

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Karlo Tudor

**ULOGA POLIMORFIZMA GENA MIR-146A U PRIMARNOM OSTEOARTRITISU
KOLJENA I KUKA**

Doktorski rad

Rijeka, 2024.

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Karlo Tudor

**ULOGA POLIMORFIZMA GENA MIR-146A U PRIMARNOM OSTEOARTRITISU
KOLJENA I KUKA**

Doktorski rad

Rijeka, 2024.

**UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE**

Karlo Tudor

**THE ROLE OF MIR-146A GENE POLYMORPHISM IN PRIMARY KNEE AND HIP
OSTEOARTHRITIS**

PhD thesis

Rijeka, 2024.

Mentori rada:

Izv. prof. dr. sc. Zdravko Jotanović dr. med.

Prof. dr. sc. Zlatko Dembić, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

Rad ima 60 listova.

UDK: _____

Doktorski rad je izrađen u Klinici za ortopediju i traumatologiju Lovran, Katedri za ortopediju i fizikalnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, a istraživanje je provedeno u:

1. Klinici za ortopediju i traumatologiju Lovran, Katedri za ortopediju i fizikalnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska,
2. Zavodu za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska
3. Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Hrvatska,
4. Imunogenetskom odjelu, Zavoda za oralnu biologiju, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Oslu, Norveška.

Zahvaljujem se

Izv. prof. dr. sc. Zdravku Jotanoviću, dr. med., mojem mentoru, koji me vrlo jasno vodio kroz proces izrade doktorske disertacije, povezoao s komentorom, davao savjete, podršku te u najkraćem mogućem vremenskom roku odgovarao na moja pitanja i razjašnjavao moje nedoumice. Također se zahvaljujem na velikoj pomoći prilikom pisanja i objave znanstvenog članka te pomoći prilikom pripreme obrane teme doktorske disertacije i obrane doktorske disertacije.

Prof. dr. sc. Zlatku Dembiću, dr. med., mojem komentoru, koji mi je omogućio provedbu istraživanja na Imunogenetskom odjelu, Zavoda za oralnu biologiju, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Oslu te me na istom mjestu upoznao s radom u laboratoriju, strpljivo nadzirao prilikom rada s genetskim materijalom te me naučio statističkoj obradi, analizi i interpretaciji podataka.

Nasl. doc. dr. sc. Jeleni Knežević, suradnici u istraživanju koja je pri Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Boškovića omogućila provedbu dijela istraživanja - izolaciju genomske DNA uzoraka krvi dijela ispitanika te davala savjete prilikom pisanja znanstvenog članka.

Prof. dr. sc. Sanji Balen, dr. med., spec. transfuzijske medicine, koja je odobrila provedbu dijela istraživanja pri Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra u Rijeci.

Prof. dr. sc Branku Šestanu, dr. med. koji je odobrio provedbu istraživanja u Klinici za ortopediju i traumatologiju Lovran, Katedri za ortopediju i fizikalnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Kompletnom **osoblju Kliničkog odjela za anesteziju i intenzivnu skrb Klinike za ortopediju i traumatologiju Lovran** na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka periferne venske krvi ispitanika uključenih u ovo istraživanje.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj ove studije bio je istražiti odnose između polimorfizama jednog nukleotida (od eng. single nucleotide polymorphisms - SNPs) u genima miR-146a, interleukina-6 (IL-6), toll-like receptora 10 (TLR10) i čimbenika tumorske nekroze alfa (TNFA) te rizika obolijevanja od primarnog osteoartritisisa kuka (od eng. primary hip osteoarthritis - PHOA) i primarnog osteoartritisisa koljena (od eng. primary knee osteoarthritis - PKOA) u hrvatskoj populaciji.

Materijali i metode

Ukupno 609 bolesnika s primarnim osteoartritisom i 656 kontrola genotipizirano je Taqman metodom za SNP u miR-146a (rs2910164, G>C), IL-6 (rs1800795, C>G), TLR10 (rs11096957, C>T) i TNFA (rs1800629, C >T) genima.

Rezultati

Nismo utvrdili statistički značajnu razliku u učestalosti određenih alela i genotipova miR-146a SNP rs2910164 (G>C) između bolesnika s PHOA, PKOA i kontrola. Međutim, pronašli smo statistički značajnu povezanost određenih kombinacija genotipova (stratificirani genotip miR-146a s IL-6 i stratificirani genotip miR-146a s TNFA) s rizikom obolijevanja od PHOA. U bolesnika s PKOA nismo utvrdili povezanost niti jedne kombinacije genotipova s istom bolesti.

Zaključak

U multifaktorijalnoj bolesti kao što je PHOA, utvrdili smo ulogu još jednog modificirajućeg čimbenika (miR-146a), koji očito pridonosi ukupnom riziku obolijevanja od PHOA. Nismo pronašli takvu korelaciju miR-146a s PKOA, što ukazuje da bi ova dva zgloba (kuk i koljeno) mogla imati različite čimbenike koji mijenjaju rizik obolijevanja od OA.

Ključne riječi: Genetska predispozicija, Koljeno, Kuk, Osteoartritis.

SUMMARY

Purpose

The aim of this study was to investigate the relationships between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the miR-146a, interleukin-6 (IL-6), toll-like receptor 10 (TLR10), and tumor necrosis factor alpha (TNFA) genes and the risk for development of advanced-stage primary hip osteoarthritis (PHOA) and primary knee osteoarthritis (PKOA) in the Croatian population.

Materials and methods

A total of 609 primary osteoarthritis (POA) patients and 656 controls were genotyped Taqman PCR method for SNPs in the miR-146a (rs2910164, G>C), IL-6 (rs1800795, C>G), TLR10 (rs11096957, C>T), and TNFA (rs1800629, C>T) genes.

Results

None of the differences were statistically significant comparing either allelic or genotypic frequencies of miR-146a SNP rs2910164 (G>C) between the PHOA and PKOA patients and controls. However, we found significant association with PHOA for the combination of genotypes (stratified miR-146a genotype with the IL-6, and stratified miR-146a genotype with the TNFA). In patients with PKOA, we didn't find the association of any combination of genotypes with the same disease.

Conclusion

In a multifactorial disease such as POA, we have shown the relevance of the second modifying factor (miR-146a), which apparently contributes to the overall risk of PHOA. We found no such correlation with the PKOA, indicating that these two joints might have different risk-modifying factors.

Keywords: Genetic Predisposition to Disease; Hip; Knee; Osteoarthritis.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	1
1.1 UVOD	1
1.2 PATOFIZIOLOGIJA OSTEOARTRITISA.....	2
1.3 DJAGNOSTIKA I KLASIFIKACIJA OSTEOARTRITISA.....	3
1.4 LIJEČENJE OSTEOARTRITISA	6
1.4.1 Nefarmakološko liječenje.....	6
1.4.2 Farmakološko liječenje.....	7
1.4.3 Operacijsko liječenje.....	8
1.5 BIOGENEZA MIKROARNK	8
1.6 IZRAŽAJ MIARNK MOLEKULA U OSTEOARTRITISU	9
1.7 MIARNK I METALOPROTEINAZE	10
1.8 JEDNONUKLEOTIDNI POLIMORFIZMI MIARNK I OSTEOARTRITIS.....	12
1.9 ULOGA MIARNK MOLEKULA U APOPTOZI HONDROCITA.....	13
1.10 MIARNK KAO BIOMARKERI U OSTEOARTRITISU.....	16
1.11 MIARNK-146A.....	17
1.12 CILJNE MOLEKULE MIARNK-146A.....	18
1.12.1 IRAK-1	20
1.12.2 TRAF6	21
1.12.3 NF- κ B.....	21
1.13 ULOGA MIARNK-146A U PATOFIZIOLOGIJI OSTEOARTRITISA	22
1.14 MIARNK-146A I KARCINOMI.....	23
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	26
3. ISPITANICI I METODE	27
3.1 KLINIČKI I RADIOLOŠKI KRITERIJI ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE OSTEOARTRITISA KOLJENA I KUKA.....	28
3.2 KRITERIJI UKLJUČIVANJA I ISKLJUČIVANJA U ISTRAŽIVANJE.....	28
3.2.1 Kriteriji uključivanja u istraživanje.....	28
3.2.2 Kriteriji isključivanja iz istraživanja.....	29
3.3 METODE.....	29

3.3.1	<i>Izolacija genomske DNK iz periferne venske krvi za lančanu reakciju polimeraze</i>	30
3.3.2	<i>Genetska analiza izolirane genomske DNK i lančana reakcija polimeraze</i>	30
4.	REZULTATI	32
5.	RASPRAVA	36
6.	ZAKLJUČCI	44
7.	LITERATURA	46
8.	ŽIVOTOPIS	55

1. UVOD I PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

1.1 Uvod

Osteoartritis (OA) je kronična degenerativna bolest koja zahvaća zglob i periartikularna tkiva, a osnovna je patološka karakteristika bolesti propadanje zglobne hrskavice [1]. Bolest je česta, zahvaća veliki dio populacije te je vodeći uzrok invaliditeta, no trenutno ne postoji adekvatna metoda liječenja, barem ne ona koja djeluje na sam uzrok bolesti [1].

Do sada su poznati brojni rizični čimbenici koji povećavaju predispoziciju za obolijevanje od OA poput dobne skupine, spola, pretilosti, deformacije zgloba, ozljede zgloba, genetike, itd. No danas je poznato da na nastanak OA ipak najveći utjecaj ima specifična genetska podloga [2, 3].

Poznato je više od 100 gena koji mogu utjecati na pojavu i razvoj OA, a osim genetike danas se sve više istražuju epigenetski mehanizmi koji, čini se, također igraju važnu ulogu u patofiziologiji same bolesti [4-7]. Tijekom proteklih dvadeset godina sve se više provode istraživanja o epigenetskim mehanizmima za koje se smatra da su uključeni u razvoj OA [4-7]. Male, nekodirajuće molekule koje se nazivaju mikroRNK (miRNK) ključne su za epigenetske procese. S obzirom na to da OA ima multifaktorijalnu podlogu, navedena je bolest izrazito složene patofiziologije zbog čega je trenutno teško pronaći adekvatan lijek koji bi utjecao na njezin uzrok. Međutim, u novije vrijeme sve je više znanstvenih radova koji se bave ovom problematikom, a u postupku istraživanja su i potencijalni lijekovi koji bi djelovali na određeni molekularni mehanizam u nastanku bolesti [8-10].

Posljedice bolesti liječe se neoperacijski ili operacijski. Operacijski način liječenja je relativno uspješan, ali pogodan samo za bolesnike starije životne dobi. Neoperacijske metode poput fizikalne terapije, modifikacije životnog stila, redukcije tjelesne težine, uporabe nesteroidnih protuupalnih lijekova i korištenja pomagala prilikom hodanja su primjerene u početnim stadijima OA. Veliki problem u ortopedskom liječenju čine mlađi bolesnici koji imaju umjereni/izraženi OA, a zbog dobi nisu dobri kandidati za liječenje ugradnjom endoproteze. Takvi bolesnici često budu liječeni relativno eksperimentalnim metodama i metodama za koje ne postoje jasni znanstveni dokazi u

djelovanju poput viskosuplementarne terapije, plazme obogaćene trombocitima ili matičnim stanicama [11-13]. Trenutno je među bolesnicima popularna terapija matičnim stanicama, što su, zapravo, prvi pokušaji rješavanja ortopedske problematike regenerativnom medicinom. Teško je predvidjeti hoće li jednog dana regenerativna medicina prevladati u liječenju oštećenja hrskavice ili će se rješenje pronaći u lijekovima koji će djelovati na složenu patofiziologiju bolesti.

Cilj ovog rada je istražiti još jedan potencijalni rizični čimbenik za nastanak OA koji djeluje na razini epigenetike i na taj način doprinijeti razumijevanju i rješavanju problematike ove kompleksne bolesti

1.2 Patofiziologija osteoartrisa

OA je bolest koja zahvaća cijeli zglob, uključujući i okolna tkiva poput mišića, ligamenata i tetiva. Smatra se da bolest počinje pojavom mehaničkog stresa uslijed čega dolazi do oslobađanja različitih proupalnih citokina i proteaza u osoba koje imaju neke od čimbenika sklonosti nastanku OA, iako sam proces nije u potpunosti razjašnjen [14].

Osteoartritis započinje na razini hrskavice i to pojavom površinskih fibrilacija, nepravilnosti i izoliranih erozija [14]. Oštećenja hrskavice naposljetku dospiju do kosti i nastavljaju se povećavati, zahvaćajući sve veću površinu zgloba [14]. Povećanjem površine oštećene hrskavice dolazi i do povećanja oštećenja kolagenskog matriksa što rezultira patološkom proliferacijom hondrocita, osifikacije hrskavice i stvaranja osteofita [14]. Postepeno propadanje kolagenog matriksa vodi do apoptoze sve većeg broja hondrocita i time nastaje subhondralna skleroza, stvaranja koštanih cisti i erozija subhondralne kosti [14]. Uz navedene promijene javlja se i izraženi sinovitis [14].

Poznati upalni posrednici uključeni u patogenezu osteoartrisa su interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-17 (IL-17), interleukin-18 (IL-18), monocitni kemoatraktantni protein-1 (od eng. Monocyte Chemoattractant Protein-1 - MCP1), čimbenik inhibicije leukemije (od eng. Leukemia Inhibitory Factor - LIF), onkogen reguliran rastom (od eng. Growth Regulated Oncogene - GRO) i onkostatini M (od eng. oncostatin M - OSM), kao i reaktivne vrste kisika (od eng. Reactive Oxygen

Species - ROS) [14]. Isti posrednici upale potiču razgradnju hondrocita, a proces dovodi do oslobađanja različitih proteaza u vanstanični dio hrskavice [14]. Proteaze najviše zaslužne za razgradnju hrskavičnog matriksa su matriks metaloproteinaze i agrekanaze [15]. Produkti razgradnje hrskavice uzrokuju sinovitis, a makrofagi su najviše zaslužni za sam proces [15]. Navedene stanice fagocitiraju slobodne čestice i proizvode proupalne posrednike što dovodi do zatvorenog ciklusa, a rezultat je propadanje hrskavice [15].

Matriksne metaloproteinaze (od eng. Matrix MetalloProteinases - MMP) kao što su MMP-1, MMP-3, MMP-9 i MMP-13, kao i metaloproteinaze iz porodice dezintegrina i metaloproteinaze s motivom trombospondina (od eng. A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs - ADAMTS) kao što su ADAMTS4 i ADAMTS 5, proizvode se u značajnim količinama u zglobovima zahvaćenim osteoartritisom [15]. Proupalne citokine kao što su interleukin 1 beta (IL-1 β), IL-6 i čimbenik nekroze tumora alfa (od eng. Tumor Necrosis Factor-alpha - TNF- α) proizvode sinovijalne stanice uz proteolitičke enzime [15]. Dok neke kemokine i metaloproteinaze proizvodi sinovijalna membrana, sama hrskavica oslobađa najviše molekula koje uništavaju tkivo [15].

1.3 Djagnostika i klasifikacija osteoartritisa

Dijagnostika osteoartritisa počinje od uzimanja anamneze i kliničkog pregleda te najčešće završava radiogramom zahvaćenog zgloba u dva smjera.

Osobe koje boluju od OA koljena najčešće se žale na bolnost i oticanje zgloba, teškoće s hodanjem, deformaciju ekstremiteta, gubitak pokretljivosti te poteškoće u svakodnevnom funkcioniranju.

Klinički pregled započinje inspekcijom, bolesnik se promatra kako ulazi u ambulantu, tj. kako hoda. Već pri ulasku u ambulantu u bolesnika koji boluje od OA nekih od zglobova donjih ekstremiteta može biti uočljivo šepanje, poremećaj osovine noge te izražena kontraktura. Ispituje se pasivan i aktivan opseg pokreta zgloba, tijekom čega je moguće uočiti krepitacije, blokade i preskoke. Kod nekih zglobova ispituje se i stabilnost, a kod nekih je moguće i palpirati mjesto najveće bolnosti u zglobnoj pukotini [16].

Uzimanjem anamneze i kliničkim pregledom možemo s visokom sigurnošću posumnjati na samu bolest, a završna dijagnostička metoda kojom potvrđujemo dijagnozu je radiogram zahvaćenog zgloba. Dodatne dijagnostičke metode najčešće nisu potrebne.

Najčešće korišteni klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze OA koljena jesu kriteriji Američkog koledža za reumatologiju za dijagnozu i klasifikaciju OA koljena (Tablica 1) [17].

Tablica 1. Klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa (OA) koljena (*Modificirano iz: Jotanović Z. Role of gene polymorphisms of proinflammatory cytokines IL-1 and IL-17 in primary knee and hip osteoarthritis. Doktorski rad; 2013; str. 56*)

Tradicionalni kriteriji
<p>Bol u koljenu i prisutnost osteofita na rendgenogramu koljena uz prisutnost jednog od slijedećih kriterija:</p> <ul style="list-style-type: none"> - dob bolesnika iznad 50. godine života - jutarnja ukočenost koja traje do 30 minuta - krepitacije prilikom izvođenja kretnji u koljenu
Kriteriji prema klasifikacijskom stablu
<p>Bol u koljenu i prisutnost osteofita na rendgenogramu koljena</p> <p>ili</p> <p>Bol u koljenu u bolesnika životne dobi od 40 godina ili više, jutarnja ukočenost koja traje do 30 minuta i krepitacije prilikom izvođenja kretnji u koljenu</p>

Najčešće korišteni klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze OA kuka jesu kriteriji Američkog koledža za reumatologiju za dijagnozu i klasifikaciju OA kuka (Tablica 2) [17].

Tablica 2. Klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa (OA) kuka.

(Modificirano iz: Jotanović Z. Role of gene polymorphisms of proinflammatory cytokines IL-1 and IL-17 in primary knee and hip osteoarthritis. Doktorski rad; 2013; str. 56)

Tradicionalni kriteriji
Bol u kuku uz prisutnost jednog od slijedećih kriterija: <ul style="list-style-type: none">- sedimentacija eritrocita (SE) manja od 20 mm po satu- prisutnost osteofita u području proksimalnog dijela bedrene kosti i acetabuluma na rendgenogramu kuka- suženje zglobne pukotine na rendgenogramu kuka
Kriteriji prema klasifikacijskom stablu
Bol u kuku uz prisutnost osteofita u području proksimalnog dijela bedrene kosti i acetabuluma na rendgenogramu kuka ili Bol u kuku uz suženje zglobne pukotine na rendgenogramu kuka i SE manja od 20 mm po satu

Najčešće korišteni radiološki kriterij za postavljanje dijagnoze OA koljena i kuka je Kellgren-Lawrence ljestvica za radiološku procjenu OA koljena ili OA kuka (Tablica 3) [17].

Tablica 3. Radiološki kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa (OA) koljena i kuka. (Modificirano iz: Jotanović Z. *Role of gene polymorphisms of proinflammatory cytokines IL-1 and IL-17 in primary knee and hip osteoarthritis. Doktorski rad; 2013; str. 57*)

Radiografski stupanj	0	I	II	III	IV
Klasifikacija	Normalan zglob	Nesigurni znaci OA	Početni OA	Umjereni OA	Teški OA
Opis	- ne vide se radiološke karakteristike OA	- minimalni osteofiti - nesigurni znaci suženja zglobne pukotine	- prisutni osteofiti - početno suženje zglobne pukotine	- umjereni suženje zglobne pukotine	- značajno suženje zglobne pukotine - subhondralna skleroza

1.4 Liječenje osteoartritisa

Liječenje osteoartritisa možemo podijeliti na neoperacijsko i operacijsko. Neoperacijsko liječenje dijelimo na farmakološko i nefarmakološko.

1.4.1 Nefarmakološko liječenje

U nefarmakološko liječenje ubrajaju se hidroterapija, redukcija tjelesne težine, kardiovaskularne vježbe, vježbe snage, psihosocijalna podrška te korištenje pomagala prilikom hodanja [18].

- Hidroterapijom bolesnici razgibavaju zahvaćeni zglobu u rasteretnom stanju te na taj način „podmazuju“ zglob sinovijalnom tekućinom i održavaju gibljivost.
- Redukcijom tjelesne težine i korištenjem pomagala postiže se rasterećenje oštećenog zgloba što može uzrokovati smanjenje tegoba i poboljšanje kvalitete života.
- Jačanjem dinamičkih stabilizatora zgloba postiže se veća stabilnost zgloba i bolja propriocepcija, a stabilan zglob često dovodi do redukcije bolova.

1.4.2 Farmakološko liječenje

U farmakološko liječenje ubrajaju se nesteroidni antireumatici, opijati, intraartikularna primjena anestetika s dugodjelujućim kortikosteroidom te intraartikularna primjena hijalouronata [18].

- Nesteroidni antireumatici (NSAR) imaju „periferno“ djelovanje te smanjuju upalu, a često se kombiniraju s opijatima što može izazvati sinergistički učinak u smanjivanju bolova.
- Opijati imaju „centralno“ djelovanje, daju se često u kombinaciji s NSAR, a zbog nepoželjnih nuspojava teži ih se primjenjivati u što kraćim intervalima.
- Intraartikularne injekcije kortikosteroida djeluju protuupalno i dokazano smanjuju razinu proupalnih čimbenika u sinovijalnoj tekućini, međutim djelovanje nema dugoročne učinke [19].
- Intraartikularnom primjenom hijaluronske kiseline nastoji se povećati lubrikacija zgloba te omogućiti bolja artikulacija između zglobnih tijela, no trenutno nema jačih znanstvenih dokaza o djelovanju ove terapije [19].
- Plazma obogaćena trombocitima sadrži veću koncentraciju autolognih čimbenika rasta koji potiču reparaciju tkiva. Također, trenutno nema većih dokaza da ova terapija ima bolji učinak od placeba [12].
- Terapija mezenhimalnim pluripotentnim matičnim stanicama je relativno nova metoda liječenja kojom se idejno pokušava potaknuti regeneracija oštećene hijaline hrskavice. Proces regeneracije za sada je samo zamijećen u *in vitro* uvjetima, dok u *in vivo* uvjetima prevladava njihov imunomodulatorni i parakrini učinak na oštećeno tkivo što je
 - a) inhibicija apoptoze,

b) smanjenje upale supresijom aktivacije proliferacije makrofaga te T- i B-limfocita

c) poboljšanje prirodnih mehanizma regeneracije sekrecijom trofičkih, angiogenih, antifibrotičkih i antikataboličkih čimbenika.

Nema još jasnih znanstvenih dokaza o terapijskom djelovanju navedene terapije.

1.4.3 Operacijsko liječenje

U operacijsko liječenje osteoartritisa spadaju artroskopske toalete, otvorene toalete zgloba, korektivne osteotomije i aloartroplastike.

- Toalete zglobova su zahvati kojima pokušavamo privremeno smanjiti tegobe na način da evakuiramo oštećene i slobodne dijelove hrskavice i kosti iz zgloba te ispiremo zglob. Učinak je najčešće kratkotrajno poboljšanje stanja. Povremeno takav zahvat uopće nema učinka, a rijetko se bolesnici žale da im je „malo gore“ nego što je bilo prije liječenja [21].
- Korektivne osteotomije su zahvati kojima mijenjamo biomehaniku zgloba u svrhu rasterećenja ciljanog dijela zgloba. Ako se takav zahvat izvede pravovremeno te s dobrom indikacijom, rezultati mogu biti izuzetno uspješni i time možemo odgoditi liječenje ugradnjom endoproteze i nekoliko godina, ponekad i izlječiti bolesnika [22].
- Aloartroplastike su operacijske zamjene uništenog zgloba umjetnim zglobovom. Smatraju se jednim od najuspješnijih operacija u kirurgiji; čak je liječenje ugradnjom totalne endoproteze kuka opisano kao operacija stoljeća. Takav način liječenja nije odgovarajući za osobe mlađe životne dobi zbog kraćeg preživljenja endoproteze i veće potrebe za revizijskim zahvatima koji su znatno manje uspješni od primarnih [23].

1.5 Biogeneza mikroRNK

MikroRNK su male molekule koje se sastoje od 22 nukleotida ili manje, a imaju ulogu modificirati izražaj gena nakon prepisivanja DNA. Njihova promjena genskog izražaja

može biti negativna na način da blokiraju prevođenje mRNK ili potiču razgradnju mRNK. Također promjena može biti i pozitivna kada potiču prevođenje mRNK [24].

Primarna sekvenca dio je miRNK koja je podudarna ciljnom dijelu mRNK te samo njihovim vezivanjem može doći do blokiranja prevođenja [25]. Upravo radi primarne sekvence moguće je razlikovati različite grupe miRNK, a trenutno je poznato više od 100 različitih grupa miRNK za koje je još potrebno identificirati njihove ciljne molekule [25].

Prepisivanje miRNK pomoću RNK polimeraze II rezultira proizvodnjom primarne miRNK, monocistranskog ili policistranskog dugog primarnog transkripta duljine od otprilike 200 nukleotida [25]. Ovo je prvi korak u biogenezi miRNK. Kompleks proteina Drosha (RNaza tipa III) i DGCR8 (od eng. DiGeorge Syndrome Critical Region 8 - DGCR8) dalje obrađuje pri-miRNA u staničnoj jezgri radi čega dolazi do stvaranja pre-miRNK, koja ima otprilike 70-100 nukleotida [25]. Protein exportin 5 olakšava transport pre-miRNK u citoplazmu, gdje se pomoću druge RNaze i RNK vezujućim proteinom (od eng. Trans-activation-Responsive RNA-Binding Protein - TRBP) cijepa u miRNK duplex, manju molekulu koja se sastoji od oko 21 nukleotida [25]. Duplex se odmotava pomoću helikaze, a miRNK lanac vodilja se ugrađuje u multiproteinski RNK – inducirani utišani kompleks koji sadržava Argonaut proteine [25]. Poslije toga cijeli se kompleks može kretati, locirati svoj cilj i kontrolirati prepisivanje [25].

1.6 Izražaj miRNK molekula u osteoartritisu

MiRNK molekule imaju značajan utjecaj na biologiju kosti kontrolirajući mnoge signalne puteve u mišićno-koštanom sustavu, uključujući endohondralnu osifikaciju, osteoblastičnu i hondrogenu diferencijaciju, resorpciju i formiranje kosti [26]. Unazad dva desetljeća iste molekule su predmet brojnih znanstvenih istraživanja usmjerenih na otkrivanje signalnih i molekularnih puteva uključenih u etiopatogenezu OA. Do sada je pronađeno više od 46 miRNK povezanih s homeostazom, autofagijom, apoptozom i diferencijacijom hondrocita [27]. Brojne miRNK imaju različite obrasce izražaja u hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom u usporedbi sa zdravom hrskavicom [27, 28]. Također, poznato je da su određene miRNK, kao što su miR-9, miR-27, miR-34a, miR-140, miR-146a, miR-558 i miR-602 uključene u patofiziologiju OA [27, 28]. Značaj

miRNK molekula u etiologiji osteoartritisu također se pokazuje njihovom kontrolom u signalnim putevima molekula, kao što su transformirajući čimbenik rasta beta (od eng. Transforming Growth Factor-beta - TGF- β), koštani morfogenetski protein (od eng. Bone Morphogenic Protein - BMP) i TNF- α , za koje se zna da sudjeluju u procesu upale i razgradnje hrskavice [26]. Učinjena je meta-analiza koja je istraživala izražaj miRNK molekula u različitim tkivima zglobova zahvaćenim osteoartritisom te još jedna meta-analiza koja je istraživala izražaj miR146a u različitim tkivima zglobova zahvaćenim osteoartritisom [28, 29].

Meta-analiza Liu H i suradnika [29] zaključila je da u osoba koje boluju od OA u različitim tkivima postoji poremećen izražaj 36 miRNK, a samo u hrskavici čak 35 vrsta miRNK je deregulirana. Poremećeni izražaj miR-34a-5p, miR-140-5p, miR-146-5p i miR-127-5p u osoba koje boluju od OA zapažen je u gotovim svim studijama te je zaključeno da iste molekule potencijalno mogu služiti kao biomarkeri.

Meta-analiza Liu JN i suradnika [28] zaključila je da je izražaj miR-146a u mononuklearnim stanicama periferne krvi osoba koje boluju od osteoartritisu značajno viši u odnosu na zdrave kontrole. Međutim, studija nije našla značajnu razliku u izražaju iste molekule u plazmi osoba koje boluju od osteoartritisu i zdravih kontrola. Nadalje, izražaj miR-146a molekula u hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom je značajno viši u odnosu na zdravu hrskavicu, dok se ista razlika nije zapazila među hondrocitima istih skupina ispitanika.

1.7 MiRNK i metaloproteinaze

Izvanstanični matriks hrskavice izgrađen je od kolagena tipa II, proteoglikana i glikoproteina. Razgradnja kolagena u hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom uglavnom se pripisuje proteolitičkim enzimima MMP-1 i MMP-13 [15, 30, 31]. MMP-13, uz kolagen, razgrađuje i proteoglikane. Koncentracije metaloproteinaza poput MMP-2, MMP-3 i MMP-9, koje razgrađuju nekolagene strukture matriksa, također su povišene u osteoartritisom zahvaćenoj hrskavici [15, 30, 31].

Agrekanaze su članovi obitelji ekstracelularnih proteaza dezintegrina i metaloproteinaza s motivima trombospondina. Agrekanaze ADAMTS4 i ADAMTS5

imaju važnu ulogu u razgradnji proteoglikana tijekom procesa osteoartritisa [32]. Razgradnja agrekana u ljudskoj hrskavici inhibirana je smanjenjem izražaja ADAMTS4 i ADAMTS5. Različite studije dokazuju da miRNK reguliraju proizvodnju mnogih proteolitičkih enzima hrskavice [8, 26, 33]. (Tablica 4) [34].

U hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom postoji povećana proizvodnja metaloproteinaza, kao što su MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 i ADAMTS4 te je pronađen prekomjerni izražaj gena 5 specifičnog za zaustavljanje rasta (od eng. Growth Arrest Specific 5 - GAS5) koji kontrolira miR-21 [35].

MiR-222 regulira MMP-13 putem histonske deacetilaze 4 te se pokazalo da je izražaj miR-222 značajno smanjen u ljudskoj hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom, dok njezin pojačan izražaj dovodi do potiskivanja apoptoze hondrocita kao i smanjenog izražaja MMP-13 [36].

MiR-24 kontrolira izražaj p161INK4a, biomarkera starenja. Kada postoji manji izražaj ove miRNK, p161INK4a se izražava više, što podiže razine MMP-1 i MMP-13 u hondrocitima [37]. U ljudskoj hrskavici supresija miR-22 rezultira smanjenim upalnim odgovorom, smanjenom kataboličkom aktivnošću MMP-13 i povećanom regeneracijom hrskavice [33]. S obzirom na to da MMP-13 razgrađuje kolagen tipa II, za koji se smatra da je jedan od enzima primarno odgovornih za razgradnju hrskavice, blokiranje miR-22 ima veliki terapijski potencijal u liječenju osteoartritisa [8]. Dodatno, utvrđeno je da je miR-320 regulator MMP-13 u životinjskim modelima, a povećana proizvodnja miR-320 uzrokuje povećan izražaj prethodno spomenutog enzima [33]. Smanjen izražaja miR-146a uzrokuje povećan izražaj MMP-13, IL-1 β i IL-610 u ljudskoj hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom [26].

Tablica 4. MikroRNK i metaloproteinaze

(Preuzeto iz Tudor K, Dembić Z, Prpić T i sur. *Medicina fluminensis* 2023;59;2;128-139.)

Smanjena ekspresija	Metaloproteinaze
miR-146a	↑MMP-13
miR-24	↑MMP-1, ↑MMP-13

miR-22	↓MMP-13
miR-21	↑MMP-2, ↑MMP-3, ↑MMP-9, ↑MMP-13, ↑ADAMTS4,
miR-105	↑ADAMTS7, ↑ADAMTS12
miR-30a	↑ADAMTS5
miR-27b	↑MMP-13
miR-9	↑MMP-13
???	
Povećana ekspresija	
miR-222	↓MMP-13
miR-320	↑MMP-13
miR-181	↑MMP-2, ↑MMP-9
miR-483	↑MMP-3
miR-140	↓MMP-13, ↓ADAMTS-5
miR-381	↑MMP-13
miR-145	↓MMP-3, ↓MMP-13

1.8 Jednonukleotidni polimorfizmi miRNK i osteoartritis

Prisutnost dva ili više različitih alela na istom genskom lokusu s određenom učestalošću u populaciji naziva se genetski polimorfizam. Jednonukleotidni polimorfizmi (od eng. Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) mogu biti locirani u miRNK genskim promotorima (miR-P-SNP), dijelu DNA zaduženog za započinjanje prepisivanja jednolančane RNK [26]. Ovi polimorfizmi imaju sposobnost mijenjanja afiniteta vezanja čimbenika prepisivanja, a genetske varijante određenih miRNK promotora povezane su s raznim bolestima, poput autoimunih bolesti, kardiovaskularnih bolesti i karcinoma [38-42]. Osim toga, polimorfizmi jednog nukleotida na miRNK genu mogu promijeniti sintezu, izražaj, stabilnost i funkciju istih miRNK molekula, što također može izazvati niz bolesti [43-45].

Funkcionalni jednonukleotidni polimorfizam nazvan rs2910164 (G > C) pronađen je na prekursorskoj molekuli gena miR-146a. Ovaj polimorfizam modulira biogenezu miR-146a i povezan je s ankilozantnim spondilitisom, reumatoidnim artritisom,

kardiovaskularnim bolestima i različitim karcinomima [26]. Dokazano je da SNP rs2910164 (G > C) u miR-146a dovodi do smanjenja izražaja pre-miR-146a, a ujedno i smanjenjem izražaja zrele miR-146a što u konačnici dovodi do pojačanog izražaja gena za čimbenik povezan s TNF receptorom 6 (od eng. Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6 - TRAF6) i gena za kinazu 1 povezanu s receptorom za interleukin-1 (od eng. Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 1 - IRAK1), gen čija se pojačana izraženost dovodi u vezu s nastankom osteoartritisisa [46]. Istražena je i povezanost SNP rs2910164 (G > C) u miR-146a genu sa sklonošću za nastanak osteoartritisisa koljena u grčkoj populaciji te je dokazano da osobe s takvim genotipom u hondrocitima imaju smanjen izražaj miR-146a i povećan izražaj MMP-13, IL-1 β i IL-6 [26].

S obzirom da se genetski rizični čimbenici razlikuju između populacija, slično istraživanje provedeno je i na meksičkoj populaciji te je u nosioca rs2910164 –CC genotipa dokazan pozitivan trend povećanog rizika za oboljevanje od OA u žena s 2. i 4. stadijem OA i trend smanjenog rizika u muškaraca s 4. stadijem OA [46]. Nijedna od navedenih studija nije pronašla statistički značajnu razliku u frekvenciji alela niti u distribuciji genotipova između grupe ispitanika s osteoartritisom koljena i ispitanika iz kontrolne skupine [26, 46]. Nedavno objavljena studija je proučavala potencijalnu povezanost SNP rs2910164 (G > C) u miR-146a genu i sklonost oboljevanja od OA kuka [47]. Ista studija koristila je u ispitivanju vrlo mali broj osoba koje boluju od osteoartritisisa kuka (n=61) i 104 kontrola [47]. Studija je zaključila da SNP rs2910164 (G > C) u miR-146a nije povezan sa sklonošću za nastanak osteoartritisisa kuka [47].

1.9 Uloga miRNK molekula u apoptozi hondrocita

Dokazano je da nekoliko molekula miRNK pokreće i potiče apoptozu, ali je i zaustavlja putem različitih ciljnih molekula i procesa (Tablica 5) [34]. Prva miRNK molekula za koju se pokazalo da je uključena u kontrolu apoptoze hondrocita u životinjskom modelu je miRNK-34a [48]. Nakon toga utvrđeno je da miR-34 kontrolira signalni put Sirtuin 1/protein 53 (od eng. Sirtuin 1/protein 53 - SIRT1/p53) koji potiče apoptozu i inhibira proliferaciju ljudskih hondrocita [48]. Povećanje izražaja miR-181 povećava broj hondrocita u procesu apoptoze, povećava aktivnost MMP-2 i MMP-9 te smanjuje

proliferaciju hondrocita [49]. Također, utvrđeno je da miR-146a ima ulogu u patofiziologiji osteoartritisu pojačavanjem proizvodnje čimbenika rasta vaskularnog endotela (od eng. Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) i reguliranjem smrti hondrocita kao odgovor na mehanički stres [50]. MiR-197 djeluje na čimbenika započinjanja eukariotskog prevođenja 4 gama 2 (od eng. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 2 - EIF4G2) te dovodi do poticanja proliferacije hondrocita i smanjenja upale u hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom [10]. Zaključak koji je postignut bio je da je jedna od mogućih meta lijekova za osteoartritis signalni put miR-197/EIF4G2/p53 [10]. Smanjenjem aktivnosti sfingozin kinaze 1 (od eng. Sphingosine Kinase 1 - SPHK1) i blokiranjem signalnog puta fosfoinozimid 3-kinaze/protein kinaze B/Akt (od eng. Phosphoinositide-3-Kinase-Protein Kinase B/Akt - PI3K-PKB/Akt), miR-103 dovodi do degradacije hondrocita i napredovanja osteoartritisu [51]. Dokazano je da osteoartritisom zahvaćena ljudska hrskavica ima manji izražaj miR-142-5p [52]. Pojačan izražaj miR-142-5p koči apoptozu hondrocita, smanjuje upalu i katabolizam hrskavičnog ekstracelularnog matriksa te inaktivira signalni put mitogenom aktivirane proteinske kinaze (od eng. Mitogen-Activated Protein Kinase - MAPK) u hondrocitima hrskavice zahvaćene osteoartritisom [52]. Dokazano je da inhibicija miR-495 u hrskavici miša inhibira apoptozu i povećava proliferaciju hondrocita aktiviranjem signalnog puta nuklearnog faktora kapa-B (od eng. Nuclear Factor Kappa B - NF- κ B) koji je pod kontrolom od kemokin liganda 4 (od eng. C-C Motif Chemokine Ligand 4 - CCL4) [53]. Analiza izražaja miR-93 u mišjoj hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom također je otkrila da povećan izražaj miR-93 koči apoptozu hondrocita i upalni odgovor, što se očituje smanjenjem koncentracije TNF- α , IL-1 β i IL-6 [54]. Toll slični receptor 4 (od eng. Toll-Like Receptor 4 - TLR4) kontrolira NF- κ B signalni put [54]. Utvrđeno je da je ovaj receptor ciljna molekula miR-93 molekule u hondrocitima [54]. Dokazano je da miR-186 suzbija apoptozu mišjih hondrocita u hrskavici oštećenoj OA međudjelovanjem sa sekretornim fosfoproteinom 1 (od eng. Secreted Phosphoprotein 1 - SPP1) u PI3K-AKT signalnom putu [55]. Kao rezultat toga, jedna od ciljnih molekula za mogući lijek u liječenju OA je miR-186 [55]. Povećan izražaj WNT1-inducibilnog signalnog proteinskog puta 1 (od eng. WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 1 - WISP1), koja je ujedno i ciljna molekula miR-128-3p, smanjuje umnažanje hondrocita te započinje apoptozu istih stanica, povećava razgradnju hrskavičnog matriksa, povećava koncentraciju proupalnih citokina te aktivira PI3K/Akt/NF- κ B signalni put [56]. U procesu OA, proliferaciju ljudskih

hondrocita, razgradnju matriksa i proizvodnju proupalnih citokina regulira mir-128-3p putem WISP1 [56]. Homolog fosfataze i tenzina (od eng. Phosphatase And Tensin Homolog - PTEN) je prekomjerno izražen u tkivu zahvaćenom OA i povezan je s početkom i napredovanjem OA reguliranjem homeostaze izvanstaničnog matriksa [57]. PTEN je jedna od mogućih ciljnih molekula miR-107 [57]. Kada raste PTEN izražaj, proliferacija hondrocita se povećava [57]. Prema *in vivo* istraživanju provedenom na životinjskim modelima, povećan izražaj mir-10a-5p ubrzava trošenje hrskavice kod miševa potiskivanjem izražaja HOXA1 (od eng. Homeobox protein Hox-A1 - HOXA1) [58].

Tablica 5. MiRNK i apoptoza

(Preuzeto iz Tudor K, Dembić Z, Prpić T i sur. *Medicina fluminensis* 2023;59;2;128-139.)

Povećana ekspresija	Djelovanje
miR-34	↓ apoptoza, ↑ proliferacija hondrocita
miR-181	↑ apoptoza, ↓ proliferacija hondrocita, ↑ MMP2, ↑ MMP9
miR-146a	↑ apoptoza hondrocita
miR-197	↑ proliferacija hondrocita
miR-103	↑ apoptoza hondrocita
miR-142-5p	↓ apoptoza hondrocita
miR-495	↓ apoptoza hondrocita, ↑ proliferacija hondrocita
miR-93	↓ apoptoza hondrocita
miR-186	↓ apoptoza hondrocita
miR-128-3p	↓ apoptoza hondrocita
miR-107	↑ proliferacija hondrocita
miR-10a-5p	↑ apoptoza hondrocita
miR-21	↓ apoptoza hondrocita
miR-222	↓ apoptoza hondrocita

1.10 MiRNK kao biomarkeri u osteoartritisu

Cirkulirajuće mikroRNK (C-miRNK) molekule su miRNK koje pronalazimo izvanstanično za razliku od miRNK koje funkcioniraju unutar stanice [59]. Dostupne su za izdvajanje i analizu jer se nalaze u raznim tjelesnim tekućinama, uključujući krv, serum, plazmu, suze, urin i slinu [59, 60]. C-miRNK koriste lipoproteinske komplekse, Argonaut (AGO) proteine, egzosome, mikrovezikule i nukleofosmin kako bi ostale stabilne i zaštićene od razgradnje RNKaza [59]. Molekule miRNK/c-miRNK reguliraju više od polovice ljudskog genoma stoga patološki izražaj specifičnih miRNK ili c-miRNA može igrati značajnu ulogu u prepoznavanju ili liječenju niza bolesti, uključujući osteoartritis [60].

Brojne c-miRNA molekule imaju promijenjenu koncentraciju u tjelesnim tekućinama pojedinaca s osteoartritisom u usporedbi sa zdravim kontrolama. U hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom pronalazimo povećanu koncentraciju, miR-16, miR-20, miR-30, miR-126, miR-146, miR-184, miR-186 i miR-223 molekula u odnosu na zdravu hrskavicu i smanjenu koncentraciju miR-140, miR-191, miR-329, miR-342, miR-454, miR-708, miR-934, miR-27a, miR-let-7a, miR-let-7b [62].

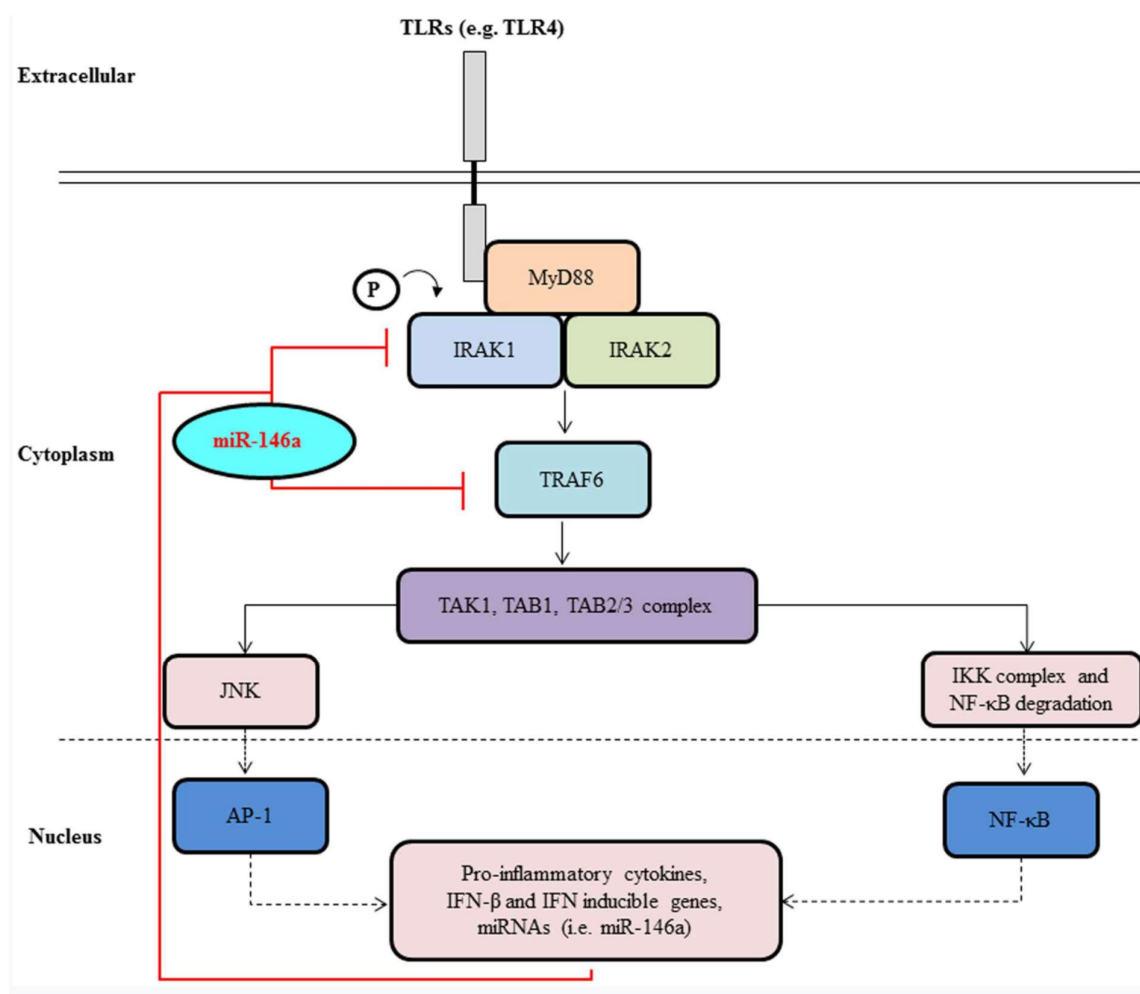
Nadalje, ustanovilo se da koncentracija specifičnih c-miRNA u tjelesnim tekućinama varira prema stadiju osteoartritisa [62]. Izražaj miR-24-3p, miR-186-5p, miR-23a-3p, miR-34a-5p, miR-27b-3p i miR-29c-3p, veća je u kasnim fazama osteoartritisa nego u ranijim stadijima [62].

U osoba koje boluju od osteoartritisa pronalazimo povišenu koncentraciju miR-146 u odnosu na zdrave osobe [26, 50]. Za istu molekulu smatra se da ima veoma bitnu ulogu u procesu propadanja hrskavice i nastanku sinovitisa, a ujedno je jedna od najviše istraživanih molekula s ulogom u etiopatogenezi osteoartritisa [26, 50]. Također jedna od bolje istraženih molekula u etiologiji osteoartritisa je miR-140, za koju je dokazan manji izražaj u serumu i hrskavici kod osoba koje boluju od osteoartritisa nego u zdravih kontrolnih osoba, no zanimljiva je zbog svoje potencijalne uloge kao biomarker osteoartritisa jer regulira neke od enzima koji razgrađuju hrskavicu, uključujući ADAMTS5 i MMP-13 [63].

Sve prethodno navedeno sugerira da bi se miRNK molekule mogle koristiti kao biomarkeri za osteoartritis, odnosno da bi se potencijalno mogle koristiti za prognozu, dijagnozu i liječenje bolesti.

1.11 MiR-146a

Mir-146a je mikroRNK molekula koja je prisutna u stanicama sisavaca uključujući i ljude. Sastoji se od 22 nukleotida te ima važnu ulogu u upalnim procesima i drugim procesima prirođenog imuniteta [64]. Poznato je da postoji poremećaj izražaja iste molekule u brojnim patološkim stanjima poput osteoartritisa ili nekih karcinoma [26, 64]. Signalni putevi aktivirani od strane Toll sličnih (od. eng. Toll-Like – TL) receptora dovode do aktivacije brojnih miRNK molekula [64]. Neovisno o vrsti stanice na kojoj se nalazi TL receptor te neovisno o načinu stimulacije istog receptora, miR-146a je molekula koja se najviše aktivira kod stimulacije navedenog receptora u odnosu na druge miRNK molekule, što sugerira na njenu važnu ulogu u nizvodnim signalnim putevima nakon aktivacije TL receptora [64]. Aktivacija TL receptora dovodi do aktivacije IRAK-1 i TRAF6 proteina koji dalje aktiviraju transkripcijski čimbenik NF- κ B [26, 46, 64]. Isti odlazi u jezgru stanice te se veže na DNK i potiče stvaranje proupalnih citokina poput IL-6, IL-8, IL-1 β i TNF- α [64]. Također NF- κ B potiče i stvaranje miR-146a [64]. RNK polimeraza stvara primarnu miR-146a koja se dalje u jezgri obrađuje od strane enzima Drosha u prekursor miR146a odnosno u pre-miR-146a koja dalje putuje u citoplazmu [64]. U citoplazmi enzim Dicer obrađuje pre-miR-146a u miR-146 koja ulazi u multiproteinski RNK – inducirani utišani kompleks [64]. Navedeni se kompleks slobodno kreće po citoplazmi te se spaja s podudarnom 3 netranslatiranom regijom (3' UTR) ciljne mRNK poput IRAK-1 i TRAF6 te uzrokuje potiskivanje prevođenja istih gena [64]. Ciljne molekule miR-146 su u *in vitro* i *in vivo* uvjetima IRAK-1 i TRAF6 [26, 46, 64]. Djelovanjem na svoje cilje molekule, IRAK-1 i TRAF6, miR-146 suprimira nizvodnu aktivacije NF- κ B, a taj način sprječava stvaranje proupalnih molekula [64].



Slika 1. Mehanizam djelovanja miR-146a nakon aktivacije TLR4

(Preuzeto iz Saba R, Sorensen DL, Booth SA. *MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. Front Immunol.* 2014;5:578.)

1.12 Ciljne molekule miR-146a

Znanstveni radovi dokazali su broje ciljne molekule miR-146a (Tablica 6) [65].

Za patofiziologiju OA najbitnije ciljne molekule miR-146a su IRAK-1 i TRAF6 koje utječu na aktivaciju NF-κB [26, 48, 64]. Iste molekule su zasebno opisane u narednim poglavljima.

Tablica 6. Ciljne molekule miR-146a

(Preuzeto iz Labbaye C, Testa U. *The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. J Hematol Oncol. 2012;5:13.*)

Ciljne molekule	Vrsta stanice	Funkcija
TRAF6, IRAK1	LPS-stimulirani monociti	Aktivacija prirodnog imuniteta
IRAK2	VSV inficirani makrofagi	Aktivacija prirodnog imuniteta
IL-8, RANTES	Alveolarne stanice plućnog epitela	Aktivacija prirodnog imuniteta
CCL8 (MCP-2)	HIV-inficirane mikroglijalne stanice	Aktivacija prirodnog imuniteta
FADD	Aktivirani T limfociti	Sprječavanje apoptoze, aktivacija stečenog imuniteta
EGF-R	Stanice tumora dojke, gušterače i želuca	Proliferacija stanice, sprječavanje apoptoze
ROCK-1	Stanice karcinoma gušterače	Proliferacija stanica, invazija i metastaziranje
NOTCH-1	Glioblastom	Stanična proliferacija, diferencijacija i sprječavanje apoptoze
CXCR4	Stanice leukemije	Proliferacija, diferencijacija i migracija stanice
KLF4	Stanice glatkog mišićja	Proliferacija stanica glatkog mišićja

Legenda: TRAF6 - eng; tumor necrosis factor associated kinase 6, IRAK1 - eng; interleukin 1 receptor-associated kinase, LPS - eng; lipopolysaccharide, IRAK2 - eng; interleukin 2 receptor-associated kinase, IL8 - eng; Interleukin-8, RANTES - eng; Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted, CCL8 (MCP-2) - eng; Chemokine (C-C motif) ligand 8, FADD - eng; Fas-associated death domain protein, EGF-R - eng; epidermal growth factor receptor, ROCK-1 - eng; rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1, NOTCH-1 - eng;

neurogenic locus notch homolog protein 1, CXCR4 - eng; chemokine receptor type 4, KLF4 - eng; Krüppel-like factor 4.

1.12.1 IRAK-1

Kinaza 1 povezana s receptorom interleukina-1 (IRAK-1) je enzim kod ljudi kodiran genom IRAK1) [66]. IRAK-1 igra važnu ulogu u regulaciji izražaja upalnih gena od strane imunoloških stanica, kao što su monociti i makrofagi, koji zauzvrat pomažu imunološkom sustavu u eliminaciji bakterija, virusa i drugih patogena. IRAK-1 dio je obitelji IRAK koja se sastoji od IRAK-1, IRAK-2, IRAK-3 i IRAK-4, a aktiviraju ga upalne molekule koje se oslobađaju signalnim putevima tijekom patogenog napada [67]. IRAK-1 je klasificiran kao enzim kinaza, koji regulira puteve u urođenom i stečenom imunološkom sustavu [68]. U prisutnosti stranih patogena, IRAK-1 inducirani signalni putevi mogu se aktivirati Toll sličnim receptorima (TLR) ili receptorima iz obitelji interleukina-1 (IL-1R) kao odgovor [64]. TLR prepoznaju molekularne uzorke povezane s patogenom izraženim na bakterijama, a IL-1R prepoznaju i vežu proupalne citokine iz obitelji IL-1. TLR i IL-1R posreduju u signalnoj kaskadi koja uključuje vezanje čimbenika mijeloidne diferencijacije 88 (od eng. Myeloid Differentiation primary response 88 - MYD88) na receptor, oligomerizaciju MyD88, aktivaciju IRAK-1, multimerizaciju IRAK-1 i konačno aktivaciju kinaze i daljnju signalizaciju nizvodno [69].

Nakon aktivacija, IRAK-1 se odvaja od svog receptorskog kompleksa. IRAK-1 i TRAF6 zatim se vežu za kinazu 1 koju aktivira transformirajući čimbenik rasta β (od eng. Transforming Growth Factor Beta Activated Kinase 1 - TAK1) tvoreći novi kompleks [67]. Ovaj kompleks zatim se translocira u citoplazmu gdje se povezuje s ubikvitin ligazama kao što su ubikvitin konjugirajući enzim-13 (od eng. Ubiquitin-Conjugating enzym-13 - UBC-13) i ubikvitin konjugirajući enzim E2 varijanta 1A (od eng. Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant 1A - UEV-1A), što dovodi do ubikvitinacije i razgradnje TRAF6 [67]. TAK-1 se zatim aktivira i dolazi do fosforilacije kompleksa inhibitora κ B kinaze (od eng. Inhibitory Kappa B Kinase - IKK). Konačno, NF- κ B se aktivira kako bi regulirao prepisivanje proupalnih gena [67].

1.12.2 TRAF6

Čimbenik 6 povezan s receptorom čimbenika nekroze tumora je protein koji posreduje u širokom nizu međudjelovanja protein-protein te posjeduje aktivnost E3 ubikvitin ligaze [70]. Prvi put identificiran prije gotovo dva desetljeća kao posrednik aktivacije NF κ B posredovane IL-1 receptorom (IL-1R), TRAF6 je od tada identificiran kao jedan od proteina uključenih u nizvodne signalne puteve od više obitelji receptora s imunoregulacijskim funkcijama, uključujući članove superobitelji TNF receptora (od eng. Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily – TNFRSF), obitelji Toll sličnih receptora (TLR), receptora čimbenika rasta tumora- β (od eng. Transforming Growth Factor β Receptor - TGF β R) i receptora T stanica (od eng. T-Cell Receptor - TCR) [70]. Uz NF κ B, TRAF6 također može usmjeravati aktivaciju puteva protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK), fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K) i interferonskog regulatornog čimbenika (od eng. Interferon Regulatory Factor - IRF) [70]. U kontekstu imunološkog sustava, signali posredovani TRAF6 pokazali su se ključnima za razvoj, homeostazu i/ili aktivaciju B stanica, T stanica i mijeloidnih stanica, uključujući makrofage, dendritične stanice i osteoklaste, kao i za organogenezu timusa i sekundarnog limfnog tkiva [70]. U višestrukim staničnim kontekstima, funkcija TRAF6 ključna je ne samo za pravilnu aktivaciju imunološkog sustava, već i za održavanje imunološke tolerancije, a noviji su radovi počeli identificirati mehanizme specifične regulacije TRAF6 od strane miRNK [70].

1.12.3 NF- κ B

Nuklearni čimbenik κ B je obitelj proteinskih kompleksa čimbenika prepisivanja koji kontroliraju prepisivanje DNA, proizvodnju citokina i apoptozu stanica [71]. NF- κ B nalazi se u gotovo svim vrstama životinjskih stanica i uključen je u stanične odgovore na podražaje kao što su stres, citokini, slobodni radikali, teški metali, ultraljubičasto zračenje, oksidirani LDL i bakterijski ili virusni antigeni [72]. NF- κ B igra ključnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora na infekciju. Neadekvatna regulacija NF- κ B povezana je s nastankom određenih karcinoma, upalnim i autoimunim bolestima, septičkim šokom, virusnim infekcijama i poremećenim razvojem imunološkog sustava [71]. NF-

κ B je ključan u regulaciji staničnih odgovora jer pripada u skupinu brzo djelujućih primarnih čimbenika prepisivanja, tj. onih koji su prisutni u stanicama u neaktivnom stanju i ne zahtijevaju novu sintezu proteina da bi se aktivirali [73]. To omogućuje NF- κ B da prvi reagira na štetne podražaje stanice. Poznati aktivatori NF- κ B vrlo su varijabilni i uključuju reaktivne kisikove vrste (ROS), TNF- α , IL-1 β , bakterijske lipopolisaharide, izoproterenol, kokain, endotelin-1 i ionizirajuće zračenje [73]. Mnogi bakterijski produkti i stimulacija širokog spektra receptora na staničnoj površini dovode do aktivacije NF- κ B i prilično brzih promjena u izražaju određenih gena [71]. Različiti patogeni aktiviraju NF- κ B upravo preko TLR receptora, ključnih regulatora urođenog i stečenog imunološkog sustava, koji se nalaze na staničnoj stijenci te služe za prepoznavanje štetnih molekula [74].

1.13 Uloga miR-146a u patofiziologiji osteoartritisa

Poznato je da postoji više mikroRNK čiji je izražaj poremećen u hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom u odnosu na zdravu hrskavicu [27, 28]. Prema većini studija, miR-146a je jedna od mikroRNK molekula čiji je izražaj dominantno poremećen u tkivima zglobova zahvaćenim osteoartritisom u odnosu na druge mikroRNK [28, 29]. Mehanizam kojim poremećena regulacija miR-146a utječe na nastanak osteoartritisa još nije potpuno jasan. Smatra se da je osnovna funkcija miR-146a djelovanje negativnom povratnom spregom na IRAK-1 i TRAF6 koji preko NF- κ B proteinskog kompleksa povećavaju izražaj proupalnih citokina (IL-6, IL-8, IL-1 β , i TNF- α) te na taj način pridonose degradaciji hrskavičnog matriksa [26, 46]. Osim ovog najprihvaćenijeg modela utjecaja miR-146a na nastanak osteoartritisa, postoji i neki drugi, od kojih se jedan tiče utjecaja miR-146a na TGF- β signalni put preko Smad 4 proteina (od eng. Mothers against Decapentaplegic Homolog 4 - SMAD4) [75]. TGF- β je signalni put koji ima ulogu u brojnim staničnim procesima poput stanične diferencijacije, rasta, migracije, ali i apoptoze [75]. Aktivacijom istog signalnog puta, nizvodno dolazi do aktivacije SMAD4 proteinskog kompleksa koji odlazi u jezgru te započinje prepisivanje određenih gena [75]. Provedena je studija koja je istraživala utjecaj mehaničke ozljede na nastanak OA u sklopu poremećenog izražaja miR-146a, VEGF i SMAD4 proteina [75].

Rezultati istraživanja su pokazali da je mehanička ozljeda utjecala na vitalnost hondrocita i započela ranu apoptozu hondrocita [75]. U hondrocitima izloženim mehaničkoj ozljedi došlo je do pojačanog izražaja miR-146a, pojačane apoptoze hondrocita, pojačanog izražaja VEGF i smanjenog izražaja SMAD4 [75]. S druge strane, supresija miR-146a izazvala je smanjenje apoptoze hondrocita, pojačan izražaj SMAD4 i smanjen izražaj VEGF [75]. SMAD4 je identificiran kao izravna meta miR-146a tako što sadrži veznu sekvencu za miR-146a u 3'-netranslatiranoj regiji (3'-UTR) svoje mRNK. Regulacija VEGF od strane miR-146a je neizravna, preko SMAD4, čiji smanjen izražaj dovodi do povećanog izražaja VEGF, što dovodi do progresije OA [75]. Rezultati studije su pokazali da je miR-146a prekomjerno izražen u hondrocitima u kojima je eksperimentalno izazvana mehanička ozljeda, što je bilo popraćeno smanjenim izražajem SMAD4 i povećanim izražajem VEGF *in vitro* [75]. Rezultati studije sugeriraju da je miR-146a uključena u apoptozu ljudskih hondrocita kao odgovor na mehaničku ozljedu i da može doprinijeti mehaničkoj ozljedi hondrocita, kao i patogenezi OA povećanjem razine VEGF te djelovanjem na TGF- β signalni put kroz ciljanu inhibiciju SMAD4 u hrskavici [75].

1.14 MiR-146a i karcinomi

Mnoge mikroRNK, uključujući miR-146a, sudjeluju u složenim molekularnim mehanizmima uključenim u kontrolu rasta, diferencijaciju i preživljavanje stanica, odnosno u procesima koji su poremećeni prilikom razvoja različitih karcinoma [65]. Jedan od prvih karcinoma u kojemu je utvrđen poremećen izražaj miR-146a je papilarni karcinom tireoidne žlijezde [76]. Utvrđeno je da izražaj miR-146a korelira s incidencijom i prognozom papilarnog karcinoma štitnjače te razina izražaja miR-146a utječe na staničnu proliferaciju i migraciju kao i na regulaciju izražaja proteina IRAK-1 u stanicama zahvaćenim karcinomom [76]. Nadalje, dokazano je da određeni jednonukleotidni polimorfizmi miR-146a doprinose razvoju istog karcinoma [76]. Znanstvene studije su dokazale manji izražaj miR-146-a u stanicama karcinoma gušterače u usporedbi sa zdravim kontrolama [77]. Povećanje izražaja miR-146a u stanicama gušterače zahvaćene karcinomom dovodi do inhibicije izražaja EGFR i NF- κ B te smanjenog metastatskog potencijala istih stanica [77]. U stanicama karcinoma

dojke prevladava poremećena aktivnost NF- κ B što dovodi do agresivnog ponašanja ovog tumora, a induciran pojačan izražaj miR-146a u takvih stanica smanjuje invazivni potencijal tumora [78].

Izražaj miR-146a u tkivu prostate zahvaćene karcinomom je značajno smanjen u odnosu na zdravo tkivo prostate [79]. Povećanje izražaja miR-146a u androgen-neovisnoj staničnoj liniji karcinoma prostate rezultira značajnim smanjenjem stanične proliferacije, invazije i metastaziranja u koštano srž. Isti učinak najvjerojatnije je posredovan djelovanjem na protein serin/treonin kinazu 1 [79].

Poremećana regulacija miR-146a doprinosi razvoju glioma, djelovanjem na homologni protein 1 neurogenog lokusa (od eng. Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1 - NOTCH1), signalni put koji ima važnu ulogu u mehanizmu razvoja moždanih stanica [80]. Određeni jednonukleotidni polimorfizmi prekursorske molekule miR-146a pridonose razvoju glioma te imaju prognostičku ulogu [80]. Znanstveni radovi su potvrdili ulogu miR-146a u supresiji tumora mijelo-limfoidnih stanica [81, 82]. Smanjen izražaj miR-146a stvara sklonost za nastanak mijelo-limfoidnih karcinoma [81, 82]. Potencijalna deregulacija miR-146a je istražena u brojnih kroničnih limfocitnih leukemija te je utvrđen poremećen izražaj brojnih mikroRNK uljučujući i miR-146a. Također, u akutnoj mijeloičnoj leukemiji utvrđen je smanjen izražaja miR-146a u odnosu na zdrave kontrole [83]. U nekim mijelodisplastičnim sindromima određeni genetski mehanizam izravno utječu na smanjen izražaj miR-146a [84]. Kod mijelodisplastičnog 5q-sindroma, delecija kromosoma 5q utječe na gubitak dvije miRNK, miR-145 i miR-146a [84]. Funkcionalni pokusi su potvrdili da zbog navedenog dolazi do trombocitopenije i neutropenije, što je glavno obilježje navedenog sindroma [84]. Izražaj miR-146a istražen je i u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji i to promjene u njezinom izražaju koje se javljaju nakon liječenja imatinibom [85]. Utvrđeno je da su razine miR-146a u stanicama zahvaćenim kroničnom mijeloičnom leukemijom značajno smanjene u usporedbi sa stanicama kontrola [85]. Zanimljivo je da se nakon terapije s imatinibom razine miR-146a, kao i razine miR-150, progresivno povećavaju do uspostavljanja normalne razine izražaja nakon 14 dana terapije [85]. Niz studija pokazao je da postoji poremećen izražaj miR-146a u određenim tipovima limfoma, naročito među limfomima prirodno ubilačkih stanica [86]. Studija provedena na ovom limfomu je dovela do zaključka da miR-146a smanjuje regulaciju NF- κ B aktivnosti kroz

regulaciju TRAF6 i funkcioniira kao tumor supresor koji ima snažne prognostičke implikacije kod takvih limfoma [86].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi potencijalnu povezanost pojedinog miR-146a rs2910164a (G>C) jednonukleotidnog polimorfizama s mogućom predispozicijom za nastanak OA kuka i koljena.

Specifični ciljevi su:

- utvrditi postoji li statistički značajna razlika učestalosti pojedinih miR-146a SNP rs2910164 (G>C) genotipova između zdrave populacije i osoba koje boluju od OA koljena odnosno kuka,
- ukoliko se pronađe statistički značajna razlika između ispitanika i kontrola, utvrditi preko statističke obrade je li razlika pokazatelj moguće povezanosti poput zaštite ili sklonosti,
- proširiti saznanja prethodnih studija na način da utvrdimo potencijalnu povezanost pojedinih miR-146a, SNP rs2910164 (G>C) genotipova s pojedinim IL6 SNP rs1800795 (C>G), TLR10 SNP rs11096957 (C>T) TNF- α , NP rs1800629 (C>T) genotipovima radi moguće povezanosti kombinacija određenih genotipova s predispozicijom na nastanak OA koljena ili kuka,
- u slučaju da pronađemo statistički značajnu razliku u učestalosti određenih kombinacija genotipova između kontrola i bolesnika utvrditi preko testa omjera razlike dovodi li kombinacija određenih genotipova do veće predispozicije za nastanak OA kuka odnosno koljena u odnosu na predispoziciju koju uzrokuju izolirani genetski rizični čimbenici [IL6 SNP rs1800795 (C>G), TLR10 SNP rs11096957 (C>T) i TNF- α SNP rs1800629 (C>T)].

3. ISPITANICI I METODE

Bolesnici uključeni u studiju imali su uznapredovali stadij primarnog OA (POA) kuka ili primarnog OA koljena te indikaciju za operaciju zamjene zgloba, tj. totalnu aloartroplastiku kuka, parcijalnu aloartroplastiku koljena ili totalnu aloartroplastiku koljena. Uzorkovanje krvi bolesnika provedeno je u dva navrata. Prvo uzorkovanje od 500 bolesnika je provedeno u periodu 17. 1. - 28. 11. 2008. g. u Klinici za ortopediju i traumatologiju Lovran, a drugo od 200 bolesnika provedeno je u periodu 2. 5. 2022. – 9. 11. 2022. godine u istoj ustanovi. Dijagnoza POA koljena i kuka utvrđena je klinički i radiološki. Klinički kriteriji uključivali su kriterije Američkog koledža za reumatologiju za dijagnozu i klasifikaciju OA koljena i kuka te Western Ontario and McMaster Universities' Osteoarthritis (WOMAC) indeks. Radiološki kriterij za postavljanje dijagnoze OA koljena i kuka bila je Kellgren-Lawrence ljestvica.

Studija je obuhvatila 609 bolesnika, od čega 312 bolesnika s POA kuka. 196 bolesnika s POA kuka bile su žene (63%), a 116 bolesnika muškarci (37%). Prosječna dob bolesnika s POA kuka bila je 68,12 godina, standardna devijacija (SD) = 8,73, raspon: 31-87 godina. Prosječna dob bolesnica s POA kuka bila je 69,36 godina, raspon: 31-87 godina, a srednja dob muškaraca bila je 65,51 godina, raspon: 38-83 godine.

Preostalih 297 ispitanika uključenih u ovu studiju su bolesnici s POA koljena, od čega je 204 žena i 93 muškarca. Prosječna dob bolesnika s POA koljena bila je 69,97 godina, SD = 7,19, raspon: 48-86 godina. Prosječna dob bolesnica s POA koljena bila je 69,79 godina, raspon: 48-86 godina. Prosječna dob muškaraca s POA koljena bila je 69,78 godina, raspon: 53-85 godina.

Kontrolnu skupinu činilo je 656 zdravih osoba od kojih su većina bili dobrovoljni darivatelji krvi, a ostatak medicinsko osoblje Kliničkog Bolničkog Centra (KBC) Rijeka. Žene su činile 157 (24%) zdravih kontrola, dok su 499 (76%) zdravih kontrola bili muškarci (srednja dob = 41,65 godina, SD = 11,31, raspon: 19-91 godina). Kontrolna skupina ispitanika bila je uključena u ispitivanje nakon što su ispunili posebno pripremljene upitnike kojima se isključilo prisustvo zglobno-koštanih oboljenja (odsustvo kronične boli, otekline, ukočenosti i slabog opseg pokreta). Radiološka analiza (RTG) koljena i kukova u kontrolnoj skupini nije učinjena zbog etičkih i financijskih ograničenja. Nakon kliničke evaluacije i pisanog informiranog pristanka za

davanje krvi u svrhu znanstvenog istraživanja, uzorci krvi kontrolne skupine uzeti su i čuvani u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu, KBC Rijeka, Hrvatska.

Istraživanje su odobrili Etičko povjerenstvo Klinike za ortopediju i traumatologiju Lovran, Hrvatska; Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska i Etičko povjerenstvo KBC Rijeka, Hrvatska.

3.1 Klinički i radiološki kriteriji za postavljanje dijagnoze osteoartritisa koljena i kuka

Ova studija koristila je sljedeće kliničke kriterije za dijagnosticiranje OA koljena i kuka:

- smjernice Američkog koledža za reumatologiju za dijagnosticiranje i klasifikaciju osteoartritisa koljena i kuka [17],
- indeks osteoartritisa (WOMAC) koji su razvili Sveučilišta Western Ontario i McMaster, a koristi se za kvantificiranje boli, funkcionalne aktivnosti i ukočenosti zglobova kod osoba s OA koljena ili kuka [17],
- Kellgren-Lawrenceova ljestvica za radiografsku procjenu uznapredovalosti osteoartritisa koljena ili kuka [17].

3.2 Kriteriji uključivanja i isključivanja u istraživanje

3.2.1 Kriteriji uključivanja u istraživanje

Klinički i radiološki utvrđena dijagnoza primarnog OA kuka ili koljena prema navedenim smjernicama:

- indikacije za ugradnju totane endoproteze (TEP) koljena (za bolesnike s uznapredovalim oblikom OA koljena) sukladne smjernicama konsenzusa Nacionalnog instituta za zdravlje (od eng. *National Institutes of Health - NIH*) o indikacijama za ugradnju TEP koljena [87],
- indikacije za ugradnju TEP kuka koje smo koristili u našem istraživanju bile su sukladne smjernicama konsenzusa Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH) o

indikacijama za ugradnju TEP kuka, a koje uključuju bol u zglobu kuka te funkcionalna ograničenja [87],

- potpisan informirani pristanak da se, uslijed dijagnostičkih ili terapijskih postupaka, uzeta periferna venska krv može koristiti u znanstvene svrhe, tj. u svrhu ovog istraživanja.

3.2.2 Kriteriji isključivanja iz istraživanja

Kriteriji isključivanja iz istraživanja bili su slijedeći:

- početni ili uznapredovali oblik primarnog OA koljena ili OA kuka kod kojeg nije indicirano liječenje ugradnjom endoproteze,
- odbijanje potpisivanja informiranog pristanka o sudjelovanju u ovom istraživanju,
- reumatoidni artritis (RA) zgloba koljena ili kuka,
- svi sekundarni oblici OA koljena ili OA kuka.

3.3 Metode

Skupljanje uzoraka periferne venske krvi ispitanika

Od svakog bolesnika s uznapredovalim oblikom primarnog OA koljena ili kuka uključenog u ovo istraživanje, a nakon potpisivanja informiranog pristanka, venepunkcijom je uzeto 10 ml periferne venske krvi tijekom izvođenja indiciranih operacijskih zahvata. Uzorci periferne venske krvi pohranjeni su u 2 epruvete s EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) u volumenu od 5 ml periferne venske krvi u svakoj epruveti. Nakon uzimanja uzoraka krvi od svakog bolesnika, epruvete su označene šifriranim brojem prethodno određenim za svakog bolesnika koji je uključen u ovo istraživanje (šifarnik i šifre pod kojima se vodi svaki bolesnik uključen u istraživanje poznati su samo istraživačima uključenim u ovo istraživanje) i potom pohranjene u ledenicu na temperaturi do - 86°C u Klinici za ortopediju i traumatologiju Lovran. Izolacija genomske DNK uzoraka iz 2008. god. učinjena je pri Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci metodom izoliranja (od eng. *salting out*). Izolacija genomske DNK uzoraka iz 2022 godine učinjena je pri Zavodu

za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu isto metodom izoliranja. U suradnji s Imunogenetskim odjelom (od 2012.g.: Molekularno-genetski odjel) Zavoda za oralnu biologiju Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Oslu analizirani su točkasti polimorfizmi gena svih uzoraka.

3.3.1 Izolacija genomske DNK iz periferne venske krvi za lančanu reakciju polimeraze

Uzorci periferne venske krvi bolesnika s OA kuka ili koljena uzeti su tijekom ugradnje PEP ili TEP koljena, odnosno TEP kuka. Izolirana je genomska DNK. Genomska DNK zdravih davatelja krvi izolirana je metodom izoliranja pomoću komercijalno dostupnog kita (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

3.3.2 Genetska analiza izolirane genomske DNK i lančana reakcija polimeraze

Za lančanu reakciju polimerazom (od eng. Polymerase Chain Reaction - PCR), genomska DNK izolirana je iz periferne venske krvi bolesnika i kontrola pomoću reagensa DNKzol® BD (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornija, SAD), kao što je prethodno spomenuto. Svi uzorci DNK podvrgnuti su PCR metodom TaqMan prema uputama proizvođača (Applied Biosystems, Agilent Technologies). PCR reakcije imale su konačni volumen od 5 mikrolitara (μl) po jednom uzorku, 50 ciklusa amplifikacije uzorka i sastojale su se od (i) 2,5 μl 2x MasterMix (Agilent tehnologije; koji sadrži pufer za Taq DNK polimerazu i enzim Taq DNK polimerazu koji treba inkubaciju na 95°C tijekom 10 minuta za aktivaciju), (ii) 2 μl otopine DNK (5-50 ng DNK), (iii) 0,5 μl 10X Taqman SNP test genotipizacije za rs2910164 (G > C) (Applied Biosystems; koji sadrži prednju i obrnutu specifičnu začetnicu i sondu za svaki alel SNP-a). Oligonukleotidna sonda je označena gasiteljem na 3' kraju i fluorescentnom reporterskom bojom poput FAM ili HEX na 5' kraju. Svaki ciklus se sastoji od početne inkubacije na 95°C u trajanju od 10 minuta, nakon čega slijedi 15 sekundi na 95°C i 1 minuta na 60°C. Genotipizacija je provedena kvantitativnom Taqman PCR metodom u stvarnom vremenu za alel-specifičnu detekciju korištenjem komercijalno dostupnih kompleta za umnožavanje (Life technology, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Sustav za detekciju

osjetljiv na svjetlost uređaja Mx3005P PCR (Agilent, Stratagene, La Jolla, CA, SAD)
korišten je za procjenu fluorescencije tijekom 40-50 ciklusa PCR-a.

4. REZULTATI

U studiji je istražena učestalost miR-146a (rs2910164) točkastog polimorfizma u bolesnika s osteoartritisom koljena, kuka i kontrolne skupine, nakon čega je utvrđeno postoji li statistički značajna razlika u učestalosti istih genotipova i alela između navedenih skupina ispitanika.

Tablica 7 prikazuje učestalost genotipova i alela za miR-146a SNP rs2910164 (G>C) u osoba koje boluju od OA koljena i kontrolne skupine te statističku analizu rezultata [88].

Statističkom obradom nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti navedenih genotipova i alela između dvije navedene skupine.

Tablica 8 prikazuje učestalost genotipova i alela za miR-146a SNP rs2910164 (G>C) u osoba koje boluju od OA kuka i kontrolne skupine te statističku analizu rezultata [88].

Statističkom obradom nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti navedenih genotipova i alela između dvije navedene skupine.

Prije ove studije provedene su dvije studije na istom genetskom materijalu koji smo i mi koristili te smo iz istih studija dobili podatke za IL6 (rs1800795, C>G), TLR10 (rs11096957, C>T) i TNF- α (rs1800629, C>T) genotipove za većinu naših ispitanika [88,89]. S obzirom na to, analizirali smo potencijalnu povezanost pojedinih miR-146a SNP rs2910164 (G>C) genotipova s pojedinim IL6 SNP rs1800795 (C>G), TLR10 SNP rs11096957 (C>T) i TNF- α SNP rs1800629 (C>T) genotipovima radi moguće povezanosti kombinacija određenih genotipova sa sklonošću za nastanak OA koljena ili kuka [88].

Potencijalnu povezanost navedenih genotipova pokušali smo pronaći na način da smo osobe oboljele od OA koljena, OA kuka i kontrolnu skupinu podjelili u 18 skupina prema kombinaciji genotipova

1. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i IL6 (rs1800795, C>G) CC genotip
2. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i IL6 (rs1800795, C>G) GC genotip
3. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i IL6 (rs1800795, C>G) GG genotip
4. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i IL6 (rs1800795, C>G) CC genotip
5. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i IL6 (rs1800795, C>G) GC genotip

6. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i IL6 (rs1800795, C>G) GG genotip
7. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i TLR10 (rs11096957, C>T) CC genotip
8. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i TLR10 (rs11096957, C>T) CT genotip
9. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i TLR10 (rs11096957, C>T) TT genotip
10. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i TLR10 (rs11096957, C>T) CC genotip
11. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i TLR10 (rs11096957, C>T) CT genotip
12. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i TLR10 (rs11096957, C>T) TT genotip
13. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i TNFA (rs1800629, C>T) CC genotip
14. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i TNFA (rs1800629, C>T) CT genotip
15. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i TNFA (rs1800629, C>T) TT genotip
16. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i TNFA (rs1800629, C>T) CC genotip
17. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i TNFA (rs1800629, C>T) CT genotip
18. miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GC i TNFA (rs1800629, C>T) TT genotip

Potom smo usporedili učestalost pojedinih kombinacija genotipova skupine ispitanika s OA koljena i zdravih kontrola te skupine s OA kuka i zdravih kontrola.

Statistički značajnu razliku našli smo između grupe s OA kuka i zdravih osoba za 3. i 15. skupinu kombinacije genotipova (Tablica 9 i 10).

Prethodna studija koristila je istih 255 bolesnika s osteoartritisom kuka i istih 591 kontrola kao i naša studija te su pronašli statistički značajnu povezanost ($p=0,006$) IL 6 SNP rs1800795 (C>G) GG genotipa sa sklonošću za obolijevanje od osteoartritisa kuka s omjerom razlike (OR) =1,53 [89].

Ova studija je pokazala da kombinacija miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG genotipa s IL6 SNP rs1800795 (C>G) GG genotipom kod istog pojedinca dovodi do veće sklonosti za obolijevanje od osteoartritisa kuka (OR=2.37) u odnosu kad bolesnik ima samo IL6 SNP rs1800795 (C>G) GG genotipa bez miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG genotipa (OR = 1,53) [89].

Studija koja je istraživala moguću povezanost genotipova TNF- α SNP rs1800629 (C>T) i obolijevanja od OA kuka s istih 225 bolesnika s osteoartritisom kuka i istih 554 kontrolne skupine kao i naša pronašla je statistički značajnu ($p=0,02$) povezanost

genotipa TNF- α SNP rs1800629 (C>T) TT sa sklonošću za nastanak primarnog osteoartritis kuka s OR 2,56 [90].

Ova studija je pokazala da kombinacija miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG genotipa s TNF- α SNP rs1800629 (C>T) TT genotipom kod istog pojedinca dovodi do veće sklonosti za obolijevanje od osteoartritis kuka (OR=3.03) u odnosu kad bolesnik ima samo TNF- α SNP rs1800629 (C>T) TT genotip bez miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG genotipa (OR = 2.56) (Tablica 10) [90].

Statističkom obradom nije utvrđena statistički značajna razlika učestalosti niti jedne kombinacije genotipova miR-146a s TLR 10 u osoba oboljelih od OA kuka ili koljena i kontrolne skupine (Tablica 11) [88].

Tablica 7. Analiza povezanosti jednonukleotidnih polimorfizama miR-146a rs2910164 G>C s primarnim osteoartritisom koljena.

(Preuzeto iz Tudor K, Baranasic J, Knezevic J i sur. Indirect influence of microRNA-146a on the association of IL-6 and TNF- α genetic polymorphisms with the increased risk of hip osteoarthritis. J Orthop Res 2024;42(7):1482-9.)

Učestalost alela								Učestalost genotipova							
MiR-146a	rs2910164 SNP G>C	KOA bolesnici N=594	Kontrole N=1312	p	OR	95%CI	Sklonost	MiR-146	SNP G>C	KOA bolesnici N=297	Kontrole N=656	p	OR	95%CI	Sklonost
1.	G	0,766 (455)	0.753 (988)	0.542	1.073	0.855-1.348	-	1/1	GG	0.569 (169)	0.559 (367)	0.783	1.040	0.788-1.371	-
2.	C	0,234 (139)	0.247 (324)	0.542	0.932	0.742-1.170	-		GC	0.393 (117)	0.387 (254)	0.843	1.029	0.777-1.362	-
								2/2	CC	0.037 (11)	0.053 (35)	0.276	0.682	0.342-1.363	-

Legenda: CI – eng. Confidence Interval, KOA – eng. Knee osteoarthritis, OR – eng. Odds ratio, SNP – eng. Single nucleotide polymorphism

Tablica 8. Analiza povezanosti jednonukleotidnih polimorfizama miR-146a rs2910164 G>C s primarnim osteoartritisom kuka.

(Preuzeto iz Tudor K, Baranasic J, Knezevic J i sur. Indirect influence of microRNA-146a on the association of IL-6 and TNF- α genetic polymorphisms with the increased risk of hip osteoarthritis. J Orthop Res 2024;42(7):1482-9.)

Učestalost alela								Učestalost genotipova							
MiR-146a	rs2910164 SNP G>C	HOA bolesnici N=624	Kontrole N=1312	p	OR	95%CI	Sklonost	MiR-146a	SNP G>C	HOA bolesnici N=312	Kontrole N=656	p	OR	95%CI	Sklonost
1.	G	0.766 (478)	0.753 (988)	0,534	1.074	0,858-1,343	-	1/1	GG	0.583 (182)	0.559 (367)	0.483	1.102	0.839-1.448	-
2.	C	0.234 (146)	0.247 (324)	0.534	0,931	0,745-1,165	-	½	GC	0.365 (114)	0.387 (254)	0.514	0.911	0.689-1.204	-
								2/2	CC	0.053 (16)	0.053 (35)	0.893	0.959	0.522-1.761	

Legenda: CI – eng. Confidence interval, HOA – eng. Hip osteoarthritis, OR – eng. Odds ratio, SNP – eng. Single nucleotide polymorphism

Tablica 9. Analiza povezanosti miR-146a GG genotipa i jednonukleotidnog polimorfizma IL6 rs1800795 C>G s primarnim osteoartritisom kuka.

(Preuzeto iz Tudor K, Baranasic J, Knezevic J i sur. Indirect influence of microRNA-146a on the association of IL-6 and TNF- α genetic polymorphisms with the increased risk of hip osteoarthritis. J Orthop Res 2024;42(7):1482-9.)

Bolesnici i kontrole s mir-146a GG genotipom															
Učestalost alela								Učestalost genotipa							
IL6	rs1800795 SNP C>G	HOA bolesnici N=252	Kontrole N=608	p	OR	95%CI	Sklonost	IL6	rs1800795 SNP C>G	HOA bolesnici N=126	Kontrole N=304	p	OR	95%CI	Sklonost
1.	C	173	343	0.001	1.629	1.240-2.308	Sklonost	1/1	CC	64	92	0,000056	2.379	1.553-3.644	Sklonost
2.	G	79	265	0.001	0.591	0.433-0.806	Zaštita	1/2	CG	45	159	0.002	0.507	0.330-0.778	Zaštita
								2/2	GG	17	53				-

Legenda: CI – eng. Confidence interval, HOA – eng. Hip osteoarthritis, OR – eng. Odds ratio, SNP – eng. Single nucleotide polymorphism

Tablica 10. Analiza povezanosti miR-146a GG genotipa i jednonukelotidnog polimorfizma TNF- α rs 1800629 C>T s primarnim osteoartritisom kuka.

(Preuzeto iz Tudor K, Baranasic J, Knezevic J i sur. Indirect influence of microRNA-146a on the association of IL-6 and TNF- α genetic polymorphisms with the increased risk of hip osteoarthritis. J Orthop Res 2024;42(7):1482-9.)

Bolesnici i kontrole s mir-146a GG genotipom																
Učestalost alela								Učestalost genotipova								
TNF- α	rs 1800629 C>T	HOA bolesnici N=124	Kontrole N=278	p	OR	95%CI	Sklonost	TNF- α	rs 1800629 C>T	HOA bolesnici N=124	Kontrole N=278	p	OR	95% CI	Sklonost	
1.	C	206	491	0.043	0.65	0.43-0.99	Zaštita	1/1	CC	91	220	0.203	0.72	0.444 - 1.189	-	
2.	T	42	65	0.043	1.54	1.01-2.34	Sklonost	1/2	CT	24	51	0.89	1.06	0.623 - 1.823	-	
								2/2	TT	9	7	0.025	3.03	1.1 - 8.33	Sklonost	

Legenda: CI – eng. Confidence interval, HOA – eng. Hip osteoarthritis, OR – eng. Odds ratio, SNP – eng. Single nucleotide polymorphism

Tablica 11. Analiza povezanosti miR-146a GG genotipa i jednonukelotidnog polimorfizma TLR10 rs11096957 SNP A>C s primarnim osteoartritisom kuka.

(Preuzeto iz Tudor K, Baranasic J, Knezevic J i sur. Indirect influence of microRNA-146a on the association of IL-6 and TNF- α genetic polymorphisms with the increased risk of hip osteoarthritis. J Orthop Res 2024;42(7):1482-9.)

Učestalost alela								Učestalost genotipova								
TLR10	rs11096957 SNP A>C	HOA bolesnici N=240	Kontrole N=606	p	OR	95%CI	Sklonost	TLR10 A>C	SNP	HOA Bolesnici N=120	kontrole N=303	p	OR	95%CI	Sklonost	
1.	A	0.566 (136)	0.523 (317)	0.252	1.192	0.882-1.611	-	1/1	AA	0.333 (40)	0.247 (75)	0.074	1.520	0.959-2.409	Pozitivni trend	
2.	C	0.433 (104)	0.476 (289)	0.252	0.839	0.621-1.133	-	½	AC	0.466 (56)	0.551 (167)	0.117	0.713	0.466-1.089	-	
								2/2	CC	0.2 (24)	0.201 (61)	0.976	0.992	0.585-1.682	-	

Legenda: HOA – eng. Hip osteoarthritis, OR – eng. Odds ratio, CI – eng. Confidence interval, SNP – eng. Single nucleotide polymorphism

5. RASPRAVA

Uloge različitih polimorfizama mikroRNK gena u patofiziologiji osteoartritisa još nisu razjašnjene. Brojne miRNK molekule imaju ulogu u različitim imunološkim signalnim putevima. Neke od istih molekula upletene su u procese degradacije hrskavičnog matriksa, dok neke miRNK molekule imaju zaštitno djelovanje na hrskavicu. Istraživanja su pokazala da postoji poremećen izražaj miR-146a u tkivima zahvaćenim osteoartritisom [28, 29]. Nadalje, izražaj brojnih proupalnih citokina kontroliran je od strane miR-146a, što ukazuje na njenu potencijalnu ulogu u kroničnoj upali i degenerativnim procesima hrskavice zahvaćene osteoartritisom [26, 43, 64]. MiR-146a je upletena u kontrolu apoptoze u ljudskih hondrocita induciranu od strane IL-1 β kroz NF- κ B signalni put [28]. Smatra se da miR-146a svoj osnovni učinak u procesu osteoartritisa ostvaruje postranskripcijskom inhibicijom izražaja IRAK-1 i TRAF6, gena koji potiču upalu i degradaciju hrskavice [26, 43, 64].

Dokazano je da točkasti polimorfizmi miRNK gena utječu na izražaj ciljnih gena miRNK. Na taj način sudjeluju u etiopatogenezi brojnih bolesti. Do sada nije pronađena izravna povezanosti jednonukleotidnog polimorfizama rs2910164 (G > C) miR-146a gena s obolijevanjem od OA [26,43,46].

Naša studija analizirala je učestalost pojedinih miR-146a SNP rs2910164 (G>C) jednonukleotidnih polimorfizama u bolesnika koji boluju od OA i zdravih kontrola, a u svrhu utvrđivanja potencijalne povezanosti istog genotipa s predispozicijom za obolijevanje od OA koljena ili kuka [88]. Nismo pronašli nikakvu izravnu povezanost s bolešću. Međutim, prilikom analize kombinacija određenih genotipova utvrdili smo povezanost dvije kombinacije genotipova s povećanom sklonošću za obolijevanje od OA kuka [88].

Naša analiza pokazala je da kombinacija miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG genotipa s IL6 SNP rs1800795 (C>G) GG genotipom kod istog pojedinca dovodi do veće sklonosti za obolijevanje od osteoartritisa kuka (OR=2.37) u odnosu kad je osoba nosilac samo IL6 SNP rs1800795 (C>G) GG genotipa bez miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG genotipa (OR = 1,53) [88].

Također naša analiza pokazala je da kombinacija miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG genotipa s TNF- α SNP rs1800629 (C>T) TT genotipom kod istog pojedinca dovodi

do veće sklonosti za obolijevanje od OA kuka (OR=3.03) u odnosu kad bolesnik ima samo TNF- α SNP rs1800629 (C>T) TT genotip bez miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG genotipa (OR = 2.56) [88]. Zaključno, možemo reći da miR-146a SNP rs2910164 GG genotip višestruko povećava rizik obolijevanja od OA kuka kod nositelja "TT" TNF- α SNP (rs1800629) i "GG" IL6 SNP (rs1800795) genotipova.

Ovi rezultati ukazuju da smo u multifaktorijskoj bolesti kao što je osteoartritis dokazali prisutnost dodatnog modificirajućeg čimbenika koji pridonosi ukupnom riziku obolijevanja od primarnog osteoartritisa kuka. Nismo pronašli takvu korelaciju s primarnim osteoartritisom koljena, što ukazuje da ova dva zgloba – kuk i koljeno mogu imati različite čimbenike rizika obolijevanja od OA.

Za sada postoje dvije znanstvene studije koji su pokušale pronaći povezanost pojedinih miR-146a SNP rs2910164 (G>C) genotipa sa sklonošću za obolijevanje od OA koljena [28,46]. Prva studija učinjena je na bolesnicima koji boluju od OA koljena (n=950) i kontrolama (n=738) Grčkog porijekla, a objavljena je 2020. godine [28]. Zaključak studije je da ispitanici oboljeli od osteoartritisa koljena, koji su nosioci rs2910164-GC ili CC genotipa, nemaju povećan rizik za obolijevanje od OA u usporedbi s nosiocima GG genotipa.

Od 18 ispitanika uključenih u navedenu studiju [28], tijekom operacijskog zahvata ugradnje totalne endoproteze koljena uzeti su uzorci hrskavice kondila femura te je ista hrskavica korištena za utvrđivanje izražaja miR-146a, IRAK-1, TRAF6, ADAMTS5, MMP-13, IL-6, IL-1 β i TNF- α u hondrocitima zahvaćenim osteoartritisom [28]. Analiza je pokazala da u hondrocitima nositelja GC genotipa postoji manji izražaj miR-146a te veći izražaj IRAK-1, TRAF6, MMP-13, IL-6 i IL-1 β u odnosu na nositelje GG genotipa [28]. Kontradiktorni rezultati genetske analize i analize izražaja u hondrocitima su mogli nastati zbog malog broja uzoraka hrskavice (n=18), ali i zbog analize samo jednog tkiva zgloba odnosno hrskavice, a ne drugih dijelova zgloba poput sinovijalne ovojnice, koja je također zahvaćena bolešću.

S obzirom da smo našim istraživanjem dokazali neizravnu povezanost miR-146a SNP rs2910164 GG genotipa s osteoartritisom kuka, u budućnosti bilo bi zanimljivo ispitati izražaj prethodno navedenih molekula (MMP-13, IL-6 i IL-1 β) u hrskavici kuka zahvaćenoj osteoartritisom u nositelja GG, GC i CC genotipova s ciljem utvrđivanja

potencijalne razlike u izražaju proupalnih i protuupalnih čimbenika između različitih genotipova.

Druga studija ovakvog tipa provedena je na Meksičkoj populaciji 2021. godine, a u istraživanju je bilo uključeno 310 bolesnika s osteoartritisom koljena i 379 zdravih kontrola [46]. Studija je istraživala potencijalnu povezanost između dvije funkcionalne varijante miR-146a gena (SNP-ovi rs2910164 i rs57095329) i osteoartritisa koljena [46]. Također, u studiji je učinjena stratifikacija rezultata prema spolu i radiološkim stadijima osteoartritisa [46]. U nosioca rs2910164 CC genotipa uočen je trend povećanog rizika u žena s 2. i 4. stadijem osteoartritisa i trend smanjenog rizika u muškaraca s 4. stadijem osteoartritisa [46]. Prva studija provedena na Grčkoj populaciji nije stratificirala rezultate prema spolu, tako da je ova studija na Meksičkoj populaciji to prva učinila. Poznato je da osteoartritis češće zahvaća ženski spol kao i RA kod kojeg je dokazana pozitivna povezanost miR-146 rs2910164 GG genotipa s obolijevanjem od RA u žena, dok je u muškaraca dokazana negativna povezanost [91]. Poznato je i da postoji razlika u izražaju proupalnih citokina poput IL-1 α , IL-3, IL-12, IL-16, IL-18 i TNF- α u žena koje boluju od OA u odnosu na muški spol [92]. S obzirom na razliku u izražaju proupalnih citokina među spolovima, moguća je i potencijalna razlika među spolovima u izražaju upalnih medijatora poput miR-146a. S obzirom da rezultati ove studije ukazuju samo na trend razlike između spolova, istu razliku bi trebalo istražiti između drugih populacija. Zaključno, studija nije pronašla statistički značajnu razliku u učestalosti pojedinih miR-146a genotipova između oboljelih od OA koljena i zdravih kontrola. Poznato je da se genetski rizični čimbenici među populacijama različite narodnosti razlikuju stoga je potrebno istraživati potencijalne rizične čimbenike među različitim populacijama u svrhu stvaranja genetske baze podataka za kompleksnu bolest kao što je osteoartritis. Iz istog razloga naša studija učinjena je na hrvatskoj populaciji.

Sve do nedavno, povezanost miR-146a SNP rs2910164 (G>C) sa sklonošću za nastanak primarnog osteoartritisa kuka nije bila istražena. U studiji objavljenoj 2023. godine autori su istraživali potencijalnu povezanost osteoartritisa koljena i kuka s genetskim polimorfizmima TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 i TLR9, miR-146a, miR-155 i miR-196a-2 [47]. Istraživanje je provedeno na 95 bolesnika oboljelih od osteoartritisa koljena (n=34) i kuka (n=61) te kontrolnih ispitanika (n=104). Poput naše i dvije prethodne studije, niti ovo istraživanje nije utvrdilo povezanost jednonukleotidnih

polimorfizama miR-146a sa sklonošću za obolijevanje od osteoartritis koljena, ali i kuka [26,46,47,88]. Također, nije utvrđena povezanost genetskih varijanti TLR2, TLR3, TLR9 i miR-155 sa sklonošću obolijevanja od osteoartritis [47]. Međutim, otkriveno je da polimorfizmi u genima TLR4 i TLR7 mogu povećati rizik od OA i da je alel varijante rs11614913 polimorfizma miR-196a-2 povezan sa smanjenom sklonošću za obolijevanje od primarnog OA kuka [47]. Nadalje, zaključeno je da modulacija TLR-ova miRNK-a i mogu biti potencijalna meta za farmakološku terapiju u liječenju OA [47].

U posljednje 2 godine objavljene su dvije meta-analize u vezi s izražajem miR-146a i izražajem drugih mikroRNK u osteoartritisu [28, 29]. Prva studija, objavljena 2022. godine, analizirala je izražaj miR-146a u mononuklearnim stanicama periferne krvi (od eng. Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMCs), hrskavici, hondrocitima, plazmi, serumu, sinovijalnoj tekućini i sinoviocitima [28]. Studija je obuhvatila 26 radova objavljenih u periodu 2010 - 2021. godine. Rezultati su pokazali da je razina izražaja miR-146a u PBMCs bila značajno viša u bolesnika s osteoartritisom nego u zdravih ljudi [28]. Međutim, značajne razlike nije bilo u plazmi [28]. Razina izražaja miR-146a u hrskavičnom tkivu bila je značajno veća u bolesnika s osteoartritisom nego u kontrolama. Međutim, nije bilo značajne razlike u izražaju iste molekule u hondrocitima [28]. Na temelju jedne studije, izražaj miR-146a u sinoviocitima bio je značajno manji u bolesnika s OA nego u kontrolnoj skupini [28]. Prema tim rezultatima, autori su sugerirali da visoki izražaj miR-146a u PMBCs i tkivu hrskavice predstavlja aktivniji signalni put NF- κ B u bolesnika s osteoartritisom [28]. Nadalje je analizirana potencijalna razlika u izražaju miR-146a između Kellgren-Lawrence (KL) podskupina [28]. Nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju miR-146a između KL podskupina [28].

Dvije studije uključene u meta-analizu analizirale su potencijalnu dijagnostičku korist od mjerenje izražaja miR-146a u plazmi [28]. Nije bilo značajne razlike u razinama miR-146a u plazmi između bolesnika s osteoartritisom i kontrolne skupine [28]. Stoga je dijagnostičku korist miR-146a u plazmi potrebno dodatno utvrditi. Trenutačno, većina studija podržava da miR-146a-5p svoj inhibicijski učinak upale ostvaruje ciljanjem TRAF6 i IRAK-1 gena, odnosno inhibicijom NF- κ B signalnog puta [28]. Stoga, regulacija miR-146a uglavnom ima zaštitnu ulogu u razvoju OA. Ovo bi moglo objasniti visoku razinu izražaja miR-146a u ranoj fazi OA i nisku razina u kasnoj fazi [28].

Jednonukleotidni polimorfizam rs2910164 miR-146a, analiziran u dvije od 26 studija uključenih u ovu meta-analizu, nije povezan s povećanim rizikom obolijevanja od OA [28]. Obje meta-analize identificirale su upravo miR-146a kao molekulu koja je patološki visoko izražena u zglobnoj hrskavici zahvaćenoj osteoartritisom [28, 29]. Iako prva studija nije pronašla abnormalan izražaj miR-146a u plazmi, druga studija navodi povišen izražaj iste molekule u krvi oboljelih od OA [28, 29].

Naše je istraživanje prvo ovakvog tipa u hrvatskoj (kavkaskoj) populaciji [88]. Što se tiče uloge gena miR-146a u utjecaju na genetski rizik od primarnog OA koljena, čini se da se naši rezultati slažu sa studijama Papathanasioua i sur., Miranda-Duarte i sur. i Stefika i sur [88]. U našoj studiji sa 609 bolesnika s krajnjim stadijem primarnog OA, ispitivana je povezanost miR-146a SNP rs2910164 (G>C) genotipova sa sklonošću za obolijevanje od primarnog OA kuka [88]. Pronašli smo značajnu povezanost s primarnim osteoartritisom kuka za kombinaciju genotipova (stratificirani genotip miR-146a s IL6 i stratificirani genotip miR-146a s TNF- α) [88]. Naše otkriće da dva čimbenika mijenjaju rizik za obolijevanje od primarnog OA kuka važno je neposredno - ne samo meta-analički [88]. Dakle, naš doprinos je da miR-146a rs2910164 GG genotip može povećati rizik kod onih koji već imaju genetsku sklonost u genima proupalnih citokina IL6 i TNF- α [88]. To znači da postoje različite rizične populacije, a miR-146a je značajan modificirajući čimbenik [88]. Dakle, naši rezultati [88] u vezi s ulogom gena miR-146a u utjecaju na genetski rizik od primarnog OA kuka nisu u skladu sa studijom Stefika i suradnika [47]. Vjerujemo da ovi autori nisu pronašli značaj u svojim analizama zbog male veličine uzorka studije i posljedično nemogućnosti stratificiranja rezultata [47]. Moguće funkcionalno objašnjenje naših rezultata moglo bi biti da alel miR-146a G (a time i genotip GG) umanjuje izražaj svog produkta. Iz literature znamo da miR-146a snižava razine mnogih citokina i drugih molekula uključenih u upalni odgovor [26, 46, 64, 65]. U osoba koji imaju smanjen izražaj miR-146a, ova regulacija je svedena na minimum. Stoga bi podražaji koji mogu inicirati IL-6 i TNF- α citokine u, na primjer, sinovijalnim stanicama mogli biti pretjerani u nositelja miR-146a GG genotipa. Rezultirajuće povećanje osjetljivosti na oboljevanje od OA moglo bi biti jedina vidljiva manifestacija za sada za ovaj učinak. Daljnja istraživanja sa staničnom kulturom (tj. nakon aloartroplastike) opravdani su kako bi se potvrdila naša pretpostavka. U prilog našoj pretpostavci ne ide otkriće od Papathanasioua i sur. koji su utvrdili da u hondrocitima nositelja GC genotipa postoji manji izražaj miR-146a

te veći izražaj IRAK-1, TRAF6, MMP 13, IL-6 i IL-1 β u odnosu na nositelje GG genotipa [26]. No s druge strane, takvo istraživanje provedeno je na vrlo malom broju ispitanika (n=18), bez kontrolne zdrave skupine i na hrskavici koljena [26]. Da bi ispitali našu pretpostavku moglo bi se učiniti sljedeće istraživanje u kojemu bi tijekom ugradnje totalne endoproteze kuka, bolesnicima koji boluju od osteoartritisu uzeli tkivo hrskavice te iz same hrskavice i hondrocita ispitali izražaj miR-146a te proupalnih citokina odnosno produkata IRAK-1 i TRAF6.

Bilo bi idealno u takvo istraživanje uključiti i kontrolnu skupinu, odnosno uzeti tkivo hrskavice kuka u osoba koje nemaju koštano-zglobne bolesti, npr. uslijed traumatskih amputacija ili s kadavera te usporediti rezultate.

Unatoč gore navedenim postignućima, naša studija ima nekoliko ograničenja [88]. Prvi je nedovoljan broj ispitanika i kontrola, što nas je moglo spriječiti da dokažemo izravnu značajnu povezanost između miR-146a rs2910164 (G > C) i osjetljivosti na primarni osteoartritis. Drugi se odnosi na prevalenciju primarnog OA kuka i koljena u općoj populaciji, koja raste s dobi. Tako će u skupini naizgled zdravih ispitanika u mlađoj životnoj dobi biti više onih koji će razviti primarni osteoartritis kuka i/ili koljena u podmakloj dobi. Posljedice usporedbe nasumične kontrolne populacije s bolesnicima s primarnim osteoartritisom starije dobi od kontrolne skupine su da bi potencijalne razlike mogle biti zamagljene i da su povezanosti koje smo uočili mogle biti izraženije. U našu kontrolnu skupinu uključili smo osobe mlađe od 45 godina jer bismo smanjili snagu studije da smo uključili samo osobe starije od 45 godina (i ne bismo dobili puno veću specifičnost identifikacije alela). U našu obranu, povećali smo veličinu ispitivane skupine za 20%, a kontrolne skupine za 10% u odnosu na naše posljednje objavljeno istraživanje. Također, naša je studija prva ove vrste u hrvatskoj (bijeloj) populaciji, druga koja je istraživala povezanost miR-146a SNP rs2910164 (G>C) sa sklonošću za nastanak primarnog osteoartritisu kuka te prva koja je pokazala značajnu povezanost s primarnim OA kuka za kombinaciju genotipova (neizravan utjecaj odabranog genotipa miR-146a s polimorfizmima gena IL6 ili TNF- α) [88].

Kod različitih bolesnika koji boluju od osteoartritisu, u tjelesnim tekućinama postoji različit izražaj određenih molekula koje prevladavaju u patogenezi same bolesti [92]. Kao posljedica toga, u studiji objavljenoj 2021. godine donesena je nova „molekularna“ klasifikacija osteoartritisu [92]. Na temelju navedenog, osteoartritis se može klasificirati

u pre-osteoarthritis, rani osteoarthritis, progresivni osteoarthritis i uznapredovali osteoarthritis [92]. U pre-osteoartrtisu dominiraju molekule poput adipokina i rezistina, koje dokazano aktiviraju urođeni imunitet i aktiviraju broje proupalne citokine [93].

Rani osteoarthritis je obilježen manjim simptomima i izostankom jasnih RTG znakova OA. Molekularno, ovaj stadij obilježava poremećaj različitih miRNK poput miR-140 i miR-210 te IL17 i IL15 [94, 95]. Na temelju osnovne patofiziologije u skupinama bolesnika, progresivni osteoarthritis koljena dalje se klasificira u četiri podtipa, tj. podtip gdje prevladava degradacija hrskavice (prevladavaju molekule C-telopeptid kolagena tipa II i neoepitop kolagena tipa II), podtip gdje prevladava pregradnja kosti (dominiraju n-telopeptid kolagena tipa I, alkalna fosfataza i C-telopeptid kolagena tip I), podtip gdje prevladava upala (dominiraju IL-6, IL-1 β i TNF- α) i podtip gdje prevladava bol (dominira visoko osjetljivi CRP, čimbenik rasta živaca i peptid povezan s kalcitoninskim genom) [92].

Na temelju ove klasifikacija, isti rad donosi i prijedlog terapije ovisno o tipu progresivnog osteoartritisa. Npr. za progresivni osteoarthritis gdje prevladava pregradnja kosti prijedlog terapije su bifosfonati i kalcitonin, a u podtipu gdje prevladava upala prijedlog terapije su IL-1 i TNF- α inhibitori [92].

Sadašnje klasifikacije osteoartritisa temelje se na radiološkim i kliničkim obilježjima te ovakva "molekularna klasifikacija" predstavlja novitet, ali i mogućnost identificiranja bolesnika koji su visokorizični za obolijevanje od osteoartritisa, dijagnostiku ranog osteoartritisa te utvrđivanje farmakološke terapije na temelju molekula izraženih u visokim koncentracijama u tkivu bolesnika. Takva klasifikacija potencijalno bi se mogla učiniti na temelju miRNK koje prevladavaju u hrskavici oboljelog od osteoartritisa na temelju čega bi se mogao odrediti "tip" osteoartritisa i napraviti učinkovit plan liječenja.

6. ZAKLJUČCI

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost pojedinih miR-146a rs2910164 (G>C) jednonukleotidnih polimorfizama u hrvatskoj populaciji i to između zdrave kontrolne skupine i bolesnika koji boluju od uznapredovalog stadija OA kuka i koljena te statističkom obradom utvrditi postoji li statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova među navedenim skupinama, a u svrhu utvrđivanja još jednog potencijalnog genetskog (epigenetskog) rizičnog čimbenika za obolijevanje od OA.

Istraživanje smo proširili na način da smo istražili učestalost pojedinih kombinacija genotipova (miR-146a SNP rs2910164 (G>C) s IL6 (rs1800795, C>G), TLR10 (rs11096957 C>T) i TNFA (rs1800629, C>T) među prethodno navedenim skupinama. Statističkom obradom smo pokušali utvrditi postoji li statistički značajna razlika u učestalosti različitih kombinacija genotipova među navedenim skupinama. Nakon provedenog istraživanja i analize rezultata zaključili smo sljedeće:

1. Ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih miR-146a rs2910164 (G>C) jednonukleotidnih polimorfizama među zdravim osobama i oboljelima od OA koljena ili kuka u hrvatskoj populaciji;
2. Postoji statistički značajna razlika u učestalosti kombinacije genotipova miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG s IL6 SNP rs1800795 (C>G) GG između zdravih kontrola i oboljelih od OA kuka. Nosioци takve kombinacije genotipova imaju veću predispoziciju za obolijevanje od OA kuka u odnosu na nosioce samo IL6 SNP rs1800795 (C>G) GG genotipa;
3. Postoji statistički značajna razlika u učestalosti kombinacije genotipova miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG s TNF- α SNP rs1800629 (C>T) TT između zdravih kontrola i oboljelih od OA kuka. Nosioци takve kombinacije genotipova imaju veću predispoziciju za obolijevanje od OA kuka u odnosu na nosioce samo TNF- α SNP rs1800629 (C>T) TT genotipa;
4. Ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti kombinacije genotipova miR-146a SNP rs2910164 (G>C) GG i TLR10 rs11096957 (C>T) između zdravih kontrola i oboljelih od OA kuka ili koljena;

5. Ovo istraživanje dokazalo je da postoji još jedan indirektni čimbenik [miR-146a SNP rs2910164 (G>C)] koji je uključen u mehanizam nastanka OA kuka i isti čimbenik u određenim kombinacijama s drugim genetskim rizičnim čimbenicima povećava sklonost za obolijevanje od OA kuka, ali ne i od OA koljena. Prethodno navedeno je još jedan dokaz da se genetski rizični čimbenici za obolijevanje od OA među različitim zglobovima razlikuju;

6. Otkrivanje još jednog (do sada nepoznatog) epigenetskog čimbenika rizika još je jedan dokaz o izrazito složenoj multifaktorijskoj etiopatogenezi osteoartritisa. Iz navedenog je razumljivo da će i potencijalni razvoj farmakološke terapije za istu bolest biti izrazito kompliciran u bliskoj budućnosti s obzirom da etiopatogeneza bolesti nije niti približno do kraja razjašnjena.

7. LITERATURA

1. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1323-30.
2. Aubourg G, Rice SJ, Bruce-Wootton P, Loughlin J. Genetics of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2022;30(5):636-49.
3. Fernandez-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco F. Genetics in osteoarthritis. *Curr Genomics* 2008;9(8):542-7.
4. Peffers MJ, Balaskas P, Smagul A. Osteoarthritis year in review 2017: genetics and epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2018;26:304-11.
5. Reynard LN. Analysis of genetics and DNA methylation in osteoarthritis: What have we learnt about the disease? *Semin Cell Dev Biol* 2017;62:57-66.
6. Khan NM, Haqqi TM. Epigenetics in osteoarthritis: Potential of HDAC inhibitors as therapeutics. *Pharmacol Res* 2018;128:73-9.
7. Jeffries MA. Osteoarthritis year in review 2018: genetics and epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2019;27:371-7.
8. Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, Tsezou A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* 2008;3:3740.
9. Si HB, Zeng Y, Liu SY i sur. Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis (OA) progression by modulating extracellular matrix (ECM) homeostasis in rats. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:1698-707.
10. Gao S, Liu L, Zhu S i sur. MicroRNA-197 regulates chondrocyte proliferation, migration, and inflammation in pathogenesis of osteoarthritis by targeting EIF4G2. *Biosci Rep* 2020;40:20192095.
11. Chavda S, Rabbani SA, Wadhwa T. Role and Effectiveness of Intra-articular Injection of Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Cureus*. 2022;14(4).

12. Filardo G, Previtali D, Napoli F, Candrian C, Zaffagnini S, Grassi A. PRP Injections for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Cartilage* 2021;13(1_suppl):364-75.
13. Mancuso P, Raman S, Glynn A, Barry F, Murphy JM. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Osteoarthritis: The Critical Role of the Cell Secretome. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:9.
14. Jotanović Z. Osteoarthritis zgloba kuka; Etiopatogeneza. U: Tudor A, Mađarević T,ur. Kuk. Zagreb: Medicinska naklada, 2018; st. 212-214.
15. Man GS, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis – a complex process that involves the entire joint. *J Med Life* 2014;7:37-41.
16. Anić T. Osteoarthritis koljena. U: Tudor A, Bergovac M, Ostojić Z, ur. Ortopedija i traumatologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2023; str. 619-624.
17. Jotanović Z. Role of gene polymorphisms of proinflammatory cytokines iL-1 and iL-17 in primary knee and hip osteoarthritis. Doktorska disertacija. Rijeka; 2013; str - 56
18. Jotanović Z. Osteoarthritis zgloba kuka; Liječenje. U: Tudor A, Mađarević T,ur. Kuk. Zagreb: Medicinska naklada, 2018; st. 215-217
19. Lim WB, Al-Dadah O. Conservative treatment of knee osteoarthritis: A review of the literature. *World J Orthop* 2022 ;13(3):212-29.
20. Rod E, Primorac D. Osnove regeneracijske medicine u ortopediji (mezenhimalne matične stanice i njihova primjena u ortopediji. U Tudor A, Bergovac M, Ostojić Z, ur. Ortopedija i traumatologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2023; str. 73-78
21. Katz JN, Earp BE, Gomoll AH. Surgical management of osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62(9):1220-8.
22. Tudor A. Osteotomije u području zgloba kuka. U: Tudor A, Mađarević T,ur. Kuk. Zagreb: Medicinska naklada, 2018; st.153-179
23. Matejčić N. Endoprotetika zgloba kuka. U: Tudor A, Mađarević T,ur. Kuk. Zagreb: Medicinska naklada, 2018; st. 279 - 305

24. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006;20:515-24.
25. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
26. Papathanasiou I, Mourmoura E, Balis C, Tsezou A. Impact of miR-SNP rs2910164 on miR-146a expression in osteoarthritic chondrocytes. *Adv Med Sci* 2020;65:78-85
27. Cong L, Zhu Y, Tu G. A bioinformatic analysis of microRNAs role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:1362-71.
28. Liu JN, Lu S, Fu CM. MiR-146a expression profiles in osteoarthritis in different tissue sources: a meta-analysis of observational studies. *J Orthop Surg Res.* 2022;17(1):148.
29. Liu H, Yan L, Li X i sur. MicroRNA expression in osteoarthritis: a meta-analysis. *Clin Exp Med* 2023;23(7):3737-49.
30. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006;20:515-24.
31. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 2006;11:529-43
32. Chu X, You H, Yuan X, Wenbin Z, Wenkai L, Xin G. Protective effect of lentivirus-mediated siRNA targeting ADAMTS-5 on cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis. *Int J Mol Med* 2013;31:1222-8.
33. Meng F, Zhang Z, Chen W i sur. MicroRNA-320 regulates matrix metalloproteinase-13 expression in chondrogenesis and interleukin-1 β -induced chondrocyte responses. *Osteoarthritis Cartilage* 2016;24:932-41.
- 34 Tudor K, Dembić Z, Prpić T i sur. *Medicina fluminensis* 2023;59;2;128-39
35. Song J, Ahn C, Chun CH, Jin EJ. A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis. *J Orthop Res* 2014;32:1628-35.
36. Song J, Jin EH, Kim D, Kim KY, Chun CH, Jin EJ. MicroRNA-222 regulates MMP-13 via targeting HDAC-4 during osteoarthritis pathogenesis. *BBA Clin* 2014;3:79-89.

37. Philipot D, Guérit D, Platano i sur. P16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2014;16:58.
38. Srivastava K, Tyagi K. Single nucleotide polymorphisms of microRNA in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta* 2018;478:101-10.
39. Alemán-Ávila I, Jiménez-Morales M, Beltrán-Ramírez O i sur. Functional polymorphisms in pre-miR146a and pre-miR499 are associated with systemic lupus erythematosus but not with rheumatoid arthritis or Graves' disease in Mexican patients. *Oncotarget* 2017;8:91876-91886.
40. Fu L, Jin L, Yan L, i sur. Comprehensive review of genetic association studies and meta-analysis on miRNA polymorphisms and rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus susceptibility. *Hum Immunol* 2016;77:1-6.
41. Mannucci C, Casciaro M, Minciullo PL, Calapai G, Navarra M, Gangemi S. Involvement of microRNAs in skin disorders: A literature review. *Allergy Asthma Proc* 2017;38:9-15.
42. Hussein M, Magdy R. MicroRNAs in central nervous system disorders: current advances in pathogenesis and treatment. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg* 2021;57:36.
43. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:509-24.
44. Króliczewski J, Sobolewska Lejnowski D, Collawn JF, Bartoszewski R. microRNA single polynucleotide polymorphism influences on microRNA biogenesis and mRNA target specificity. *Gene* 2018;640:66-72.
45. Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem* 2009;108:216-24.
46. Miranda-Duarte A, Borghino-Cuadra VM, González-Huerta NC i sur. Are functional variants of the microRNA-146a gene associated with primary knee OA? Evidence in Mexican mestizo population. *Mol Biol Rep* 2021;48:1549-57.
47. Stefik D, Vranic V, Ivkovic N i sur. Potential Impact of Polymorphisms in Toll-like Receptors 2, 3, 4, 7, 9, miR-146a, miR-155, and miR-196a Genes on Osteoarthritis Susceptibility. *Biology (Basel)* 2023;12(3):458.

48. Yan S, Wang M, Zhao J i sur. MicroRNA-34a affects chondrocyte apoptosis and proliferation by targeting the SIRT1/p53 signaling pathway during the pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Med* 2016;38:201-9.
49. Wu XF, Zhou ZH, Zou J. MicroRNA-181 inhibits proliferation and promotes apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis by targeting PTEN. *Biochem Cell Biol* 2017;95:437-44.
50. Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S i sur. Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2009;60:1035-41.
51. Li F, Yao J, Hao Q, Duan Z. miRNA-103 promotes chondrocyte apoptosis by down-regulation of Sphingosine kinase-1 and ameliorates PI3K/AKT pathway in osteoarthritis. *Biosci Rep* 2019;39:20191255.
52. Xiang Y, Li Y, Yang L, He Y, Jia D, Hu X. miR-142-5p as a CXCR4-Targeted MicroRNA Attenuates SDF-1-Induced Chondrocyte Apoptosis and Cartilage Degradation via Inactivating MAPK Signaling Pathway. *Biochem Res Int* 2020;2020:4508108.
53. Yang DW, Qian GB, Jiang MJ, Wang P, Wang K-Z. Inhibition of microRNA-495 suppresses chondrocyte apoptosis through activation of the NF- κ B signaling pathway by regulating CCL4 in osteoarthritis. *Gene Ther* 2019;26:217-29.
54. Ding Y, Wang L, Zhao Q, Wu Z, Kong L. MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med* 2019;43:779-90.
55. Lin Z, Tian XY, Huang XX, He LL, Xu F. microRNA-186 inhibition of PI3K-AKT pathway via SPP1 inhibits chondrocyte apoptosis in mice with osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2019;234:6042-53.
56. Chen S, Li B. MiR-128-3p Post-Transcriptionally Inhibits WSP1 to Suppress Apoptosis and Inflammation in Human Articular Chondrocytes via the PI3K/AKT/NF- κ B Signaling Pathway. *Cell Transplant* 2020;29:96
57. Tian F, Wang J, Zhang Z, Yang J. miR-107 modulates chondrocyte proliferation, apoptosis, and extracellular matrix synthesis by targeting PTEN. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;12:488-97.

58. Ma Y, Wu Y, Chen J i sur. miR-10a-5p Promotes Chondrocyte Apoptosis in Osteoarthritis by Targeting HOXA1. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;14:398-409.
59. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achiev Life Sci* 2016;10:175-86.
60. Beyer C, Zampetaki A, Lin NY i sur. Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:18.
61. Laczny C, Leidinger P, Haas Ji sur. miRTrail--a comprehensive webserver for analyzing gene and miRNA patterns to enhance the understanding of regulatory mechanisms in diseases. *BMC Bioinformatics* 2012;13:36.
62. Lao TD, Le TAH. Data Integration Reveals the Potential Biomarkers of Circulating MicroRNAs in Osteoarthritis. *Diagnostics (Basel)* 2021;11:412.
63. Ntoumou E, Tzetis M, Braoudaki M i sur. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. *Clin Epigenetics* 2017;9:1-15.
64. Saba R, Sorensen DL, Booth SA. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Front Immunol* 2014;5:578.
65. Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol* 2012;5:13.
66. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997;278(5343):1612-5.
67. Jain A, Kaczanowska S, Davila E. IL-1 Receptor-Associated Kinase Signaling and Its Role in Inflammation, Cancer Progression, and Therapy Resistance. *Front Immunol* 2014;5:553.
68. Deng Y, Hahn BH, Tsao BP. "Systemic Lupus Erythematosus". *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*: 2002 Jan 18;31–22.
69. Wang L, Qiao Q, Ferrao R i sur. Crystal structure of human IRAK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(51):13507-12.

70. Walsh MC, Lee J, Choi Y. Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev* 2015;266(1):72-92
71. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25(51):6680-4
72. Albenis BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 2000;35(2):151-9.
73. Tsotakos N, Ahmed I, Umstead TM i sur. All trans-retinoic acid modulates hyperoxia-induced suppression of NF-kB-dependent Wnt signaling in alveolar A549 epithelial cells. *PLoS One* 2022;17(8):e0272769.
74. Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 2006;72(9):1102-13.
75. Jin L, Zhao J, Jing W i sur. Role of miR-146a in human chondrocyte apoptosis in response to mechanical pressure injury in vitro. *Int J Mol Med*. 2014;34(2):451-63.
76. He H, Jazdewski K, Li W, Liyanarachchi S i sur. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:19075-80.
77. Li L, Chen XP, Li Y. MiR-146a and human disease. *Scand J Immunol* 2010;71:227-31.
78. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of micro-RNA 146 suppresses NF-kB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* 2008;27:5643-7.
79. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of miR-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* 2008;14:417-24
80. Mei J, Bacho R, Zhang CL. MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1. *Mol Cell Biol* 2011;31:3584-92
81. Boldin MP, Teganov KD, Rao DJ i sur. MiR-146q is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med* 2011;208:1189-201.

82. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9184-9.
83. Garzon R, Volinia S, Liu CG i sur. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:3183-9.
84. Starczynowski DT, Kukenbauer F, Arigiropoulos B i sur. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nature Med* 2010;16:49-58.
85. Flamant S, Ritchie W, Guilhot J i sur. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2010;95:1325-33.
86. Paik J, Jang JY, Jeon YK i sur. MicroRNA-146a downregulates NFkB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:4761-71.
87. NIH Consensus Statement on total knee replacement. *NIH Consens State Sci Statements* 2003;20(1):1-34.
88. Tudor K, Baranasic J, Knezevic J i sur. Indirect influence of microRNA-146a on the association of IL-6 and TNF- α genetic polymorphisms with the increased risk of hip osteoarthritis. *J Orthop Res* 2024;42(7):1482-9.
89. Eftedal RK, Khuu C, Sehic A i sur. Interleukin (IL)6 gene rs1800795 (-174G>C) polymorphism is associated with increased risk to hip but not knee osteoarthritis. *Glob J Orthop Res* 2023;4(3):1778-1780.
- 90 Eftedal RK, Jotanovic Z, Balen S, Dembic Z. TNFA genetic polymorphism is associated with risk for developing hip but not knee osteoarthritis in Croatian population. *EC Orthop* 2020;01-11.
91. Moran-Moguel MC, Petarra-Del Rio S, Mayorquin-Galvan EE, Zavala-Cerna MG. Rheumatoid Arthritis and miRNAs: A Critical Review through a Functional View. *J Immunol Res* 2018;2018:2474529.
92. Lv Z, Yang YX, Li J i sur. Molecular Classification of Knee Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:725568.
93. Abella V, Scotece M, Conde J i sur. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol* 2017;13(2):100-9.

94. Si H, Zeng Y, Zhou Z i sur. Expression of miRNA-140 in chondrocytes and synovial fluid of knee joints in patients with osteoarthritis. *Chin Med Sci J* 2016;31(4):207-12.
95. Xie C, Chen Q. Adipokines: New Therapeutic Target for Osteoarthritis? *Curr Rheumatol Rep* 2019;21(12):71.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Karlo Tudor
Adresa	Vinka Benca 4a , 51 000 Rijeka
Broj mobitela	0922124105
Web adresa	karlotudor@yahoo.com
Državljanstvo	Republike Hrvatske
Mjesto rođenja	Ogulin
Datum rođenja	31.03.1990
Spol	Muško

RADNO ISKUSTVO

siječanj 2021. – i dalje	Klinika za ortopediju Lovran Specijalna bolnica za ortopediju dr. Nemeč
rujan 2017. – prosinac 2021	Zavod za hitnu medicinu Karlovačke županije, Dr. Vladka Mačeka 48, Karlovac
lipanj 2016. – kolovoz 2017	Klinička bolnica Dubrava, Avenija Gojka Šuška 6, 10 000 Zagreb, -doktor medicine- pripravnik; obavljanje pripravničkog staža.
studenj 2015. – travanj 2016.	Demonstrator na Katedri za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje na Medicinskom fakultetu u Rijeci.
2014.- 2015.	Demonstrator na Zavodu za anatomiju u akademskoj godini na Medicinskom fakultetu u Rijeci.
2011.- 2012.	

OBRAZOVANJE

Vrijeme	Svibanj.2023
Mjesto	Lovran
Naziv i oblik organizacije	Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske
Naziv ostvarene kvalifikacije	Položen specijalistički ispit iz Ortopedije i Traumatologije
Vrijeme	28. travnja 2016.
Mjesto	Zagreb
Naziv i oblik organizacije	Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske
Naziv ostvarene kvalifikacije	položen stručni ispit za doktora medicine
Vrijeme (od-do)	2009.-2015.
Mjesto	Rijeka
Naziv i oblik organizacije	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Naziv ostvarene kvalifikacije	doktor medicine
Vrijeme (od-do)	2005. - 2009.
Mjesto	Rijeka
Naziv i oblik organizacije	Prva Riječka Hrvatska gimnazija

**DODATNO
OBRAZOVANJE**

Tečajevi i radionice

Vrijeme	27. - 29. rujan. 2018.
Naziv	II. Kongres oropeda i traumatologa u BiH Autor predavanja "Povezanost pozicije bescementnog femoralnog stema s preživljavanjem totalno primarno ugrađene endoproteze kuka"
Mjesto	Mostar
Vrijeme	2 - 4 lipanj. 2018.
Naziv	XXVII Izokinetic Medical Group Conference Barcelona
Vrijeme	9 - 2. svibanj. 2018.
Naziv	18 th ESSKA congres Glasgow
Vrijeme	21 – 22 listopad, 2016.
Naziv	Tečaj (sudjelovao kao tehnička ispomoć), kirurški pristupi u traumatologiji i orotpediji (kadaveri).
Mjesto	Rijeka

Vrijeme	08.svibnja 2015.
Naziv	International Trauma Life Suport tečaj
Mjesto	Fužine
Vrijeme	05.lipnja. 2015.
Naziv	Advanced life suport tečaj
Mjesto	Kabinet vještina na Trsatu u Rijeci
OBJAVLJENI RADOVI	
Naziv Knjige(Koautor)	Kuk Anton Tudor, Tomislav Mađarević Zagreb, 2018
Autori Mjesto i godina zdavanja	Arthroscopic proximal femoral resection surgical tehniqe Ivan Rakovac, PhDab, Ida Matic, MDc, Tomislav Prpic, PhDd, Tomislav Madarević, PhDd,
Naziv rada(koautor)	Sandra Velcic Brumnjak, PhDd, Karlo Tudor, MDe and Miljenko Franic, PhDfghi
Autor	
Časopis i godina	Current Orthopeadic practice, 2021

izdavanja	Ortopedija i traumatologija
Naziv knjige(koautor)	Anton Tudor, Marko Bergovac, Zdenko Ostojić
Autori	Zagreb, 2023
Mjesto i godina izdavanja	
Naziv rada	Unique case of posttraumatic atrophic proximal ulna nonunion in a child: a review of the literature with case report
Autori	Karlo Tudor, Danijel Lopac, Anton Tudor, Branko Šestan
Časopis i godina izdavanja	Current Orthopaedic practice, 2022
Naziv rada	Uloga mikroRNK molekula u patogenezi osteoartritisa
Autori	Karlo Tudor, Zlatko Dembić, Tomislav Prpić, Tomislav Mađarević, Dea Salamon, Zdravko Jotanović
Časopis i godina izdavanja	Medicina Fluminensis, 2023
Naziv rada	Indirect influence of MicroRNA-146a on the Association of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-Alpha Genetic Polymorphisms with the Increased Risk to Hip Osteoarthritis
Autori	Karlo Tudor, Jelena Knežević, Marta Serer –Vičević, Zlatko Dembić, Zdravko Jotanović
Časopis i godina izdavanja	Journal of Orthopaedic Research, 2024
OSOBNJE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE	
Materinji jezik	Hrvatski

Strani jezici	Engleski (aktivno), Talijanski(umjereno služenje, bez certifikata)
TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE	
Rad na računalu	Windows operativni sustavi Microsoft Office (Word, Excel, Access, PowerPoint, Outlook) Korištenje Interneta i e-mail-a
Vozačke dozvole	B kategorija
OSTALO	
HOBII INTERESI	
Sport	Podvodni ribolov, skijanje, sportsko penjanje.
Umjetnost	Film, glazba
POLJE INTERESA	Ortopedija i traumatologija