu D v obou sledovaných skupinách. Průměrné hladiny 25-hydroxyvitaminu D činily 39,4 nmol/l u

pacientů s osteoporózou a 44,1 nmol/l v kontrolní skupině, přičemž obě hodnoty se nacházely výrazně pod referenčním rozmezím 75–250 nmol/l. Tento nález odpovídá vysoké prevalenci hypovitaminózy D u starší populace a představuje významný nepříznivý faktor ovlivňující kostní metabolismus a riziko fraktury [15, 16, 21].

Hladiny celkového kalcia v séru byly u pacientů s osteoporózou nižší než v kontrolní skupině (2,05 vs. 2,15 mmol/l) a průměrná hodnota v OP skupině se nacházela pod dolní hranicí referenčního intervalu, zatímco kontrolní skupina dosahovala hodnot při jeho dolní hranici. Tento rozdíl může odrážet kombinaci deficitu vitaminu D a změn v regulaci kalciového metabolismu. Nedostatečný přívod vápníku a vitaminu D je dlouhodobě považován za významný rizikový faktor snížení minerální kostní hustoty, zvýšeného rizika pádů a následných osteoporotických zlomenin [15].

Hodnoty sérového fosforu se v obou skupinách pohybovaly v rámci referenčního rozmezí (1,07 vs. 1,02 mmol/l) a nenaznačovaly poruchu fosfátového metabolismu. Podobně hladiny kostní izoformy alkalické fosfatázy byly u obou skupin v referenčních mezích (12,6 vs. 10,4 μg/l), bez známek výrazně zvýšené osteoblastické aktivity.

Hladiny celkové bílkoviny byly u pacientů s osteoporózou nižší (59,5 vs. 64,6 g/l) a nacházely se na dolní hranici referenčního rozmezí, což může odrážet méně příznivý nutriční stav a jeho možný vliv na skeletální zdraví. Dostatečný příjem bílkovin je přitom považován za důležitou součást prevence osteoporózy a zároveň hraje klíčovou roli v prevenci rozvoje sarkopenie, která je úzce spojena se zvýšeným rizikem pádů a fraktur [15, 103].

Z hlediska tyreoidální funkce byly u pacientů s osteoporózou zjištěny vyšší hladiny volného tyroxinu ve srovnání s kontrolní skupinou (18,9 vs. 14,9 pmol/l), přestože se průměrné hodnoty fT4 u obou skupin nacházely v rámci referenčního rozmezí. Hladiny TSH byly mezi skupinami srovnatelné (1,52 vs. 1,65 mIU/l) a rovněž se pohybovaly v mezích referenčního intervalu. Tyto nálezy ukazují na jemné rozdíly v hormonální regulaci bez známek manifestní tyreopatie, které však mohou ovlivňovat kostní obrat [105].

5.2 Deregulovaná relativní exprese miRNA u pacientů s osteoporózou

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 čtyřikrát 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.

5.3 miRNA vykazující asociaci s klinickými charakteristikami pacientů s osteoporózou

V GLM jsme zkoumali, jak exprese jednotlivých definovaných miRNA souvisí s klinickými parametry pacientů. Do GLM vstupovaly parametry, které v univariační analýze vykazovaly korelaci s expresemi miRNA. Jako základní nezávislé parametry jsme použili rozdělení do skupin (OP a kontrola) a věk, jako další parametry byly zvoleny ty, které vykazovaly p-hodnotu pod 0,25.

Zjistili jsme, že miR-106a-5p, která vykazovala výraznou upregulaci vyjádřenou jako ΔCt, v GLM po adjustaci na CTX-I, P1NP, věk a OP, vykázala statisticky signifikantní ($p < 0,05$) pozitivní nezávislou asociaci s OP.

Zajímavé bylo, že exprese miR-92a-3p byla také upregulována, ale s p-hodnotou ukazující na trend, nikoli statisticky významnou ($p = 0,086$). Avšak po adjustaci na klinické vstupní parametry pacientů s osteoporózou byla zjištěna pozitivní nezávislá asociace s OP.

Exprese miR-34a-5p byla statisticky signifikantně downregulována a po adjustaci na věk a OP, vykázala statisticky signifikantní negativní nezávislou asociaci s OP.

Exprese miR-218-5p byla statisticky signifikantně downregulována a po adjustaci na BMI, CTX-I, věk a OP, prokázala statisticky signifikantní negativní nezávislou asociaci s OP.

Trend k downregulaci vykazovala i miR-181a-5p, avšak po adjustaci na BMI, CTX-I, věk a OP, prokázala statisticky signifikantní negativní nezávislou asociaci s OP a CTX-I.

Oproti tomu exprese miR-155-5p byla statisticky signifikantní v univariační analýze, avšak po adjustaci nevykázala nezávislou asociaci s OP ani s dalšími klinickými parametry.

Z těchto výsledků lze usuzovat, že miR-106a-5p a miR-92a-3p jsou u pacientů s osteoporózou po fraktuře upregulovány.

Zatímco miR-34a-5p, miR-181a-5p, miR-218-5p jsou u pacientů s osteoporózou po fraktuře downregulovány, tedy mají inverzní vztah. Inverzní vztah byl navíc prokázán mezi miR-181a-5p a CTX-I.

Po adjustaci na příslušné nezávislé proměnné nebyla zjištěna nezávislá asociace pro miR-15a-3p, miR-15a-5p, miR-125b-5p, miR-155-5p ani miR-455-3p.

5.4 Biologický význam deregulovaných miRNA

Pro hlubší porozumění provedeným pozorováním jsme integrovali získané výsledky s dostupnými poznatky z literatury, což nám umožnilo lépe interpretovat biologický význam deregulovaných miRNA. Tabulka 6 shrnuje směry jejich exprese, jejich asociace s osteoporózou založené na GLM analýze v této studii, a také potenciální mechanistické souvislosti.

Tabulka 6. Biologický význam deregulovaných miRNA

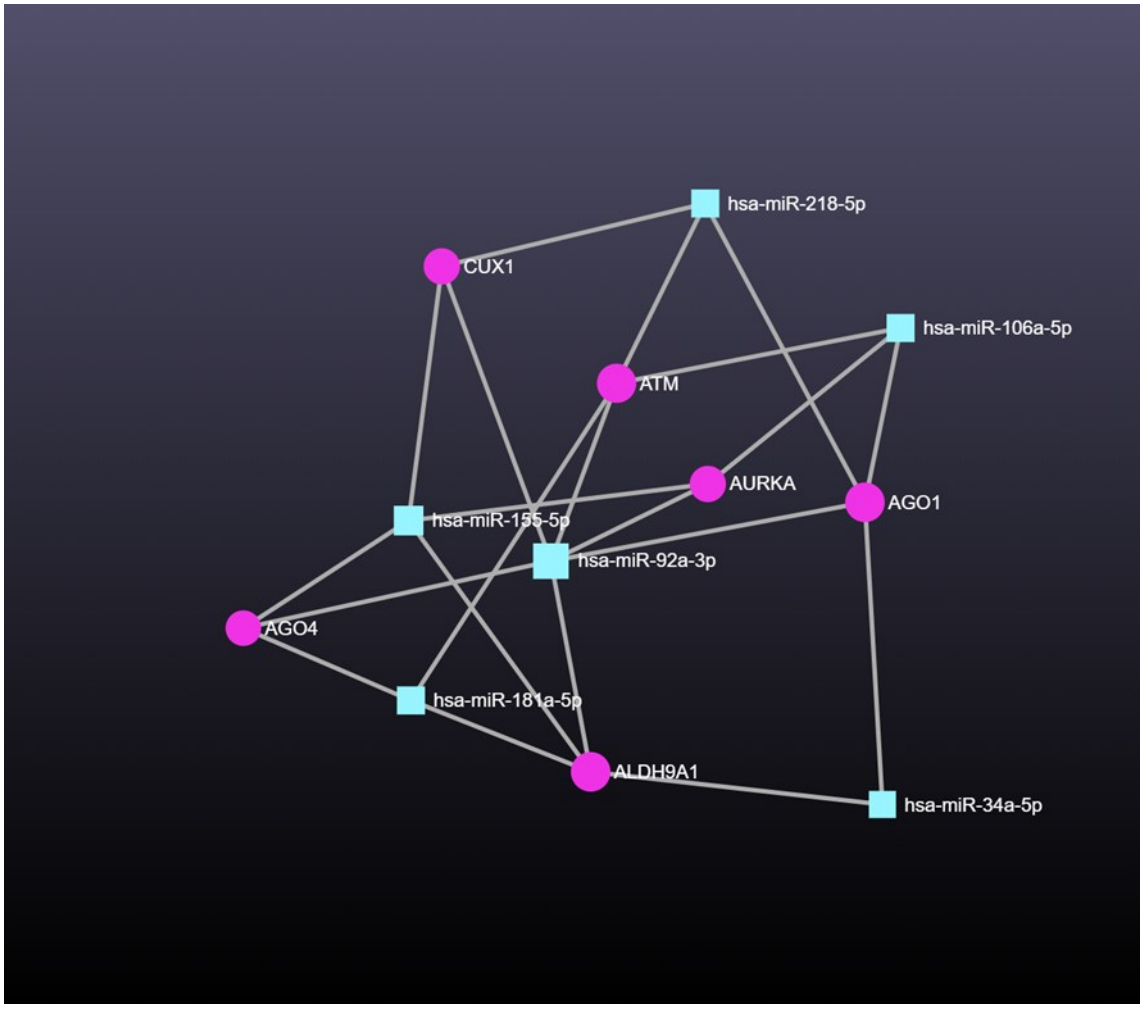
MiRNA	Exprese v OP sk. – v naší studii	GLM asociace s OP	Primární buněčný cíl	Potenciální mechanistické souvislosti s OP	Reference
miR-106a-5p	↑	Ano	MSCs, osteoblasty, osteoklasty	Podpora adipogeneze (↓osteogeneze prostřednictvím suprese BMP2); spojení s oxidačním stresem a buněčnou senescencí.	[106], [107], [108]
miR-34a-5p	↓	Ano	Osteoklasty	Inhibice aktivity osteoklastů a kostní resorpce; Implikace v senescenci.	[109], [110]
miR-218-5p	↓	Ano	Osteoblasty, osteoklasty	Podpora diferenciace osteoblastů. Downregulace může znamenat selhání kompenzační odpovědi nebo sekreci nefunkčními buňkami.	[111], [112] [113]
miR-92a-3p	↑ (ns)	Ano	Osteoblasty	Podpora osteoblastogeneze; Podpora osteogeneze a reparace kostí (prostřednictvím IBSP/PI3K-AKT signální dráhu).	[114]
miR-181a-5p	↓ (ns)	Ano (Inverzní s CTX-I)	Osteoblasty, osteoklasty	Modulace osteogenní diferenciace a tvorba kostní tkáně (přes osu Runx1/AIF-1); Regulace kostní resorpce.	[115], [122]
miR-155-5p	↓	Ne	Různé	Regulace osteogeneze. Nejasná asociace v kontextu této studie.	[115], [123]
let-7g-5p, miR-15a-3p, miR-125b-5p, miR-455-3p	↓ (ns)	Ne	Různé	Pravděpodobně nedostatečná asociace s OP fenotypem souboru naší studie. Potenciální role v kostním metabolismu.	[116], [118], [119], [120], [121], [124], [125]
miR-15a-5p	↑ (ns)	Ne	Různé	Pravděpodobně nedostatečná asociace s OP fenotypem souboru naší studie.	[118]

Zdroj: Vlastní zpracování

Pro definovaný soubor miRNA byla pomocí webové platformy miRNet provedena síťová analýza interakcí mezi miRNA a jejich cílovými geny (Obr. 17.). Nástroj miRNet integruje informace z několika veřejně dostupných databází zahrnujících experimentálně ověřené i bioinformaticky predikované interakce miRNA–mRNA, čímž umožňuje komplexní pohled na regulační vztahy mezi miRNA a genovou expresí. Na základě zadaného seznamu miRNA byla vygenerována síť miRNA–cílový gen, v níž jednotlivé uzly představují miRNA nebo cílové geny a hrany mezi nimi odpovídají známým nebo predikovaným regulačním vazbám.

Výsledná síť ukázala robustní propojení mezi analyzovanými miRNA a jejich cílovými geny, přičemž byly identifikovány klíčové genové uzly, které jsou současně regulovány více miRNA. Tyto tzv. hub geny představují potenciálně významné regulační body, v nichž se sbíhají účinky více miRNA a které mohou mít zásadní vliv na buněčné funkce. Přítomnost takovýchto uzlů v síti naznačuje, že regulace genové exprese není řízena jednotlivými miRNA izolovaně, ale probíhá koordinovaně prostřednictvím komplexních regulačních sítí.

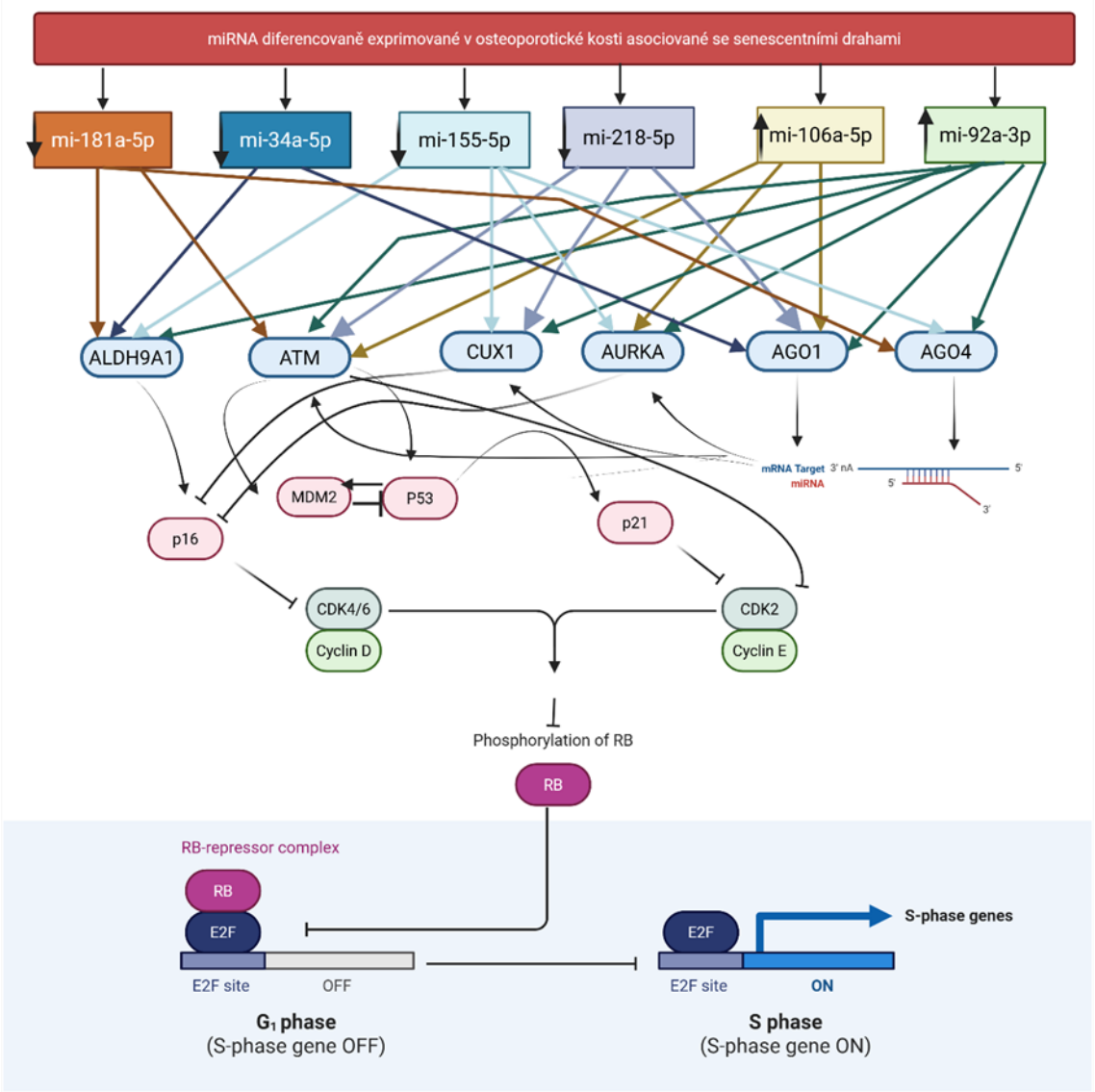
Identifikované genové uzly a jejich propojení s více miRNA poukazují na zapojení složitých signálních drah, které se podílejí na regulaci procesů souvisejících se senescentním fenotypem buněk, poruchami kostní homeostázy a rovnováhy mezi kostní resorpcí a novotvorbou. Síťová analýza tak podporuje hypotézu, že deregulace exprese několika miRNA může vést k narušení jemně vyvážených regulačních mechanismů na úrovni genové exprese, což se následně může projevit akcelerací buněčného stárnutí a rozvojem osteoporotického fenotypu.



Obrázek 17. Deregulované miRNA a jejich potenciální cílové geny

Zdroj: Vlastní zpracování (miRNet)

Dále jsme znázornili integrační model zapojení vybraných miRNA diferencovaně exprimovaných v osteoporotické kostní tkáni do signalizačních drah spojených se senescencí a regulací buněčného cyklu. Schéma (Obr. 18.) ilustruje propojení mezi kandidátními miRNA a jejich cílovými geny, především komponentami odpovědi na poškození DNA (ATM–p53–p21) a následnou regulací CDK/RB/E2F osy. Současně schematizuje potenciální vliv těchto miRNA na klíčové uzly buněčné senescence, včetně stabilizace zástavy buněčného cyklu prostřednictvím p16 a RB represorového komplexu, což může přispívat k rozvoji senescenčního fenotypu a poruše kostního metabolismu.



Obrázek 18. Potenciální propojení mezi kandidátními miRNA a jejich cílovými geny

Vlastní zpracování (vytvořeno v BioRender.com)

5.4.1 miR-106a-5p

Mezi analyzovanými miRNA vykazovala miR-106a-5p nejvýznamnější upregulaci v OP skupině s FC 4,34. Přitom se ukazuje, že oxidační stres vede k downregulaci miR-106a-5p a následnému potlačení přechodu mezi fázemi G1/S buněčného cyklu prostřednictvím snížení exprese E2F1, což se projeví zpomalením buněčné proliferace. Naopak experimentální zvýšení hladiny miR-106a-5p umožnilo částečné obnovení přechodu do S fáze a podporu buněčného dělení, což dokládá její funkční význam v řízení buněčné

dynamiky [106]. Zvýšená exprese miR-106a-5p pozorovaná v našem souboru může proto představovat dočasnou kompenzační odpověď buněk na zvýšený stres a narušenou homeostázu v mikroprostředí zrychlené remodelace, případně odrážet maladaptivní snahu o udržení rovnováhy v podmínkách aktivované senescence a ATM-dependentní odpovědi na poškození DNA. Podobný duální mechanismus byl pozorován i ve studiích v oblasti výzkumu nádorů. MiR-106a-5p působí buď jako onkogenní miRNA, nebo jako tumor supresor v závislosti na typu nádoru, přičemž ovlivňuje klíčové buněčné procesy, jako jsou proliferace, apoptóza, buněčný cyklus, angiogeneze, invazivita, metastazování a rezistence vůči léčbě [107].

MiR-106a-5p působí také jako adipogenní přepínač v mezenchymálních stromálních buňkách (MSC), neboť podporuje adipogenezi a současně inhibuje osteogenezi. Tento antiosteogenní účinek je zprostředkován přímou supresí BMP2 (bone morphogenetic protein 2), který je klíčovým regulátorem determinace MSC k osteoblastické linii a osteogenní diferenciace. Vyšší exprese miR-106a-5p pozorované v naší skupině pacientů s osteoporózou proto mohou odrážet nebo přispívat k patologickému posunu diferenciace MSC od osteoblastické linie směrem k adipocytům, což je běžný rys stárnoucí a osteoporotické kostní dřeně. Dosavadní studie naznačují, že tato miRNA je za stresových podmínek obvykle downregulována, což je spojováno se zástavou buněčného cyklu [108].

Analýza sítě miRNet ukázala, že miR-106a-5p je predikovaně propojena s geny ATM, AURKA (Aurora kinase A) a AGO1. Toto síťové postavení posiluje důkazy o jejím potenciálním zapojení do regulace mechanismů souvisejících s buněčným cyklem a odpovědí na stres, přičemž funkční význam těchto vazeb v kostní tkáni vyžaduje další experimentální ověření.

5.4.2 miR-34a-5p

V naší studii byla miR-34a-5p ve skupině s postmenopauzální osteoporózou nejvýrazněji downregulována (fold change = 0,2476). MiR-34a-5p je známa tím, že potlačuje aktivitu osteoklastů a resorpci kostí, což naznačuje, že její snížená exprese může přispívat k poruše rovnováhy kostní remodelace. Navíc literární údaje ukazují, že exozomální miR-34a-5p je diferencovaně exprimována u postmenopauzální OP, což ji staví do role potenciálního neinvazivního biomarkeru kostní ztráty [109, 110].

Analýza sítě miRNet ukázala, že miR-34a-5p je predikovaně propojena s geny ALDH9A1 (aldehyde dehydrogenase 9 family member A1) a AGO1. AGO1 představuje klíčovou komponentu komplexu RISC, který se podílí na posttranskripční regulaci genové exprese, zatímco ALDH9A1 je spojován s buněčným metabolismem a odpovědí na buněčný stres. Toto síťové postavení naznačuje, že miR-34a-5p může kromě své role v regulaci kostní remodelace ovlivňovat také metabolické procesy a mechanismy související se senescencí v kostních buňkách, což může přispívat k narušení jejich funkční rovnováhy a progresi osteoporózy.

5.4.3 miR-218-5p

MiR-218-5p byla ve skupině OP významně downregulována, což je zjištění dále podpořeno její signifikantní asociací v modelu GLM. MiR-218-5p je funkčně popisována jako miRNA s osteoprotektivní rolí, která podporuje diferenciaci osteoblastů a současně inhibuje tvorbu osteoklastů, mimo jiné prostřednictvím regulace dráhy ROBO1/DKK-1 během kostní remodelace. Bylo rovněž prokázáno, že miR-218-5p řídí signální okruh Wnt podporující osteoblastickou diferenciaci a že aktivace Wnt signalizace zvyšuje expresi miR-218-5p, čímž vzniká pozitivní zpětnovazební smyčka (miR-218-5p → Wnt → zvýšení miR-218-5p) [111, 112, 113].

Snížená exprese miR-218-5p pozorovaná v této studii tak potvrzuje její zásadní roli v udržování osteoblastické funkce a naznačuje, že její downregulace může přispívat ke zpomalení kostní formace, oslabení Wnt signální dráhy, snížení osteogenní aktivity a rozvoji osteoporózy. Současně analýza sítě miRNet ukázala, že miR-218-5p je predikovaně propojena s geny ATM, CUX1 (Cut-like homeobox 1) a AGO1, které se podílejí na regulaci odpovědi na buněčný stres, transkripční kontrole a posttranskripčním umlčování genů. Toto síťové postavení naznačuje, že miR-218-5p může kromě své role v osteogenezi ovlivňovat také senescenční procesy a buněčnou stabilitu, a tím přispívat ke zvýšené náchylnosti kostních buněk ke stresově indukované senescenci.

5.4.4 miR-92a-3p

Exprese miR-92a-3p byla v základní analýze upregulována, avšak bez dosažení statistické významnosti, s p-hodnotou naznačující pouze trend ($p = 0,086$). Po adjustaci na klinické vstupní parametry v GLM byla však v rámci vícerozměrného modelu

prokázána její pozitivní nezávislá asociace se skupinou pacientů s osteoporózou. Tento nález může souviset s dříve publikovanými experimentálními studiemi, které charakterizovaly miR-92a-3p jako zesilovač osteoblastické aktivity podporující osteogenní diferenciaci a reparaci kosti prostřednictvím regulace signální dráhy IBSP/PI3K-AKT. Upregulace miR-92a-3p je proto diskutována jako potenciálně slibná terapeutická strategie pro podporu hojení zlomenin a prevenci vzniku pakloubu. [114] Vzhledem k tomu, že naše studie zahrnovala pacienty s osteoporózou po fraktuře, je tento nález obzvláště relevantní z hlediska procesu hojení kosti.

V síťové analýze miRNet byla miR-92a-3p propojena se třemi tři kandidátními geny zapojené do regulace buněčného stresu a buněčného cyklu (ATM, AURKA) a na metabolický gen ALDH9A1. Toto postavení v síti ukazuje, že miR-92a-3p může souviset jak se senescencí, tak s procesy řídicími buněčný růst a metabolismus, což může ovlivňovat hojení kosti u osteoporotických pacientů.

5.4.5 miR-181a-5p

MiR-181a-5p ovlivňuje osteogenní diferenciaci a tvorbu kostí částečně prostřednictvím modulace osy Runx1/AIF-1. V naší studii jsme v GLM prokázali inverzní vztah mezi hladinami miR-181a-5p a markerem kostní resorpce CTX-I, což kvantitativně podporuje její regulační roli v procesu odbourávání kostní tkáně. Tento nález naznačuje, že i relativně malé změny v hladinách této miRNA mohou odrážet klinicky významný posun v křehké rovnováze mezi tvorbou a resorpcí kosti. MiR-181a-5p tak může působit jako jemný modulátor aktivity osteoblastů a osteoklastů, podobně jako ostatní miRNA sledované v této studii [122].

Analýza sítě miRNet ukázala, že miR-181a-5p je predikovaně propojena s geny ALDH9A1, AGO4 a ATM. Protein ALDH9A1 je spojován s buněčným metabolismem a odpovědí na stres, zatímco AGO4 představuje součást aparátu miRNA-silencing (RISC/Argonaute aparát), který zajišťuje posttranskripční regulaci genové exprese. Vazba na protein ATM dále naznačuje možnou účast miR-181a-5p v mechanismech buněčné odpovědi na stres a poškození DNA. Toto selektivní síťové postavení předkládá hypotézu, že miR-181a-5p se může podílet nejen na regulaci kostního obratu, ale také na ovlivnění metabolické stability kostních buněk.

5.4.6 miR-155-5p

V rámci relativní exprese byla miR-155-5p statisticky signifikantně downregulována ve skupině OP.

Bylo prokázáno, že miR-155-5p se podílí na regulaci buněčné senescence prostřednictvím ovlivnění signalizačních drah souvisejících s p53/p21 a NF-κB, které jsou úzce spojeny se SASP fenotypem a chronickým nízkostupňovým zánětem typickým pro stárnoucí kostní tkáň. Změny její exprese mohou modulovat proliferativní kapacitu mezenchymálních kmenových buněk a přispívat k posunu jejich diferenciace směrem k adipogenezi na úkor osteogeneze. V kontextu osteoporózy je deregulace miR-155-5p spojována s narušením rovnováhy mezi kostní resorpcí a novotvorbou [116, 123].

Analýza sítě miRNet ukázala, že miR-155-5p je predikovaně propojena s geny CUX1, AURKA, AGO4 a ALDH9A1. Protein CUX1 se podílí na regulaci transkripce a buněčného cyklu, AURKA je klíčovým regulátorem mitotické aktivity a proliferace a AGO4 představuje součást miRNA-silencing aparátu. Toto síťové postavení naznačuje, že miR-155-5p se může účastnit regulace procesů souvisejících s buněčným cyklem a stabilitou buněk, a tím potenciálně přispívat k narušení rovnováhy mezi proliferací a senescenční odpovědí v kostní tkáni.

5.4.7 let-7g-5p, miR-15a-3p, miR-125b-5p a miR-455-3p

Absence významných změn u let-7g-5p, miR-15a-3p, miR-125b-5p a miR-455-3p naznačuje, že tyto miRNA nemusí hrát primární roli jako tkáňové biomarkery v patofyziologii OP [120, 121, 124, 125, 126].

5.5 Potenciální cílové geny pro kandidátní miRNA

Analýza miRNA–genových sítí identifikovala několik klíčových cílových genů (AGO1/AGO4, ALDH9A1, AURKA, ATM a CUX1), které se uplatňují v regulaci buněčné senescence, odpovědi na stres, buněčného cyklu a osteogenní diferenciace.

5.5.1 AGO1 a AGO4

AGO1 je klíčovou součástí RISC komplexu, který zajišťuje posttranskripční regulaci genové exprese prostřednictvím vazby miRNA na cílové mRNA a následné translační

represe či degradace. Tím AGO1 přispívá k usměrňování expresních programů řídících buněčný cyklus, odpověď na stres, diferenciaci i senescenci.

AGO4 je rovněž členem Argonaute rodiny. Ačkoli jeho katalytická aktivita je mnohem slabší než u AGO2, podílí se na miRNA-zprostředkované regulaci genové exprese a může ovlivňovat také epigenetické procesy, včetně metylace DNA a modifikací histonů. To může být významné zejména v kontextu chronického stresu, stárnutí buněk a udržování senescentního transkripčního profilu [127].

V naší studii se AGO1 i AGO4 ukazují jako významné síťové uzly. AGO1 je predikovaně propojen s miR-34a-5p, miR-92a-3p, miR-106a-5p a miR-218-5p, zatímco AGO4 je propojen s miR-92a-3p, miR-155-5p a miR-181a-5p. Toto rozložení vazeb naznačuje, že oba Argonaute proteiny se mohou podílet na integraci signálů souvisejících se senescencí, buněčným stresem a regulací kostního metabolismu, avšak prostřednictvím odlišných regulačních okruhů.

MiR-34a-5p je senescenčně asociovaná miRNA regulovaná p53, podílející se na indukci buněčné senescence a kontrole buněčného cyklu [109], [110]. Její vazba na AGO1 podporuje hypotézu, že deregulace této miRNA může ovlivňovat efektivitu RISC komplexu a tím i regulaci genů spojených se stárnutím kostních buněk. MiR-106a-5p je spojována s regulací proliferace a buněčného cyklu [106, 107, 108], zatímco miR-218-5p má významnou roli v osteoblastické diferenciaci a Wnt signalizaci [111, 112, 113].

5.5.2 ALDH9A1

ALDH9A1 je enzym zapojený do metabolismu aldehydů a aminokyselin a podílí se na ochraně buněk před toxickými produkty oxidačního stresu. Jeho funkce je proto spojována s udržením buněčné homeostázy a metabolické stability, zejména v podmínkách zvýšeného buněčného stresu a stárnutí [128, 130].

V naší studii byl ALDH9A1 identifikován jako cílový gen několika diferencovaně exprimovaných miRNA, konkrétně miR-34a-5p, miR-92a-3p, miR-155-5p a miR-181a-5p. Toto síťové propojení předkládá, že deregulace těchto miRNA může hypoteticky ovlivňovat metabolickou rovnováhu kostních buněk a jejich schopnost adaptace na stres, což může přispívat k rozvoji senescenčního fenotypu kostní tkáně pacientů s osteoporózou.

5.5.3 AURKA

Experimentální data ukazují, že AURKA působí jako negativní regulátor senescence v adipózních mezenchymálních kmenových buňkách. Její zvýšená exprese vede ke snížení exprese senescenčních markerů p16, p53 a p21 a k poklesu počtu SA-β-gal pozitivních buněk, zatímco knockdown AURKA senescentní fenotyp významně zvyšuje [131].

V kontextu naší studie je AURKA predikovaným cílovým genem několika kandidátních miRNA, konkrétně miR-106a-5p, miR-155-5p a miR-92a-3p, což naznačuje, že tyto miRNA by se mohly podílet na modulaci senescenční odpovědi prostřednictvím regulace AURKA a s ní spojených signálních drah.

5.5.4 ATM

Gen ATM, který kóduje protein ATM (ataxia-telangiectasia mutated), představuje klíčový senzor poškození DNA a centrální regulátor odpovědi na dvojvláknové zlomy DNA. Aktivací signální kaskády ATM–p53–p21 dochází k zastavení buněčného cyklu, aktivaci reparačních mechanismů nebo spuštění buněčné senescence. Dysfunkce této dráhy vede k akumulaci geneticky poškozených buněk, rozvoji senescentního fenotypu a alteraci tkáňové homeostázy, což je považováno za jeden z významných mechanismů stárnutí kostní tkáně a rozvoje osteoporózy [61, 132].

V naší studii byl gen ATM identifikován jako cílový gen několika diferencovaně exprimovaných miRNA, konkrétně miR-106a-5p, miR-218-5p, miR-92a-3p a miR-181a-5p, což může napovídat o jejím centrálním postavení v integrační síti regulující odpověď na buněčný stres.

ATM tedy může být regulován na několika úrovních prostřednictvím miRNA s rozdílnými funkčními profily:

- miR-106a-5p je spojována s regulací buněčného cyklu a proliferace [106, 107, 108],
- miR-218-5p s osteoblastickou diferenciací a Wnt signalizací [110, 111, 112],
- miR-92a-3p s osteogenní aktivitou a PI3K/AKT signalizací [114],
- miR-181a-5p s remodelací kosti a regulací kostní resorpce. [115, 122].

Tato skutečnost naznačuje, že změny v expresi těchto miRNA mohou společně modulovat aktivitu ATM a tím ovlivňovat rovnováhu mezi opravou poškozené DNA a indukcí senescence v kostních buňkách. V kontextu osteoporózy by tak narušení této jemně regulované osy mohlo přispívat ke snížení osteoblastické aktivity, zvýšené resorpci kosti a ke zvýšené akumulaci senescentních buněk.

5.5.5 CUX1

CUX1 kóduje transkripční faktor CUX1, který se podílí na regulaci buněčného cyklu, diferenciace a odpovědi na buněčný stres. Jeho aktivita byla popsána v souvislosti s řízením proliferace a s modulační funkcí v procesu oprav DNA, přičemž alterace jeho exprese byla spojována jak s poruchami buněčného cyklu, tak s procesy buněčného stárnutí.

Nedávno publikované studie identifikovaly CUX1 jako zásadní transkripční represor p16INK4a. CUX1 se přímo váže na CDKN2A a potlačuje transkripci p16. Inhibice CUX1 vede k aktivaci osy p16–CDK4/6–RB a k navození stabilního buněčného cyklového zástavu. CUX1 tedy představuje hlavní negativní regulátor p16 a hraje klíčovou roli v udržení proliferativní kapacity buněk během stárnutí [134, 135, 136].

Analýza sítě miRNet v naší studii ukázala, že CUX1 je predikovaně propojen s miR-92a-3p, miR-155-5p a miR-218-5p, které patří mezi diferencovaně exprimované miRNA v osteoporotické kostní tkáni. Toto propojení naznačuje, že uvedené miRNA se mohou podílet na regulaci stresové odpovědi kostních buněk prostřednictvím CUX1.

Propojení těchto klíčových genů (AGO1/AGO4, ALDH9A1, AURKA, ATM a CUX1) s diferencovaně exprimovanými miRNA naznačuje existenci komplexních regulačních okruhů, jejichž narušení může přispívat k poruše kostní homeostázy u osteoporózy. Zvláště významná se jeví integrace signálů spojených s opravou DNA, oxidačním stresem a regulací osteoblastické aktivity.

6 Závěr

Ve své disertační práci jsem si vytyčila jednak obecný cíl a dále dva specifické cíle (A a B). 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. 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.

7 Seznam použité literatury

[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] Singer A, Exuzides A, Spangler L, O'Malley C, Colby C, Johnston K, et al. Burden of illness for osteoporotic fractures compared with other serious diseases among postmenopausal women in the United States. Mayo Clin Proc. 2015 Jan;90(1):53-62. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.09.011. Epub 2014 Dec 4. PMID: 25481833.

[6] 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.

[7] 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.

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

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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.

[12] Cosman F, Lewiecki EM, Eastell R, Ebeling PR, Jan De Beur S, Langdahl B, et al. Goal-directed osteoporosis treatment: ASBMR/BHOF task force position statement 2024. J Bone Miner Res. 2024 Sep 26;39(10):1393-1405. doi: 10.1093/jbmr/zjae119. PMID: 39073912; PMCID: PMC11425703.

[13] 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.

[14] Delmas PD, van de Langerijt L, Watts NB, Eastell R, Genant H, Grauer A, et al; IMPACT Study Group. Underdiagnosis of vertebral fractures is a worldwide problem: the IMPACT study. J Bone Miner Res. 2005 Apr;20(4):557-63. doi: 10.1359/JBMR.041214. Epub 2004 Dec 6. PMID: 15765173.

[15] 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.

[16] Kroupova K, Palicka V. Treat to target in postmenopausal osteoporosis treatment or how long to treat osteoporosis. Farmakoter Revue. 2018;3:1–5.

[17] Tay E. Hip fractures in the elderly: operative versus nonoperative management. Singapore Med J. 2016 Apr;57(4):178-81. doi: 10.11622/smedj.2016071. PMID: 27075376; PMCID: PMC4853483.

[18] Hoza P, Hála T, Pilný J. Zlomeniny proximálního femuru a jejich řešení. Med Pro Praxi. 2008;5(10):393–397.

[19] Huntjens KM, van Geel TC, Geusens PP, Winkens B, Willems P, van den Bergh J, et al. Impact of guideline implementation by a fracture nurse on subsequent fractures and mortality in patients presenting with non-vertebral fractures. Injury. 2011 Sep;42 Suppl 4:S39-43. doi: 10.1016/S0020-1383(11)70011-0. PMID: 21939802.

[20] Fracture Risk Assessment Tool, FRAX®, © Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, 2023. [citováno 9/2025] Dostupné z: https://www.fraxplus.org/cs/calculation-tool/.

[21] Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, et al. A reference standard for the description of osteoporosis. Bone. 2008 Mar;42(3):467-75. doi: 10.1016/j.bone.2007.11.001. Epub 2007 Nov 17. PMID: 18180210.

[22] Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Národní radiologické standardy a indikační kritéria – kostní denzitometrie. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR; 2024. Věstník MZ ČR, částka 6, vydáno 15. 5. 2024. [citováno 11/2025 11] Dostupné z: https://mzd.gov.cz/wp-content/uploads/2024/05/Vestnik-MZ-6-2024.pdf.

[23] 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.

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

[25] 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.

[26] 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.

[27] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997 Apr 18;89(2):309-19. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80209-3. PMID: 9108485.

[28] 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.

[29] 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.

[30] 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.

[31] 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.

[32] Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. Cells. 2020 Sep 10;9(9):2073. doi: 10.3390/cells9092073. PMID: 32927921; PMCID: PMC7564526.

[33] Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nat Med. 2011 Sep 11;17(10):1231-4. doi: 10.1038/nm.2452. PMID: 21909105.

[34] Birbrair A, Frenette PS. Niche heterogeneity in the bone marrow. Ann N Y Acad Sci. 2016 Apr;1370(1):82-96. doi: 10.1111/nyas.13016. Epub 2016 Mar 25. PMID: 27015419; PMCID: PMC4938003.

[35] Hattner R, Epker BN, Frost HM. Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. Nature. 1965 May 1;206(983):489-90. doi: 10.1038/206489a0. PMID: 5319106.

[36] Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. Metab Bone Dis Relat Res. 1982;4(1):1-6. doi: 10.1016/0221-8747(82)90002-9. PMID: 7121250.

[37] Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. Bonekey Rep. 2014 Jan 8;3:481. doi: 10.1038/bonekey.2013.215. PMID: 24466412; PMCID: PMC3899560.

[38] Weivoda MM, Chew CK, Monroe DG, Farr JN, Atkinson EJ, Geske JR, et al. Identification of osteoclast-osteoblast coupling factors in humans reveals links between bone and energy metabolism. Nat Commun. 2020 Jan 7;11(1):87. doi: 10.1038/s41467-019-14003-6. PMID: 31911667; PMCID: PMC6946812.

[39] Dallas SL, Park-Snyder S, Miyazono K, Twardzik D, Mundy GR, Bonewald LF. Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein. J Biol Chem. 1994 Mar 4;269(9):6815-21. PMID: 8120044.

[40] Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. Nat Med. 2009

Jul;15(7):757-65. doi: 10.1038/nm.1979. Epub 2009 Jul 5. PMID: 19584867; PMCID: PMC2727637.

[41] 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.

[42] Khosla S. Pathogenesis of age-related bone loss in humans. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2013 Oct;68(10):1226-35. doi: 10.1093/gerona/gls163. Epub 2012 Aug 24. PMID: 22923429; PMCID: PMC3826857.

[43] 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.

[44] Wein MN, Kronenberg HM. Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Aug 1;8(8):a031237. doi: 10.1101/cshperspect.a031237. PMID: 29358318; PMCID: PMC6071549.

[45] Vahidi G, Rux C, Sherk VD, Heveran CM. Lacunar-canalicular bone remodeling: Impacts on bone quality and tools for assessment. Bone. 2021 Feb;143:115663. doi: 10.1016/j.bone.2020.115663. Epub 2020 Sep 26. PMID: 32987198; PMCID: PMC7769905.

[46] Davis HM, Pacheco-Costa R, Atkinson EG, Brun LR, Gortazar AR, Harris J, et al. Disruption of the Cx43/miR21 pathway leads to osteocyte apoptosis and increased osteoclastogenesis with aging. Aging Cell. 2017 Jun;16(3):551-563. doi: 10.1111/acel.12586. Epub 2017 Mar 19. PMID: 28317237; PMCID: PMC5418188.

[47] Shen W, Scherzer R, Gantz M, Chen J, Punyanitya M, Lewis CE, et al. Relationship between MRI-measured bone marrow adipose tissue and hip and spine bone mineral density in African-American and Caucasian participants: the CARDIA study. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Apr;97(4):1337-46. doi: 10.1210/jc.2011-2605. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22319043; PMCID: PMC3319176.

[48] Wang X, Qu Z, Zhao S, Luo L, Yan L. Wnt/β-catenin signaling pathway: proteins' roles in osteoporosis and cancer diseases and the regulatory effects of natural compounds on osteoporosis. Mol Med. 2024 Oct 28;30(1):193. doi: 10.1186/s10020-024-00957-x. PMID: 39468464; PMCID: PMC11520425.

[49] Doolittle ML, Saul D, Kaur J, Kroupova K, Monroe DG, Khosla S, et al. 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.

[50] Gaudio A, Pennisi P, Bratengeier C, Torrisi V, Lindner B, Mangiafico RA, et al. Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. J Clin Endocrinol Metab. 2010 May;95(5):2248-53. doi: 10.1210/jc.2010-0067. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20305005.

[51] Zhang L, Guan Q, Wang Z, Feng J, Zou J, Gao B. Consequences of Aging on Bone. Aging Dis. 2023 Nov 20;15(6):2417-2452. doi: 10.14336/AD.2023.1115. PMID: 38029404; PMCID: PMC11567267.

[52] Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/β-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. Signal Transduct Target Ther. 2022 Jan 3;7(1):3. doi: 10.1038/s41392-021-00762-6. PMID: 34980884; PMCID: PMC8724284.

[53] 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.

[54] 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.

[55] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. Cell. 2013 Jun 6;153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039. PMID: 23746838; PMCID: PMC3836174.

[56] 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.

[57] 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.

[58] Lam B, Roudier E. Considering the Role of Murine Double Minute 2 in the Cardiovascular System? Front Cell Dev Biol. 2019 Dec 10;7:320. doi: 10.3389/fcell.2019.00320. PMID: 31921839; PMCID: PMC6916148.

[59] Herr LM, Schaffer ED, Fuchs KF, Datta A, Brosh RM Jr. Replication stress as a driver of cellular senescence and aging. Commun Biol. 2024 May 22;7(1):616. doi: 10.1038/s42003-024-06263-w. PMID: 38777831; PMCID: PMC11111458.

[60] Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 7;102(23):8222-7. doi: 10.1073/pnas.0503095102. Epub 2005 May 31. PMID: 15928077; PMCID: PMC1149439.

[61] Schmitt CA, Wang B, Demaria M. Senescence and cancer - role and therapeutic opportunities. Nat Rev Clin Oncol. 2022 Oct;19(10):619-636. doi: 10.1038/s41571-022-00668-4. Epub 2022 Aug 31. PMID: 36045302; PMCID: PMC9428886.

[62] 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.

[63] Riis S, Murray JB, O'Connor R. IGF-1 Signalling Regulates Mitochondria Dynamics and Turnover through a Conserved GSK-3β-Nrf2-BNIP3 Pathway. Cells. 2020 Jan 8;9(1):147. doi: 10.3390/cells9010147. PMID: 31936236; PMCID: PMC7016769.

[64] Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA

damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 21;96(26):14973-7. doi: 10.1073/pnas.96.26.14973. PMID: 10611322; PMCID: PMC24757.

[65] Yan J, Chen S, Yi Z, Zhao R, Zhu J, Ding S, et al. The role of p21 in cellular senescence and aging-related diseases. Mol Cells. 2024 Nov;47(11):100113. doi: 10.1016/j.mocell.2024.100113. Epub 2024 Sep 19. PMID: 39304134; PMCID: PMC11564947.

[66] Harris EJ, Karaoglu DA, Sukhanova M, Abaza Y, Karantanos T, Eisfeld AK, et al. Clinical and molecular characterization of TP53-mutant acute lymphoblastic leukemia in adults. Blood Cancer J. 2025 Aug 14;15(1):138. doi: 10.1038/s41408-025-01350-5. PMID: 40813576; PMCID: PMC12354737.

[67] Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. Nat Rev Cancer. 2014 May;14(5):359-70. doi: 10.1038/nrc3711. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24739573; PMCID: PMC4049238.

[68] Zhang X, Wang J, Tang K, Yang Y, Liu X, Yuan S, et al. The cell cycle regulator p16 promotes tumor infiltrated CD8+ T cell exhaustion and apoptosis. Cell Death Dis. 2024 May 15;15(5):339. doi: 10.1038/s41419-024-06721-7. PMID: 38750022; PMCID: PMC11096187.

[69] Khosla S, Farr JN, Monroe DG. Cellular senescence and the skeleton: pathophysiology and therapeutic implications. J Clin Invest. 2022 Feb 1;132(3):e154888. doi: 10.1172/JCI154888. PMID: 35104801; PMCID: PMC8803328.

[70] Zoico E, Nori N, Darra E, Tebon M, Rizzatti V, Policastro G, et al. Senolytic effects of quercetin in an in vitro model of pre-adipocytes and adipocytes induced senescence. Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1):23237. doi: 10.1038/s41598-021-02544-0. PMID: 34853352; PMCID: PMC8636588.

[71] Naeem M, Majeed S, Hoque MZ, Ahmad I. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. Cells. 2020 Jul 2;9(7):1608. doi: 10.3390/cells9071608. PMID: 32630835; PMCID: PMC7407193.

[72] Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. Nature. 2020 Feb;578(7794):229-236. doi: 10.1038/s41586-020-1978-5. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32051598; PMCID: PMC8992613.

[73] European Medicines Agency (EMA). Casgevy: EPAR – medicine overview. Amsterdam: European Medicines Agency; 2024 Feb 28 [citováno 8/2025]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/casgevy.

[74] U.S. Food and Drug Administration. CASGEVY™ (exagamglogene autotemcel): highlights of prescribing information. Silver Spring (MD): FDA; 2023 [citováno 8/2025]. Dostupné z: https://www.fda.gov/media/174615/downloadattachment.

[75] Gasek NS, Kuchel GA, Kirkland JL, Xu M. Strategies for Targeting Senescent Cells in Human Disease. Nat Aging. 2021 Oct;1(10):870-879. doi: 10.1038/s43587-021-00121-8. Epub 2021 Oct 7. PMID: 34841261; PMCID: PMC8612694.

[76] 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.

[77] Chang H, Yi B, Ma R, Zhang X, Zhao H, Xi Y. CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. Sci Rep. 2016 Feb 29;6:22312. doi: 10.1038/srep22312. PMID: 26924382; PMCID: PMC4770416.

[78] Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. Cells. 2020 Jan 23;9(2):276. doi: 10.3390/cells9020276. PMID: 31979244; PMCID: PMC7072450.

[79] 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 [citováno 8/2025]. Dostupné z: https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2024/press-release.

[80] Seal RL, Braschi B, Gray K, Jones TEM, Tweedie S, Haim-Vilmovsky L, Bruford EA. Genenames.org: the HGNC resources in 2023. Nucleic Acids Res. 2023 Jan

6;51(D1):D1003-D1009. doi: 10.1093/nar/gkac888. PMID: 36243972; PMCID: PMC9825485.

[81] Ganesh RB, Maerkl SJ. Biochemistry of Aminoacyl tRNA Synthetase and tRNAs and Their Engineering for Cell-Free and Synthetic Cell Applications. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Jul 1;10:918659. doi: 10.3389/fbioe.2022.918659. PMID: 35845409; PMCID: PMC9283866.

[82] Li W, Agrawal RK. Joachim Frank's Binding with the Ribosome. Structure. 2019 Mar 5;27(3):411-419. doi: 10.1016/j.str.2018.11.006. Epub 2018 Dec 27. PMID: 30595455; PMCID: PMC11062599.

[83] Qu H, Fang X. A brief review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2013 Jun;11(3):135-41. doi: 10.1016/j.gpb.2013.05.001. Epub 2013 May 28. PMID: 23722115; PMCID: PMC4357814.

[84] ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature. 2012 Sep 6;489(7414):57-74. doi: 10.1038/nature11247. PMID: 22955616; PMCID: PMC3439153.

[85] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.

[86] Palazzo AF, Lee ES. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? Front Genet. 2015 Jan 26;6:2. doi: 10.3389/fgene.2015.00002. PMID: 25674102; PMCID: PMC4306305.

[87] 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.

[88] Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. Vet Pathol. 2014 Jul;51(4):759-74. doi: 10.1177/0300985813502820. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24045890; PMCID: PMC4013251.

[89] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11. doi: 10.1038/35888. PMID: 9486653.

[90] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature. 2000 Feb 24;403(6772):901-6. doi: 10.1038/35002607. PMID: 10706289.

[91] miRBase. Browse miRBase by species (271 organisms). [citováno 8/ 2025]. Dostupné z: https://www.mirbase.org/browse/

[92] 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.

[93] 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.

[94] 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.

[95] Kapinas K, Delany AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. Arthritis Res Ther. 2011 May 27;13(3):220. doi: 10.1186/ar3325. PMID: 21635717; PMCID: PMC3218876.

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

[97] 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.

[98] 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.

[99] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009 Feb 20;136(4):642-55. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035. PMID: 19239886; PMCID: PMC2675692.

[100] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002. PMID: 19167326; PMCID: PMC3794896.

[101] 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.

[102] Salamat MR, Salamat AH, Abedi I, Janghorbani M. Relationship between Weight, Body Mass Index, and Bone Mineral Density in Men Referred for Dual-Energy X-Ray Absorptiometry Scan in Isfahan, Iran. J Osteoporos. 2013;2013:205963. doi: 10.1155/2013/205963. Epub 2013 Oct 3. PMID: 24222888; PMCID: PMC3814102.

[103] 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.

[104] 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.

[105] Murphy E, Glüer CC, Reid DM, Felsenberg D, Roux C, Eastell R, Williams GR. Thyroid function within the upper normal range is associated with reduced bone mineral density and an increased risk of nonvertebral fractures in healthy euthyroid postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Jul;95(7):3173-81. doi: 10.1210/jc.2009-2630. Epub 2010 Apr 21. PMID: 20410228.

[106] Tai L, Huang CJ, Choo KB, Cheong SK, Kamarul T. Oxidative Stress Down-Regulates MiR-20b-5p, MiR-106a-5p and E2F1 Expression to Suppress the G1/S Transition of the Cell Cycle in Multipotent Stromal Cells. Int J Med Sci. 2020 Feb 4;17(4):457-470. doi: 10.7150/ijms.38832. PMID: 32174776; PMCID: PMC7053300.

[107] Yang C, Dou R, Yin T, Ding J. MiRNA-106b-5p in human cancers: diverse functions and promising biomarker. Biomed Pharmacother. 2020 Jul;127:110211. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110211. Epub 2020 May 4. PMID: 32422566.

[108] Li H, Li T, Wang S, Wei J, Fan J, Li J, et al. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res. 2013 May;10(3):313-24. doi: 10.1016/j.scr.2012.11.007. Epub 2012 Dec 3. PMID: 23399447.

[109] Sun Z, Shi J, Yang C, Chen X, Chu J, Chen J, et al. Identification and evaluation of circulating exosomal miRNAs for the diagnosis of postmenopausal osteoporosis. J Orthop Surg Res. 2023 Jul 26;18(1):533. doi: 10.1186/s13018-023-04020-z. PMID: 37496029; PMCID: PMC10373377.

[110] Ji X, Chen X, Yu X. MicroRNAs in Osteoclastogenesis and Function: Potential Therapeutic Targets for Osteoporosis. Int J Mol Sci. 2016 Mar 9;17(3):349. doi: 10.3390/ijms17030349. PMID: 27005616; PMCID: PMC4813210.

[111] Hassan MQ, Maeda Y, Taipaleenmaki H, Zhang W, Jafferji M, Gordon JA, et al. miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. J Biol Chem. 2012 Dec 7;287(50):42084-92. doi: 10.1074/jbc.M112.377515. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23060446; PMCID: PMC3516754.

[112] Zhou Q, Zhou L, Li J. MiR-218-5p-dependent SOCS3 downregulation increases osteoblast differentiation inpostmenopausal osteoporosis. J Orthop Surg Res. 2023 Feb 15;18(1):109. doi: 10.1186/s13018-023-03580-4. PMID: 36793115; PMCID: PMC9930297.

[113] Kou J, Zheng X, Guo J, Liu Y, Liu X. MicroRNA-218-5p relieves postmenopausal osteoporosis through promoting the osteoblast differentiation of bone marrow

mesenchymal stem cells. J Cell Biochem. 2020 Feb;121(2):1216-1226. doi: 10.1002/jcb.29355. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31478244.

[114] Hu L, Liu J, Xue H, Panayi AC, Xie X, Lin Z, et al. miRNA-92a-3p regulates osteoblast differentiation in patients with concomitant limb fractures and TBI via IBSP/PI3K-AKT inhibition. Mol Ther Nucleic Acids. 2021 Feb 15;23:1345-1359. doi: 10.1016/j.omtn.2021.02.008. PMID: 33717654; PMCID: PMC7920808.

[115] Liu J, Chang X, Dong D. MicroRNA-181a-5p Curbs Osteogenic Differentiation and Bone Formation Partially Through Impairing Runx1-Dependent Inhibition of AIF-1 Transcription. Endocrinol Metab (Seoul). 2023 Feb;38(1):156-173. doi: 10.3803/EnM.2022.1516. Epub 2023 Jan 6. PMID: 36604945; PMCID: PMC10008668.

[116] Zheng Z, Wu L, Li Z, Tang R, Li H, Huang Y, et al. Mir155 regulates osteogenesis and bone mass phenotype via targeting S1pr1 gene. Elife. 2023 Jan 4;12:e77742. doi: 10.7554/eLife.77742. PMID: 36598122; PMCID: PMC9839347.

[117] 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 Oct;79:43-51. doi: 10.1016/j.bone.2015.05.027. Epub 2015 May 28. PMID: 26026730.

[118] 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 Nov 20;7(1):15861. doi: 10.1038/s41598-017-16113-x. PMID: 29158518; PMCID: PMC5696459.

[119] Shah S, Pendleton E, Couture O, Broachwalla M, Kusper T, Alt LAC, et al. P53 regulation of osteoblast differentiation is mediated through specific microRNAs. Biochem Biophys Rep. 2021 Feb 1;25:100920. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100920. PMID: 33553686; PMCID: PMC7859171.

[120] Wang G, Zhang L, Yan C, Wang F, Zhang Y. Overexpression of miR125b Promotes Osteoporosis Through miR-125b-TRAF6 Pathway in Postmenopausal Ovariectomized Rats. Diabetes Metab Syndr Obes. 2021 Feb 15;14:671-682. doi: 10.2147/DMSO.S288338. PMID: 33623402; PMCID: PMC7894909.

[121] Minamizaki T, Nakao Y, Irie Y, Ahmed F, Itoh S, Sarmin N, et al. The matrix vesicle cargo miR-125b accumulates in the bone matrix, inhibiting bone resorption in mice. Commun Biol. 2020 Jan 16;3(1):30. doi: 10.1038/s42003-020-0754-2. PMID: 31949279; PMCID: PMC6965124.

[122] Schoen C, Bloemen M, Carels CEL, Verhaegh GW, Van Rheden R, Roa LA, et al. A potential osteogenic role for microRNA-181a-5p during palatogenesis. Eur J Orthod. 2023 Sep 18;45(5):575-583. doi: 10.1093/ejo/cjad037. PMID: 37454242; PMCID: PMC10756689.

[123] Zhang L, Zhang C, Zheng J, Wang Y, Wei X, Yang Y, et al. miR-155-5p/Bmal1 Modulates the Senescence and Osteogenic Differentiation of Mouse BMSCs through the Hippo Signaling Pathway. Stem Cell Rev Rep. 2024 Feb;20(2):554-567. doi: 10.1007/s12015-023-10666-3. Epub 2023 Dec 27. PMID: 38150082; PMCID: PMC10837250.

[124] Ma H, Li M, Jia Z, Chen X, Bu N. MicroRNA-455-3p promotes osteoblast differentiation via targeting HDAC2. Injury. 2022 Nov;53(11):3636-3641. doi: 10.1016/j.injury.2022.08.047. Epub 2022 Aug 21. PMID: 36070969.

[125] Xu D, Zhu H, Wang C, Zhu X, Liu G, Chen C, et al. microRNA-455 targets cullin 3 to activate Nrf2 signaling and protect human osteoblasts from hydrogen peroxide. Oncotarget. 2017 Jul 22;8(35):59225-59234. doi: 10.18632/oncotarget.19486. PMID: 28938631; PMCID: PMC5601727.

[126] Wang Q, Miao Y, Qian Z, Chen L, Lu T, Xu Y, et al. MicroRNA-15a-5p plays a role in osteogenic MC3T3-E1 cells differentiation by targeting PDCD4 (programmed cell death 4) via Wnt/β-catenin dependent signaling pathway. Bioengineered. 2021 Dec;12(1):8173-8185. doi: 10.1080/21655979.2021.1977766. PMID: 34672248; PMCID: PMC8806754.

[127] 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.

[128] Sala L, Chandrasekhar S, Vidigal JA. AGO unchained: Canonical and non-canonical roles of Argonaute proteins in mammals. Front Biosci (Landmark Ed). 2020 Jan 1;25(1):1-42. doi: 10.2741/4793. PMID: 31585876; PMCID: PMC6827344.

[129] 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.

[130] Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. Free Radic Biol Med. 2013 Mar;56:89-101. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010. Epub 2012 Nov 27. PMID: 23195683; PMCID: PMC3631350.

[131] 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.

[132] 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.

[133] Hirozane T, Tohmonda T, Yoda M, Shimoda M, Kanai Y, Matsumoto M, et al. Conditional abrogation of Atm in osteoclasts extends osteoclast lifespan and results in reduced bone mass. Sci Rep. 2016 Sep 28;6:34426. doi: 10.1038/srep34426. PMID: 27677594; PMCID: PMC5039636.

[134] Jiang D, Sun W, Wu T, Zou M, Vasamsetti SB, Zhang X, et al. Post-GWAS functional analysis identifies CUX1 as a regulator of p16INK4a 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.

[135] Ramdzan ZM, Vadnais C, Pal R, Vandal G, Cadieux C, Leduy L, et al. RAS transformation requires CUX1-dependent repair of oxidative DNA damage. PLoS Biol.

2014 Mar 11;12(3):e1001807. doi: 10.1371/journal.pbio.1001807. PMID: 24618719; PMCID: PMC3949673.

[136] Chan ASL, Narita M. A role for CUX1 in the regulation of p16 and senescence. Nat Aging. 2022 Feb;2(2):100-101. doi: 10.1038/s43587-022-00173-4. PMID: 37117762.

8 Přílohy

8.1 Informovaný souhlas

Formulář informovaného souhlasu

(Institucionární výzkum FN HK)

Ústav klinické biochemie a diagnostiky

Fakultní nemocnice Hradec Králové

Sokolská 581, 500 05, Hradec Králové

Vážená paní, vážený pane,

byl/a jste osloven/a pro možnost odběru vzorku Vaší krve a kostní tkáně a jejich následné archivace. Cílem tohoto projektu je sběr biologického materiálu pacientů s osteoporózou, s následným zaměřením výzkumu na vývoj nových metod prevence, diagnostiky a léčby tohoto metabolického onemocnění.

Osteoporóza je jedním z 10 nejčastějších onemocnění na světě, které představuje velkou zdravotní a ekonomickou zátěž pro pacienta. Právě výzkum může významně pomoci účinné prevenci, včasné diagnostice a efektivní léčbě této choroby.

Archivace materiálu může být pro Vás také výhodou. Za několik let, kdy mohou být k dispozici nové diagnostické a léčebné metody, lze doplnit příslušné molekulárně biologické vyšetření, které může být vodítkem k optimální léčbě.

Odběr materiálu Vás nijak nezatíží. Pokud jde o vyšetření krve, bude provedeno při standardním odběru krve, který je Vám dělán před každým operačním výkonem, nepůjde

tedy o další vpich. Pro výzkumné účely potřebujeme pouze 6 ml krve, pro Vaši představu je to objem menší než polévková lžíce. Odběr kostní tkáně Vám bude proveden z hlavice kyčelní kosti, která Vám bude při operaci odstraněna a odběr bude proveden až po vynětí hlavice mimo Vaše tělo.

Archivace bude prováděna anonymně. Tedy z Vašich vzorků odstraníme Vaše jméno, rodné číslo a jiné identifikační údaje a zkumavky označíme anonymním kódem. Vzorky Vaší krve a kostní tkáně se biochemicky a molekulárně zpracují a nezpracované části vzorků zůstanou uloženy v archivu, dokud se nespotřebují. Vzorky budou použity pouze k výzkumu osteoporózy. Pokud budou vzorky podrobeny genetickému testování, bude se jednat výhradně o vyšetření genů majících vztah ke vzniku, diagnostice a léčbě osteoporózy.

Z uchování biologického materiálu a jeho použití pro potřeby lékařské vědy

a výzkumu pro Vás neplyne finanční ani jiný bezprostřední osobní prospěch. Také zároveň z archivace pro vědecké použití pro Vás a Vaši zdravotní pojišťovnu neplyne žádné ohrožení nebo nevýhody či platby.

Souhlas můžete bez jakýchkoliv nepříznivých důsledků buď odmítnout, nebo již podepsaný souhlas kdykoliv později odvolat. Případné Vaše odstoupení od studie nepovede v žádném případě k žádnému postihu ani nijak neovlivní péči, kterou Vám naši lékaři poskytují.

Budete-li chtít jakékoli další informace o tomto projektu nebo o právech účastníků projektu, můžete kontaktovat pověřené osoby.

Řešitel projektu: Mgr. Květa Kroupová

email: kroupovkv@lfhk.cuni.cz, tel.: 734 522 991

Kontaktní osoby: prim. MUDr. Petr Hoza

e-mail: petr.hoza@nempk.cz, tel.: 775 785 616

Mgr. Marcela Chmelařová, Ph.D.

email: marcela.chmelarova@fnhk.cz, tel.: 495 833 864

Rádi bychom Vás tímto požádali o souhlas s odebráním vzorku krve a kostní tkáně a s jejich následným uchováním pro potřeby lékařské vědy a výzkumu.

Prohlašuji, že jsem četl/a úvodní informace, které mi byly zdravotnickým pracovníkem sděleny a vysvětleny, že jsem měl/a možnost se zeptat na vše, co pokládám za podstatné a mé dotazy mi byly zdravotnickým pracovníkem zodpovězeny.

Prohlašuji, že jsem podaným informacím a vysvětlením porozuměl/a, a na základě poskytnutých informací a své svobodné vůle souhlasím s odběrem krve o objemu cca 6 ml krve a kostní tkáně velikosti cca 2x 40 mm. Vzorky krve i kostní tkáně ve zkumavkách budou zamraženy při -80°C v hlubokomrazícím boxu a archivovány v prostorách ÚKBD Fakultní nemocnice v Hradci Králové, dokud nebudou provedeny navazující analýzy.

Pacient(ka) ..... Datum narození.....

příjmení jméno titul

Podpis pacienta: ..... Datum: .....

Podpis klinického pracovníka: ..... Datum:.....

8.2 Žádanka na vyšetření