UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta
3. interní klinika
U Nemocnice 1, 128 00 Praha 2

Posudek oponenta disertační práce

Doktorský studijní program: Klinická biochemie

Název disertační práce: MikroRNA jako biomarkery a regulátory senescence a osteoporózy

Autorka práce: PhDr. Květa Vrablíková, MBA

Pracoviště autorky: Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponent: doc. MUDr. Vít Zikán, Ph.D.

Pracoviště oponenta: 3. interní klinika VFN a 1. LF UK v Praze

Předmětem disertační práce PhDr. Květy Vrablíkové je studium role mikroRNA asociovaných s buněčnou senescencí v patogenezi osteoporózy. Práce se zaměřuje na identifikaci specifických miRNA v lidské kostní tkáni pacientů s osteoporózou a na zhodnocení jejich vztahu ke klinickým parametrům onemocnění. Cílem je objasnit molekulární mechanismy osteoporózy přímo v bioptických vzorcích lidské kosti a určit, které senescencí asociované miRNA jsou nezávisle spojeny s přítomností osteoporózy. Studie tak přispívá k lepšímu porozumění regulace buněčné senescence a kostní remodelace v kontextu tohoto onemocnění.

Struktura práce je logicky členěna do teoretického úvodu, detailního popisu metodiky, prezentace vlastních výsledků, diskuse a závěru. Práce obsahuje 97 stran textu doplněného bohatou obrazovou dokumentací, tabulkami a grafy, které přehledně ilustrují dosažené výsledky. Závěr dokumentu doplňuje použitá literatura a přehled publikační činnosti autorky.

Cílem disertační práce je identifikovat mikroRNA asociované s buněčnou senescencí v kostní tkáni pacientů s osteoporózou a posoudit jejich patofyziologický význam i potenciální využití jako markerů buněčné senescence u tohoto onemocnění. Specificky se práce zaměřuje na (1) molekulární analýzu lidské kostní tkáně s cílem odhalit deregulované miRNA spojené se senescencí a osteoporózou a (2) zhodnocení vztahu těchto miRNA ke klinickým parametrům osteoporózy, včetně denzity kostního minerálu, markerů kostní remodelace a přítomnosti zlomenin.

Teoretický úvod se zaměřuje na patofyziologii osteoporózy a popisuje rizikové faktory, diagnostické postupy (zejména DXA a FRAX) a principy kostní remodelace řízené rovnováhou mezi osteoklasty, osteoblasty a osteocyty. Zdůrazněny jsou věkem podmíněné změny kostní tkáně a narušení regulačních drah ovlivňujících kostní homeostázu. Dále je pozornost věnována buněčné senescenci jako klíčovému mechanismu stárnutí, jejím regulačním drahám (p53/p21 a p16/RB) a vlivu senescentních buněk prostřednictvím SASP na kvalitu kostní tkáně. Úvod shrnuje význam nekódujících RNA, zejména mikroRNA, které regulují genovou expresi na posttranskripční úrovni a podílejí se na řízení buněčné diferenciace, stresové odpovědi i senescence. Variabilita jejich exprese a zapojení do signálních drah z nich činí perspektivní biomarkery i potenciální terapeutické cíle u osteoporózy.

Metodika práce vychází z průřezové observační studie zahrnující 46 pacientů indikovaných k totální endoprotéze kyčelního kloubu (21 s osteoporotickou zlomeninou a 25 kontrol s osteoartrózou). U všech proběhlo klinické vyšetření včetně denzitometrie (DXA), laboratorního vyšetření a zhodnocení rizika zlomenin (FRAX). Během operace byl z krčku femuru odebrán bioptický vzorek kostní tkáně, ze kterého byla izolována celková RNA včetně frakce miRNA. Exprese předem definovaného panelu 11 miRNA asociovaných se senescencí a osteoporózou byla analyzována metodou kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) s použitím TaqMan technologie. Statistické zpracování zahrnovalo porovnání exprese mezi skupinami pomocí Studentova t-testu, výpočet relativní exprese (fold change), korelační analýzy a vícerozměrné zobecněné lineární modely (GLM) k posouzení vztahu mezi expresí miRNA a klinickými parametry osteoporózy.

Hlavní výsledky práce lze shrnout následovně: Soubor tvořilo 46 pacientů (21 s osteoporózou po nízkotraumatické fraktuře, 25 kontrol s osteoartrózou). Skupiny se nelišily ve věku, pohlaví ani kouření.

- Výsledky práce prokázaly, že pacienti s osteoporózou měli oproti kontrolní skupině nižší BMI, nižší T- a Z-skóre v oblasti proximálního femuru a známky zvýšeného kostního obratu (CTX-1 v séru). Obě skupiny měly deficit 25(OH) vitaminu D, u pacientů s osteoporózou bylo nižší sérové kalcium a nižší celková bílkovina. FRAX se mezi skupinami významně nelišil.
- Analýza exprese miRNA v bioptických vzorcích lidské kostní tkáně odhalila významné rozdíly mezi skupinami. U pacientů s osteoporózou byla výrazně upregulována miR-106a-5p (přibližně čtyřnásobně), zatímco miR-34a-5p, miR-155-5p a miR-218-5p byly signifikantně downregulovány. MiR-92a-3p a miR-181a-5p vykazovaly trend k rozdílné expresi.

- Multivariační analýza potvrdila nezávislou pozitivní asociaci miR-106a-5p a miR-92a-3p s osteoporózou, zatímco miR-34a-5p, miR-181a-5p a miR-218-5p vykázaly nezávislou negativní asociaci. U miR-181a-5p byla navíc prokázána vazba na markery kostního obratu. Výsledky tak podporují význam vybraných senescencí asociovaných miRNA v patogenezi osteoporózy přímo v lidské kostní tkáni.

Hodnocení disertační práce:

Práce zdůrazňuje význam propojení molekulárních nálezů z lidské kostní tkáně s klinickými a biochemickými parametry pacientů, což umožňuje komplexnější pochopení patofyziologie osteoporózy. Výsledky ukázaly, že samotná BMD ani nástroj FRAX nedokážou plně vystihnout skutečné riziko zlomenin, protože nezohledňují kvalitu kostní tkáně a molekulární změny spojené se senescencí. U pacientů s osteoporózou byl potvrzen zvýšený kostní obrat s převahou resorpce a identifikována specifická deregulace vybraných miRNA. Multivariační analýza prokázala nezávislou pozitivní asociaci miR-106a-5p a miR-92a-3p s osteoporózou a nezávislou negativní asociaci miR-34a-5p, miR-218-5p a miR-181a-5p. Síťová analýza potvrdila jejich zapojení do drah regulujících odpověď na poškození DNA a buněčnou senescenci (ATM–p53–p21 a p16/RB), což podporuje jejich biologickou relevanci v kontextu kostní homeostázy.

Výsledky práce jsou velmi zajímavé a klinicky podnětné a představují významný příspěvek k poznání molekulárního pozadí osteoporózy. Otevírají prostor pro další experimentální i klinický výzkum v oblasti biomarkerů, stratifikace rizika zlomenin a cílených terapeutických intervencí zaměřených na senescenční dráhy. Získaná data mají vysoký potenciál k publikaci v odborném recenzovaném impaktovaném časopise.

Dotazy na uchazečku:

1) Domníváte se, že zjištěné změny exprese miRNA odrážejí spíše dlouhodobé procesy spojené se senescencí, nebo akutní odpověď kostní tkáně na poškození? Jaké experimentální uspořádání by mohlo tuto otázku objasnit?
2) Jaký je potenciál identifikovaných miRNA (např. miR-106a-5p či miR-34a-5p) pro klinické využití jako biomarkerů rizika zlomenin? Předpokládáte jejich využitelnost spíše v kostní tkáni, nebo v cirkulaci (např. v séru)?
3) Vidíte potenciál cílené modulace senescenčních drah (např. prostřednictvím senolytik či miRNA-terapie) jako realistický terapeutický směr u osteoporózy?

Závěr:

Disertační práce PhDr. Květy Vrablíkové splnila stanovené cíle a přinesla unikátní data získaná přímo z lidské kostní tkáně. Současně však upozorňuje na limity studie, zejména nemožnost jednoznačně odlišit vliv samotné osteoporózy od vlivu přítomné fraktury a komplexní pleiotropní působení miRNA. Přesto výsledky významně rozšiřují poznatky o roli miRNA v patogenezi osteoporózy a otevírají prostor pro další výzkum v oblasti biomarkerů, stratifikace rizika zlomenin a cílených terapeutických strategií zaměřených na senescenční dráhy. Práce splňuje požadavky kladené na disertační práci a jednoznačně dokládá předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké činnosti. Doporučuji udělení titulu „**Ph.D.“** za jménem.

Publikační činnost: Autorka se tématu osteoporózy dlouhodobě věnuje a je spoluautorkou celkem **11 odborných publikací**, z toho **2 práce vyšly v impaktovaných časopisech** (IF 5,9 a IF 2,06). Jedna z těchto prací je původní vědecká studie publikovaná v prestižním mezinárodním časopise, druhá je přehledový článek zaměřený na farmakoterapii osteoporózy. Získaná data předložené disertační práce mají vysoký potenciál k další publikaci v odborném impaktovaném časopise. Ostatní odborné práce byly publikovány v recenzovaných neimpaktovaných časopisech a zahrnují témata buněčné senescence, léčby osteoporózy, organizace péče o pacienty s osteoporózou a problematiku Fracture Liaison Services. Přehled publikační činnosti doplňují také dvě kvalifikační práce (rigorózní práce a MBA thesis) zaměřené na kvalitu a organizaci péče o pacienty s osteoporózou.

doc. MUDr. Vít Zikán, Ph.D.
3.interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha
E-mail. vit.zikan@vfn.cz

V Praze 28.2.2026