



Ekspresija mikroRNK (miRNK) u mijelodisplastičnom sindromu (MDS)

Expression of micro RNAs (miRNAs) in myelodysplastic syndrome (MDS)

Mirjana Mariana Kardum Paro^{1,2}, Inga Mandac Rogulj³, Gordana Kaić⁴, Biljana Jelić Puškarić⁴, Ika Kardum-Skelin^{4,6}, Anita Škrtić^{5,6}, Slobodanka Ostojić Kolonić^{3,6}

¹ Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

² Sveučilišni centar za forenzične znanosti Sveučilišta u Splitu, Split

³ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

⁴ Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

⁵ Klinički zavod za patologiju i citologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

⁶ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Deskriptori

MIJELODISPLASTIČNI SINDROMI – genetika, krv, patologija; MikroRNK – genetika, krv; HEMATOPOEZA – genetika; LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU – metode; ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE; REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE; AKUTNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA – genetika

Descriptors

MYELODYSPLASTIC SYNDROMES – blood, genetics, pathology; MicroRNAs – blood, genetics; HEMATOPOIESIS – genetics; REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION – methods; GENETIC EXPRESSION PROFILING; GENE EXPRESSION REGULATION; LEUKEMIA, MYELOID, ACUTE – genetics

SAŽETAK. Sindrom mijelodisplazije ili mijelodisplastični sindrom (MDS) naziv je za skupinu heterogenih klonskih hematoloških poremećaja hematopoetskih matičnih stanica, praćenih neučinkovitim hematopoezom jedne ili više staničnih linija i pojavom posljedičnih citopenija s povišenim rizikom od progresije u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML). Mikroglasične ribonukleinske kiseline (miRNK; engl. *Micro Messenger Ribonucleic Acid* – miRNA) kratke su, nekodirajuće molekule RNK koje, osim što pridonose patogenezi MDS-a, djeluju i kao regulatori epigenetičkih mehanizama i potencijalno su prognostički biljezi za ranu dijagnostiku i klasifikaciju MDS-a. Cilj je rada bilo ispitivanje razine promjene genskih ekspresija specifičnih miRNK (hsa-miR-125a, hsa-miR-99b, hsa-miR-126 i hsa-miR-125b) u plazmi zdravih dobrovoljaca i ispitanika s dijagnozom MDS-a. Ispitivanje se provodilo u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur, akreditiranome prema normi EN ISO 15189:2012. Genske ekspresije navedenih, specifičnih miRNK određene su u uzorcima plazme zdravih dobrovoljaca (4) i ispitanika s MDS-om (33) kojima je on dijagnosticiran u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur, Referentnom centru Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske za dijagnostiku i liječenje MDS-a. Statistički značajne razlike genske ekspresije specifičnih miRNK u zdravih dobrovoljaca u odnosu prema ispitanicima s MDS-om nisu nađene [P (hsa-miR-125a) = 0,398; P (hsa-miR-99b) = 0,134; P (hsa-miR-126) = 0,305; P (hsa-miR-125b) = 0,079], a razina promjene genskih ekspresija miRNK (engl. *miRNA ratios*) hsa-miR-125a i hsa-miR-99b u ispitanika s MDS-om bila je gotovo dva puta viša u odnosu prema normaliziranim razinama genske ekspresije u zdravih dobrovoljaca (2,30 prema 1,90) i više od dva puta viša od razine promjene genske ekspresije miRNK hsa-miR-125b. Rezultati istraživanja upućuju na to da bi genske ekspresije miRNK hsa-miR-125a i hsa-miR-99b mogle biti regulirane istim mehanizmom i da bi mogle biti klinički važne u ispitanika s MDS-om.

SUMMARY. Myelodysplasia or myelodysplastic syndrome (MDS) is the name for a group of heterogeneous clonal hematological disorders of hematopoietic stem cells followed by ineffective hematopoiesis of one or more cell lines and the emergence of consequent cytopenias with increased risk of progression to acute myelogenous leukemia (AML). Micro Messenger Ribonucleic Acids (miRNAs) are short, non-coding RNA molecules that, apart from contributing to MDS pathogenesis, act as regulators of epigenetic mechanisms and also are recognized as potential prognostic markers for early diagnosis and classification of MDS. The aim of the study was to examine the levels of gene expression of specific miRNAs (hsa-miR-125a, hsa-miR-99b, hsa-miR-126 and hsa-miR-125b) in healthy volunteers plasma and MDS diagnosed patients. Gene expressions of miRNAs were determined at the Clinical Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine, Merkur University Hospital, accredited according to EN ISO 15189:2012, in plasma samples of four healthy volunteers and 33 MDS patients diagnosed at the Institute of Hematology of the Clinic for Internal Diseases of Merkur University Hospital, Reference Center of the Ministry of Health of the Republic of Croatia for Diagnosis and Treatment of MDS. Statistically significant difference in gene expression of miRNA in healthy volunteers compared to the MDS patients was not found [P (hsa-miR-125a) = 0.398; P (hsa-miR-99b) = 0.134; P (hsa-miR-126) = 0.305; P (hsa-miR-125b) = 0.079]. miRNA ratios of hsa-miR-125a and hsa-miR-99b in MDS patients were almost twice as high compared to normalized levels of

Adresa za dopisivanje:

Izv. prof. dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro, Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Klinička bolnica Merkur, I. Zajca 19, 10000 Zagreb; e-mail: mkardum@kb-merkur.hr

Primljeno 6. svibnja 2019., prihvaćeno 1. srpnja 2019.

gene expression in healthy volunteers (2.30 versus 1.90), and the level of change of miRNAs hsa-miR-125 and hsa-miR-99b was more than two times higher than the level of change of miRNA hsa-miR-125b. Finally, the results of the research indicate that the gene expression of miRNAs hsa-miR-125a and hsa-miR-99b could be regulated by the same mechanism and could be clinically relevant in MDS patients.

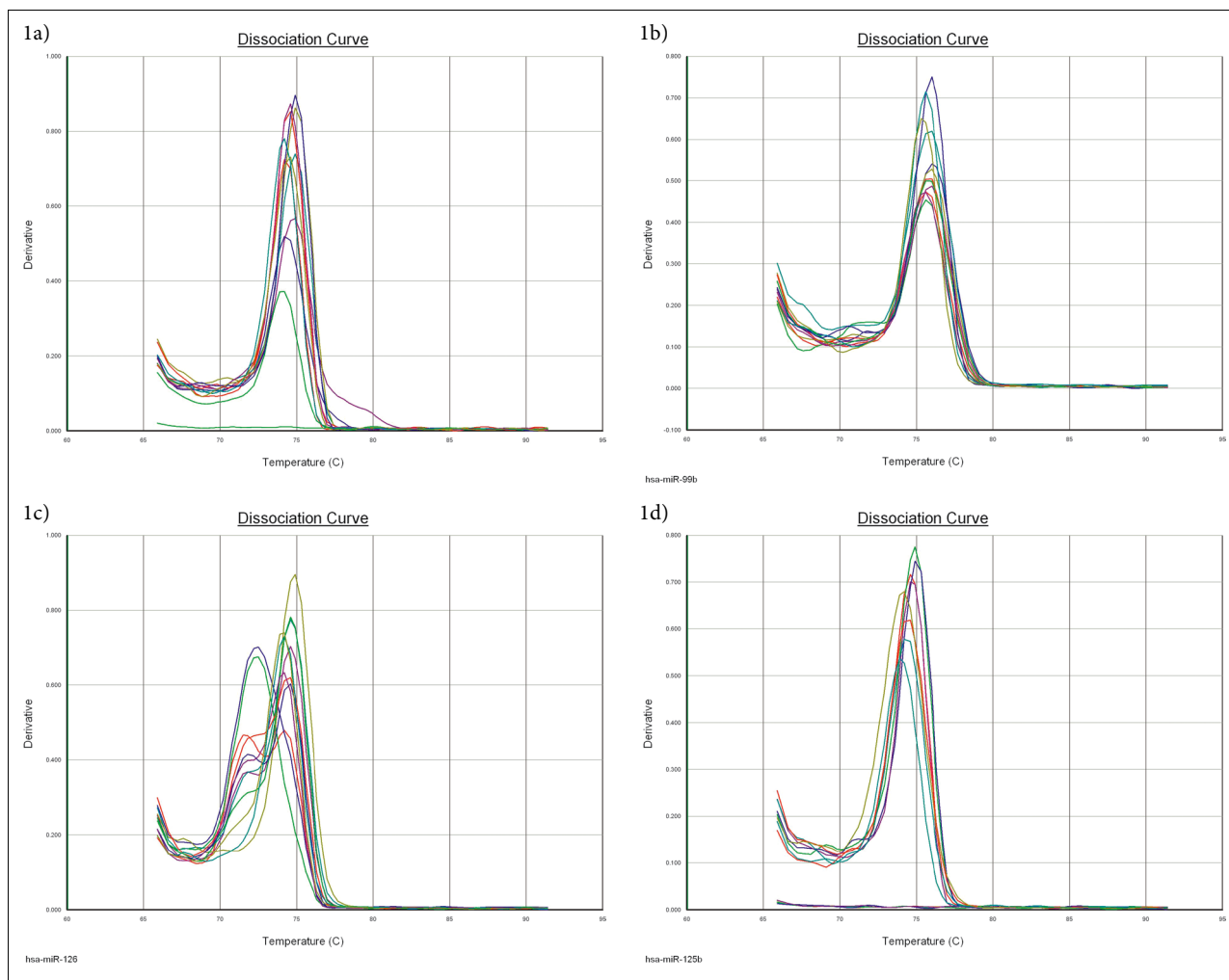
Sindrom mijelodisplazije ili mijelodisplastični sindrom (engl. *Myelodysplastic syndrome* – MDS) naziv je za skupinu heterogenih klonskih hematoloških poremećaja hematopoetskih matičnih stanica, praćenih neučinkovitom hematopoezom jedne ili više staničnih linija uz pojavu posljedičnih citopenija s povišenim rizikom od progresije u akutnu mijeloičnu leukemiju (engl. *Acute Myeloid Leukemia* – AML). Prema vrijedećoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization* – WHO), dijagnoza MDS-a temelji se na morfološkim, kliničkim, citogenetičkim, imunofenotipskim i biološkim kriterijima.¹ Sukladno hrvatskim smjericama Radne skupine za MDS Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti (KROHEM), u svakodnevnoj kliničkoj praksi dijagnoza se MDS-a temelji na citomorfološkoj analizi stanica periferne krvi i koštane srži, određivanju postotka blasta, tipa i stupnja displazije, prisutnosti prstenastih sideroblasta i citogenetičkoj analizi stanica koštane srži.²

Mikroglasničke ribonukleinske kiseline (miRNK; engl. *Micro Messenger Ribonucleic Acids* – miRNAs) kratke su, nekodirajuće molekule duljine 18 do 25 nukleotida, koje imaju važnu ulogu u regulaciji razvoja i metabolizma stanica, njihovoj diferencijaciji i proliferaciji, regulaciji staničnog ciklusa i stanične smrti.^{3,4} Tumorske stanice oslobađaju miRNK-e u cirkulaciju (plazmu, serum) gdje ostaju relativno stabilni. Iako je njihovo otkriće omogućilo povezivanje bolesti i genske ekspresije miRNK, preduvjet za njihovu kliničku primjenu jest određivanje genske ekspresije kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu uz zadovoljavajuću učinkovitost i specifičnost.^{3,5} U literaturi se genska ekspresija miRNK dovodi u vezu s dijagnozom, klasifikacijom i progresijom različitih bolesti: B-kroničnom limfocitnom leukemijom (B-KLL),⁶ karcinomom pluća,⁷ hepatocelularnim karcinomom,⁸ akutnom mijeloičnom leukemijom (AML).⁹ Istraživanja miRNK u MDS-u relativno su rijetka, većina ih je usmjerena na višestruko profiliranje različitih miRNK, a tek nekoliko na patogenezu i nastanak MDS-a s kojim se u vezu dovode snižene razine genskih ekspresija specifičnih miRNK hsa-miR-146a, hsa-miR-150, let-7e, hsa-miR-23a, hsa-miR-103, hsa miR-126.^{10–12} Povišenu razinu genske ekspresije miRNK hsa-miR-125b u MDS-u opisali su 2008. godine Bousquet i suradnici.¹³ Za izračun rizika od progresije MDS-a u AML-u rabi se Međunarodni prognostički bodovni sustav (engl. *International Prognostic Scoring System* – IPSS) uz uzimanje u obzir

dobi i komorbiditeta bolesnika.² U literaturi je u ispitanika s MDS-om niskog rizika (engl. *International Prognostic Scoring System Low Risk* – IPSS LR) opisana povišena razina genske ekspresije miRNK let-7a u odnosu prema onoj u ispitanika s MDS-om visokog rizika (engl. *International Prognostic Scoring System High Risk* – IPSS HR).^{10–12} Najčešće istraživani specifični miRNK-i hsa-miR-125a i hsa-miR-125b, koji su uključeni u regulaciju hematopoeze i stanične diferencijacije u MDS-u, te hsa-miR-125a i hsa-miR-99b u literaturi su opisani kao „potencijalni prognostički biljezi rane dijagnostike i klasifikacije MDS-a“.¹²

Ispitanici i metode

Ispitivanje se provodilo u laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur, akreditiranome prema normi EN ISO 15189:2012. Genske ekspresije specifičnih miRNK hsa-miR-125a, hsa-miR-99b, hsa-miR-126 i hsa-miR-125b određene su u uzorcima plazme nakon centrifugiranja uzoraka pune krvi (K₂EDTA, BD Vacutainer, 6 mL) u zdravih dobrovoljaca (4) (1 muškarac i 3 žene; dob 38 godina; raspon 21 – 56 godina) i ispitanika s MDS-om (33) (23 muškarca i 10 žena; dob 71 godina; raspon 35 – 82 godine), kojima je on dijagnosticiran u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur, Referentnom centru Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske za dijagnostiku i liječenje mijelodisplastičnog sindroma. Dijagnoza MDS-a postavljena je na temelju citomorfološke analize stanica periferne krvi i koštane srži, određivanjem postotka blasta, tipa i stupnja displazije, prisutnosti prstenastih sideroblasta i citogenetičke analize stanica koštane srži, i to sukladno hrvatskim smjericama Radne skupine za MDS Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti (KROHEM).² Informirani ispitanici potpisali su pristanak na sudjelovanje u istraživanju. Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Merkur odobrila su istraživanje koje se provelo u skladu s etičkim standardima.¹⁴ Iz uzoraka pune krvi (K₂EDTA, BD Vacutainer, 6 mL) centrifugiranjem (1900 g; 10 minuta; 2 – 8 °C) i ultracentrifugiranjem (16.000 g; 10 minuta; 2 – 8 °C) izdvojena je plazma iz koje je izoliran miRNK (miRNeasy Serum/Plasma Kit, QIAGEN GmbH) što je postupkom reverzne transkripcije preveden u komplementarni DNK (miScript II RT Kit, QIAGEN GmbH). Genske ekspresije specifičnih miRNK hsa-miR-125a, hsa-miR-99b, hsa-miR-



SLIKA 1A) – 1D). SPECIFIČNOST UMNAŽANJA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE (QPCR) SPECIFIČNIH MI RNA: 1A) HSA-MIR-125A, 1B) HSA-MIR-99B, 1C) HSA-MIR-126 I 1D) HSA-MIR-125B PROCIJENJENA NA TEMELJU DISOCIJACIJSKIH KRIVULJA (ENGL. DISSOCIATION CURVES) MI RNA NASTALIH ZAVRŠETKOM STANDARDNOG PROGRAMA TALJENJA NEPOSREDNO PO ZAVRŠETKU UMNAŽANJA.

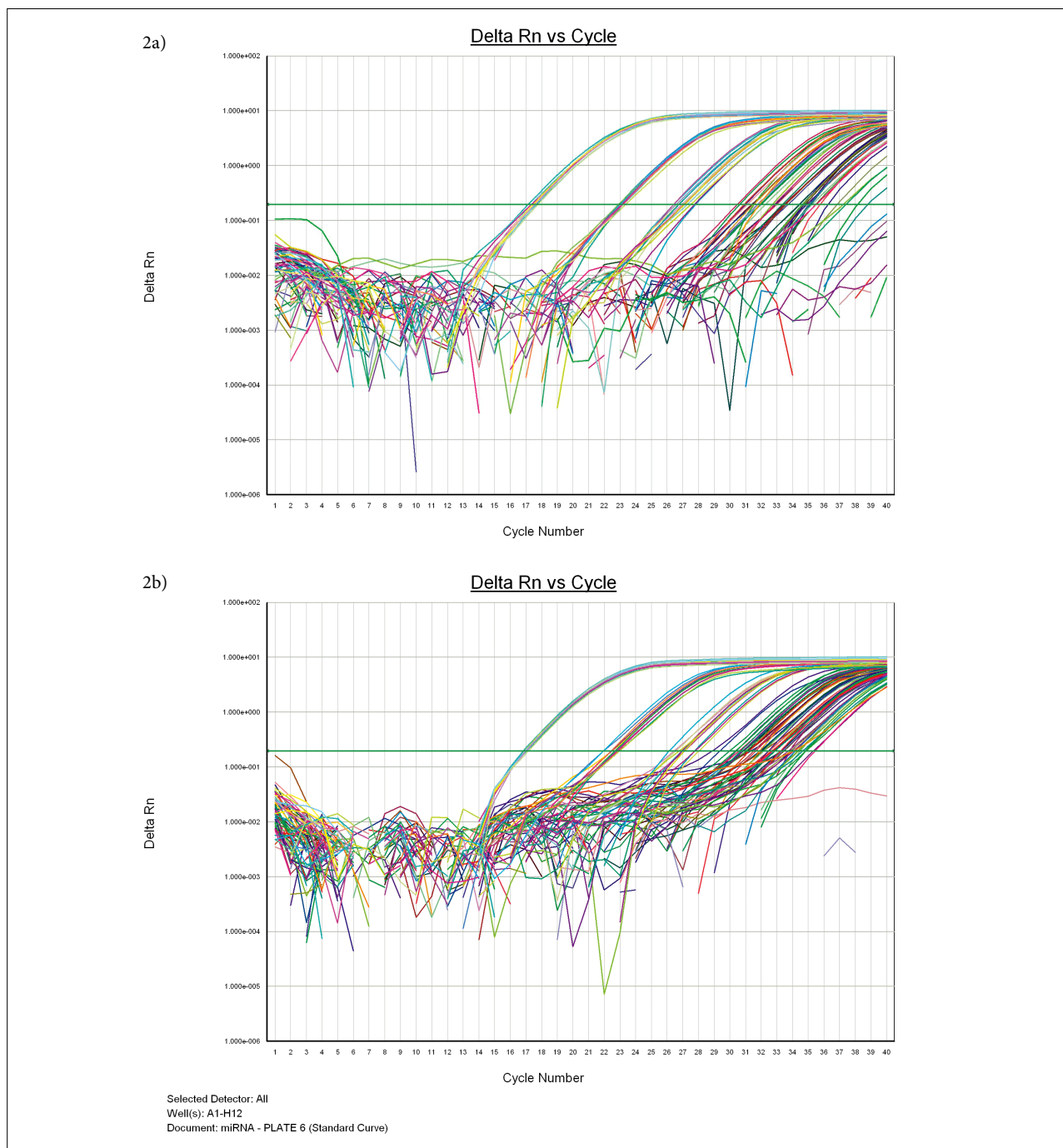
FIGURE 1A) – 1D). SPECIFICITY OF QPCR RUNS OF SPECIFIC MI RNAs: 1A) HSA-MIR-125A, 1B) HSA-MIR-99B, 1C) HSA-MIR-126 AND 1D) HSA-MIR-125B ASSESSED BY THE DEFAULT SOFTWARE MELTING PROGRAM IMMEDIATELY AFTER THE CYCLING PROGRAM COMPLETION.

-126 i hsa-miR-125b određene su lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* – q-RT PCR) na mjernom instrumentu 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) uporabom specifičnih početnica i označavanjem interkalirajućom fluorescentnom bojom (miScript SYBR Green PCR Kit/Custom PCR Array, QIAGEN GmbH, Holden, Republika Njemačka) prema protokolu proizvođača. Pritom smo kontrolirali kvalitetu izoliranih miRNK, kao i prisutnost inhibitora reverzne transkripcije (miRTC i PPC, QIAGEN, GmbH, Holden, Republika Njemačka). Normalizacija podataka genske ekspresije specifičnih miRNK obavljena je uz specifičan, kontrolni miRNK (cell-miR-39) dizajniran od proizvođača, a podaci su analizirani s pomoću progra-

ma za obradu podataka koji rabi metodu $\Delta\Delta C_t$ (GeneGlobe Data Analysis Center, QIAGEN, <https://www.qiagen.com/kr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page>).

Rezultati

Uz preporučene vrijednosti praga broja ciklusa umnožavanja (engl. *threshold cycle* – C_t) ($C_t = 15 - 35$) i nagiba pravca za cell-miR-39 (-2,887) dobili smo zadovoljavajuću učinkovitost kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (q-RT PCR) (115,6%), čija je specifičnost procijenjena na temelju disocijacijskih krivulja (engl. *Dissociation Curves*) specifičnih miRNK nastalih završetkom standardnog programa taljenja neposredno nakon završetka q-RT



SLIKA 2A) – 2B). OSNOVNE POSTAVKE I UVJETI KVALITATIVNOG UMNAŽANJA miRNA LANČANOM REKACIJOM POLIMERAZE. OSNOVNE POSTAVKE BILE SU JEDNAKE U SVIM CIKLUSIMA UMNAŽANJIMA RADI KAKO BI SE OMOGUĆILA USPOREDBA REZULTATA. FIGURE 2A) – 2B). THE BASELINE SETTINGS. THE BASELINE SETTINGS WERE THE SAME ACROSS ALL QPCR RUNS TO ALLOW COMPARISON OF RESULTS.

PCR-a (slike 1.a – 1.d). Istovjetne maksimalne vrijednosti disocijacijskih krivulja specifičnih miRNK hsa-miR-125a, hsa-miR-99b, hsa-miR-126 i hsa-miR-125b upozoravaju na visoku specifičnost miRNK i odsutnost nespecifičnih produkata. Postavkom bazne linije na istu razinu iznad pozadinske fluorescencije (engl. *threshold line*) i jednake uvjete reakcije tijekom

svih ciklusa umnožavanja osigurane su usporedivost i analiza dobivenih rezultata (slike 2.a – 2.b). Statistički značajna razlika genske ekspresije specifičnih miRNK u zdravih dobrovoljaca u odnosu prema onoj u ispitanika s MDS-om nije nađena [P (hsa-miR-125a) = 0,398; P (hsa-miR-99b) = 0,134; P (hsa-miR-126) = 0,305; P (hsa-miR-125b) = 0,079]. Razina promjene

TABLICA 1. ANALIZA PODATAKA GENSKIH EKSPRESIJA SPECIFIČNIH miRNA (GENEGLOBE DATA ANALYSIS CENTER, QIAGEN).
 TABLE 1. SPECIFIC HSA-miR QPCR DATA ANALYZED ACCORDING TO THE GENEGLOBE DATA ANALYSIS CENTER (QIAGEN).

miRNA /hsa-miR	Srednja vrijednost ΔC_T /mean value of ΔC_T		$2^{-\Delta C_T}$	Razina promjene /miRNA ratios	Razina povećanja genske ekspresije miRNA /level of change of hsa-miR		
	skupina ispitanika s MDS-om /MDS patients	zdravi dobrovoljci /healthy volunteers			skupina ispitanika s MDS-om /MDS patients	zdravi dobrovoljci /healthy volunteers	skupina ispitanika s MDS-om /MDS patients) /zdravi dobrovoljci /healthy volunteers
hsa-miR-125a*	6.14	7.37	0.014153	0.006162	2.30	2.30	0.398
hsa-miR-99b	6.31	7.24	0.012580	0.006638	1.90	1.90	0.134
hsa-miR-126	3.98	4.61	0.063306	0.040950	1.55	1.55	0.305
hsa-miR-125b	6.42	6.15	0.011706	0.014106	0.83	-1.21	0.079
cell-miR-39	0.00	0.00	1.000000	1.000000	1.00	1.00	0.0000

genskih ekspresija miRNK (engl. *miRNA ratios*) hsa-miR-125a i hsa-miR-99b u ispitanika s MDS-om bila je gotovo dva puta viša u odnosu prema normaliziranim razinama genske ekspresije u zdravih dobrovoljaca (cell-miR-39; 2,30 prema 1,90), a razina promjene genskih ekspresija miRNK hsa-miR-125 i hsa-miR-99b bila je više od dva puta viša od razine promjene genske ekspresije miRNK hsa-miR-125b (tablica 1.). Razina promjene i razina povećanja genske ekspresije specifičnoga, kontrolnog miRNK (cell-miR-39) dizajniranog od proizvođača nakon normalizacije podataka, obavljene prema preporukama proizvođača s pomoću programa za obradu podataka koji rabi metodu $\Delta\Delta C_T$, iznosile su 1,00 (tablica 1.).

Rasprava

U dijagnostici cirkulirajućeg miRNK rabe se različite metode određivanja njegove genske ekspresije od kojih su najčešće metoda otiska *northern*,^{15,16} metoda mikrorešetke,¹⁷ hibridizacija *in situ* i metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (q-RT PCR),^{18,19} a svaka od njih ima prednosti i ograničenja (tablica 2.). Iako se određivanje genske ekspresije miRNK ili njegovo višestruko profiliranje metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu smatra „zlatnim standardom“, ono ovisi o odabiru platforme, metodologiji (načinu izolacije i pripreme miRNK), načinu normalizacije i analize rezultata (apsolutna ili relativna kvantifikacija). Smjernice za standardizaciju i kontrolu kvalitete određivanja genske ekspresije miRNK kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu podrazumijevaju uporabu optimalne metode normalizacije.^{20,21} Pri analizi rezultata apsolutnom kvantifikacijom uobičajeni je način normalizacije podataka

prema preporukama proizvođača ili nekim od referentnih gena, jer se tako mogu ukloniti eventualne metodološki uvjetovane razlike u kvaliteti izoliranog miRNK, a koje ne odražavaju stvarne promjene njegove genske ekspresije. Smatra se da je najbolji i preporučeni način normalizacije podataka kombinacija endogenih i egzogenih kontrolnih miRNK.^{22,23} Posljednjih su godina otkriveni različiti miRNK-i koji patogenezi neke bolesti pridonose bilo modulacijom tumorskih onkogenih ili modulacijom gena za tumorski supresor, a pri patogenezi MDS-a (s dokazanim kromosomskim promjenama i normalnim kariotipom) regulacijom epigenetičkih mehanizama.¹² Otkrivena je povišena razina genske ekspresije više od 18 različitih miRNK u ispitanika s MDS-om u usporedbi sa zdravim dobrovoljcima.¹⁰ Prema literaturnim podacima, istražuju se različiti miRNK-i, što odražava heterogenost MDS-a kao klonškoga hematološkog poremećaja ili može biti direktna posljedica različitih protokola istraživanja. U ispitanika s MDS-om niskog rizika (IPSS LR) dokazana je povišena razina genske ekspresije miRNK let-7a u odnosu prema onoj u ispitanika s MDS-om visokog rizika (IPSS HR).¹⁵ Nadalje, povišena razina genske ekspresije miRNK hsa-miR-125a u ispitanika s MDS-om u odnosu prema genskoj ekspresiji u zdravih dobrovoljaca (povišena više od 2 puta u 71% ispitanika s MDS-om) u korelaciji je s prognozom bolesti (ispitanici s MDS-om i povišenom razinom genske ekspresije hsa-miR-125a imali su lošiju prognozu). Povišene razine genskih ekspresija miRNK hsa-miR-125a i hsa-miR-99b (povišene više od 2 puta od onih u zdravih dobrovoljaca) otkrivene su u približno 30% ispitanika s MDS-om. Pretpostavlja se da je koekspresija njihovih genskih ekspresija posljedica kodiranosti istim klasterom DNK.^{11,24} Treći član ovog klastera DNK jest miRNK let-7e. Svi literaturni podaci

TABLICA 2. NAJČEŠĆE METODE ODREĐIVANJA GENSKE EKSPRESIJE miRNA (PRILAGOĐENO PREMA DE PLANELL-SAGUERA M, RODICIO MC. ANALYTICAL ASPECTS OF MICRORNA IN DIAGNOSTICS: A REVIEW. ANALYTICA CHIMICA ACTA 2011;699:134-152.).
 TABLE 2. MiRNA GENE EXPRESSION METHODS (DE PLANELL-SAGUERA M, RODICIO MC. ANALYTICAL ASPECTS OF MICRORNA IN DIAGNOSTICS: A REVIEW. ANALYTICA CHIMICA ACTA 2011;699:134-152.) (CUSTOMIZED).

Metoda Method	Mehanizam djelovanja Mechanism of action	Prednostimete Method advantages	Nedostaci metode Method disadvantages
northernblot / northern blot analysis	komplementarna oligonukleotidna sonda se veže na ciljnu miRNA uhvaćena nitroceluloznu membranu / the complementary oligonucleotide probe binds to the target miRNA captured on the nitrocellulose membrane	široko primjenjiva / widely applicable kvantitativna / quantitative zadovoljavajuće specifičnosti / satisfactory specificity	nisko osjetljiva / low sensitive potrebne velike količine uzorka / requires large sample volumes vremenski zahtjevna / time consuming
analizamikropostroja / microarray analysis	hibridizacijanukleinskih kiselina između miRNA i odgovarajuće komplementarne sonde imobilizirane na mikropostroj / nucleic acid hybridization between the hsa-miR and the corresponding complementary probe immobilized on a microarray	profiliranje višestrukih miRNA / multiple hsa-miR profiling istovremena analiza više miRNA / simultaneous analysis of multiple hsa-miR brza analiza podataka / rapid data analysis	nisko osjetljiva / low sensitive nisko specifična / low specific
in situ hibridizacija / in situ hybridization	detekcija miRNA hibridizacijom komplementarnog lanca nukleotidne sonde na sekvencu od interesa / hsa-miR detection by hybridization of the complementary nucleotide probe strand to the sequence of interest	razlučivost na staničnoj / substaničnoj razini pomoću neradioaktivnih sondi / resolution on cell or subcell level using non-radioactive probes	dugotrajna / longlasting semikvantitativna / semiquantitative
kvantitativno određivanje lančanom reakcijom polimeraze / quantitative real-time PCR-based detection	reverzna transkripcija ciljane miRNA u komplementarnu DNA uz umnažanje lančanom reakcijom polimeraze što rezultira fluorescencijom / reverse transcription of target miRNA to complementary DNA with multiplication by PCR resulting in fluorescence	visoko osjetljiva / highly sensitive kvantitativna / quantitative točna / accurate jednostavna / simple	visoko osjetljiva / highly sensitive specifična / specific financijski i vremenski zahtjevna / financially and time demanding

upućuju na gensku ekspresiju klastera hsa-miR-99b/let-7e/hsa-miR-125a reguliranu istim mehanizmom i pretpostavku da bi miRNK hsa-miR-99b i hsa-miR-125a mogle biti klinički važne u ispitanika s MDS-om.^{24,25} U radu je razina promjene genskih ekspresija miRNK hsa-miR-125a i hsa-miR-99b u ispitanika s MDS-om bila gotovo dva puta viša od normaliziranih razina genske ekspresije u zdravih dobrovoljaca, što bi moglo upozoravati na to da su upravo ovi specifični miRNK-i najvažniji članovi klastera DNK u patogenezi MDS-a. Nadalje, razina promjene genskih ekspresija miRNK hsa-miR-125 i hsa-miR-99b bila je više od dva puta viša od razine promjene genske ekspresije miRNK hsa-miR-125b. Iako je MDS bolest starijih osoba (medijan dobi iznosi 70 godina), može se javiti u bilo kojoj dobi. U ovom su istraživanju sudjelovala 33 ispitanika s MDS-om (medijan dobi 71; raspona godina 35 – 82). Porast incidencije bolesti u starijih od 70 godina (s 3/100.000 na 20/100.000) mogao bi biti razlog povećanog broja muškaraca među ispitanicima s MDS-om (23), iako žene uobičajeno obolijevaju 1,5 puta češće od muškaraca. Premda su skupine zdravih dobrovoljaca i ispitanika s MDS-om malene s

obzirom na broj ispitanika (4 zdrava ispitanika i 33 ispitanika s MDS-om), u literaturi su uspoređivane i manje grupe (1 – 20 zdravih dobrovoljaca i 20 – 45 ispitanika s MDS-om). No, valja pretpostaviti da je nepostojanje statistički značajne razlike genske ekspresije specifičnih miRNK u zdravih dobrovoljaca u odnosu prema ispitanicima s MDS-om moguće i zbog malog broja ispitanika u skupinama, kao i da bi istraživanje provedeno na većem broju ispitanika vjerojatno moglo utvrditi statistički značajne razlike genske ekspresije ovih miRNK. Ipak, u literaturi se povišene razine genskih ekspresija miRNK hsa-miR-125a i hsa-miR-99b dovode u vezu s lošijom prognozom MDS-a, najvjerojatnije zbog poremećene hematopoeze i stanične diferencijacije koje uzrokuju funkcionalne promjene stanica periferne krvi (anemiju, trombocitopeniju i, rjeđe, neutropeniju).

Zaključak

Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (q-RT PCR) određene su genske ekspresije specifičnih miRNK hsa-miR-125a, hsa-miR-99b, hsa-miR-126 i hsa-miR-125b i ispitanice razine njihove

promjene pri MDS-u u odnosu prema genskim ekspresijama u zdravih dobrovoljaca. Iako nisu nađene statistički značajne razlike genskih ekspresija specifičnih miRNK u zdravih dobrovoljaca u odnosu prema onima u ispitanika s MDS-om, u ispitanika s MDS-om razina je promjene genskih ekspresija miRNK hsa-miR-125a i hsa-miR-99b nakon normalizacije bila gotovo dva puta viša od genske ekspresije u zdravih dobrovoljaca. Rezultati istraživanja upućuju na to da bi genske ekspresije miRNK hsa-miR-125a i hsa-miR-99b mogle biti regulirane istim mehanizmom i da bi mogle biti klinički važne u ispitanika s MDS-om.

Zahvala

Autori zahvaljuju gospođi Mariji Rukavini na moralnoj potpori i Zakladi Ane Rukavine na materijalnoj potpori koja je poduprla i omogućila ovo istraživanje.

LITERATURA

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R i sur. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391–405.
- Gredelj Šimec Nj, Kaić G, Škrtić A i sur. Smjernice za dijagnozu i liječenje bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom. *Liječ Vjesn* 2017;139:1–11.
- Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9(6):703–11.
- Li Y, Kowdley KV. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem* 2012;431:69–75.
- Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 2010;50:244–9.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C i sur. MicroRNA profiling reveals distinct signature in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11755–60.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG i sur. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065–70.
- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K i sur. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006;25:2537–45.
- Fang J, Varney M, Starczynowski DT. Implication of microRNAs in the pathogenesis of MDS. *Curr Pharm Dess* 2012;18(22):3170–9.
- Pons A, Nomdedeu B, Navarro A i sur. Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2009;50(11):1854–9.
- Sokol L, Caceres G, Volinia S i sur. Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2011;153(1):24–32.
- Hussein K, Theophile K, Büsche G i sur. Significant inverse correlation of microRNA-150/MYB and microRNA-222/p27 in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2010;34:328–34.
- Bousquet M, Quelen C, Rosati R i sur. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med* 2008;205:2499–506.
- Narodne novine 25/2015. Pravilnik o kliničkim ispitivanjima lijekova i dobroj kliničkoj praksi. Zagreb: Narodne novine; 2015.
- Vasilatou D, Papageorgiou SG, Dimitriadis G i sur. Epigenetic alterations and microRNAs: new players in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Epigenetics* 2013;8(6):561–70.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I i sur. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 2004;5(3):R13.
- Válóczi A, Hornyk C, Varga N i sur. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucl Acid Res* 2004;32(22):e175.
- Thomson JM, Parker J, Perou CM i sur. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods* 2004;1(1):47–53.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ i sur. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005;33(20):e179.
- de Planell-Saguera M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Anal Chim Acta* 2011;699:134–52.
- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J i sur. MIQE precis: practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 2010;11:74.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real Time quantitative PCR and the 2 Ct Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Schwarzenbach H, Machado da Silva A, Calin G, Pantel K. Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? *Clin Chem* 2015;61(11):1333–42.
- Gañán-Gómez I, Wei Y, Yang H i sur. Overexpression of miR-125a in myelodysplastic syndrome CD34+ cells modulates NF-κB activation and enhances erythroid differentiation arrest. *PLoS ONE* 2014;9(4):e93404.
- Erdogan B, Bosompem A, Peng D i sur. Methylation of promoters of microRNAs and their host genes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2013;54(12):2720–7.