



XIX MEĐUNARODNA KONVENCIJA O KVALITETU  
JUSK ICQ - 2023



# mikroRNK kao novi dijagnostički alati- problemi i izazovi

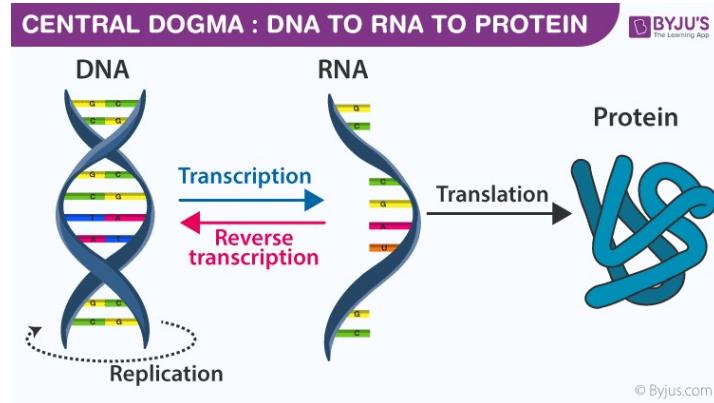
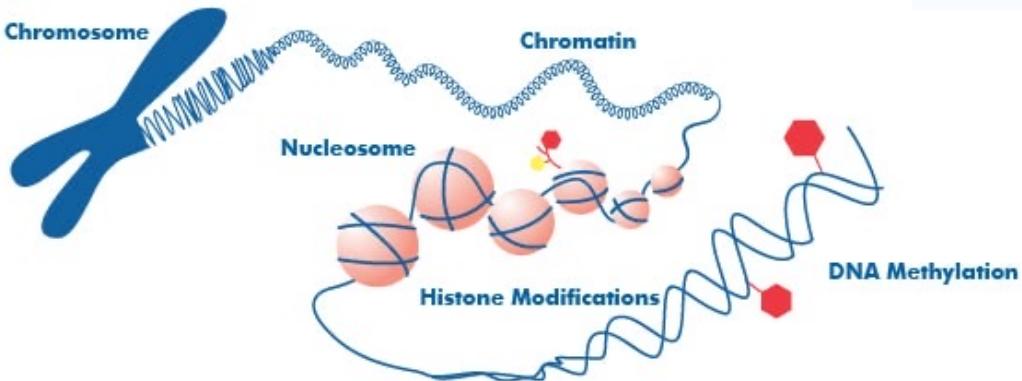


Društvo medicinskih biohemičara Srbije

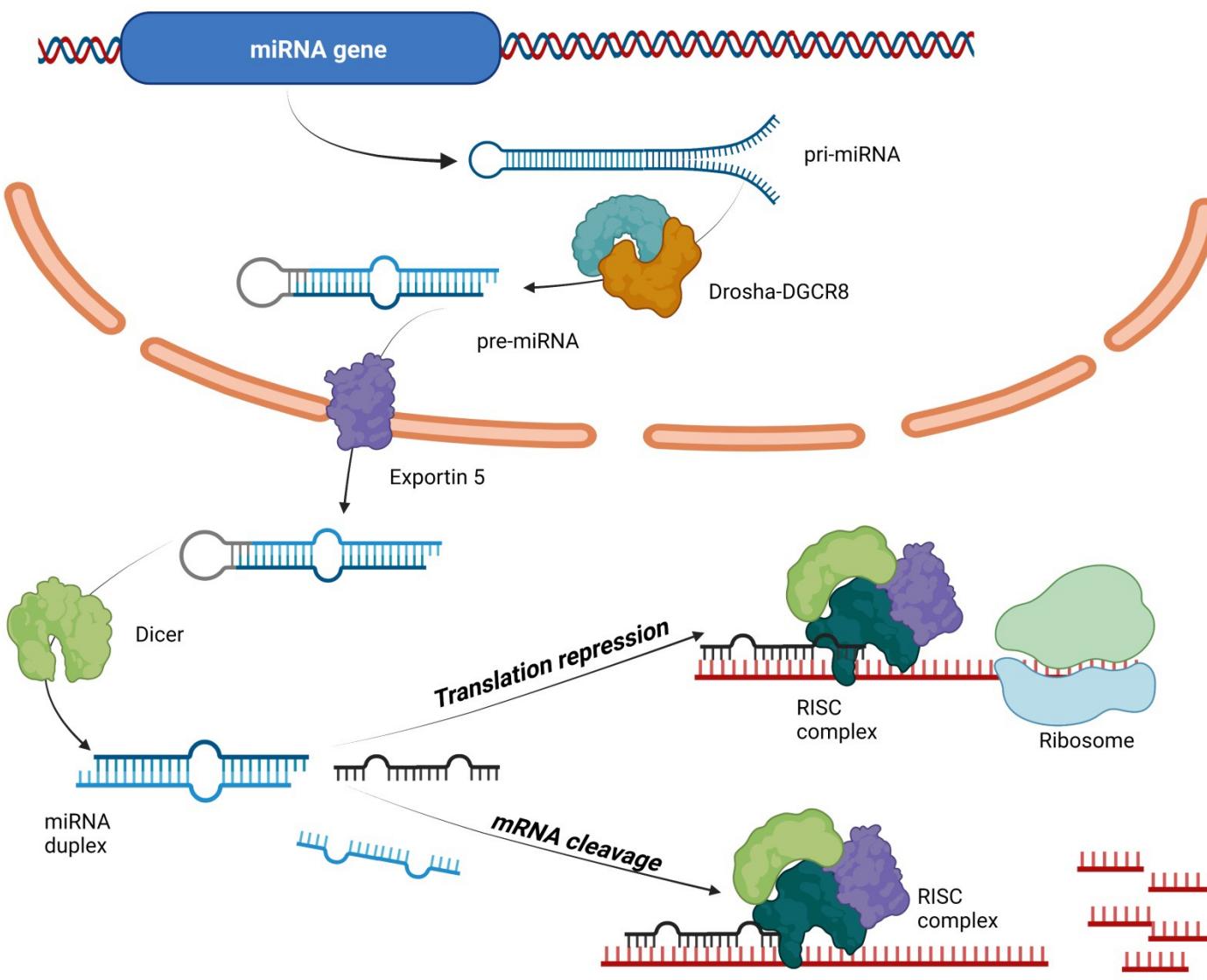
Jelena Munjas  
Farmaceutski fakultet  
Katedra za medicinsku biohemiju

# mikroRNK

- predstavljaju deo epigenetske regulacije ekspresije gena
- U epigenetske mehanizme se ubrajaju: metilacija DNK, modifikacija histona, regulacija ekspresije od strane mikroRNK



# Biogeneza microRNK



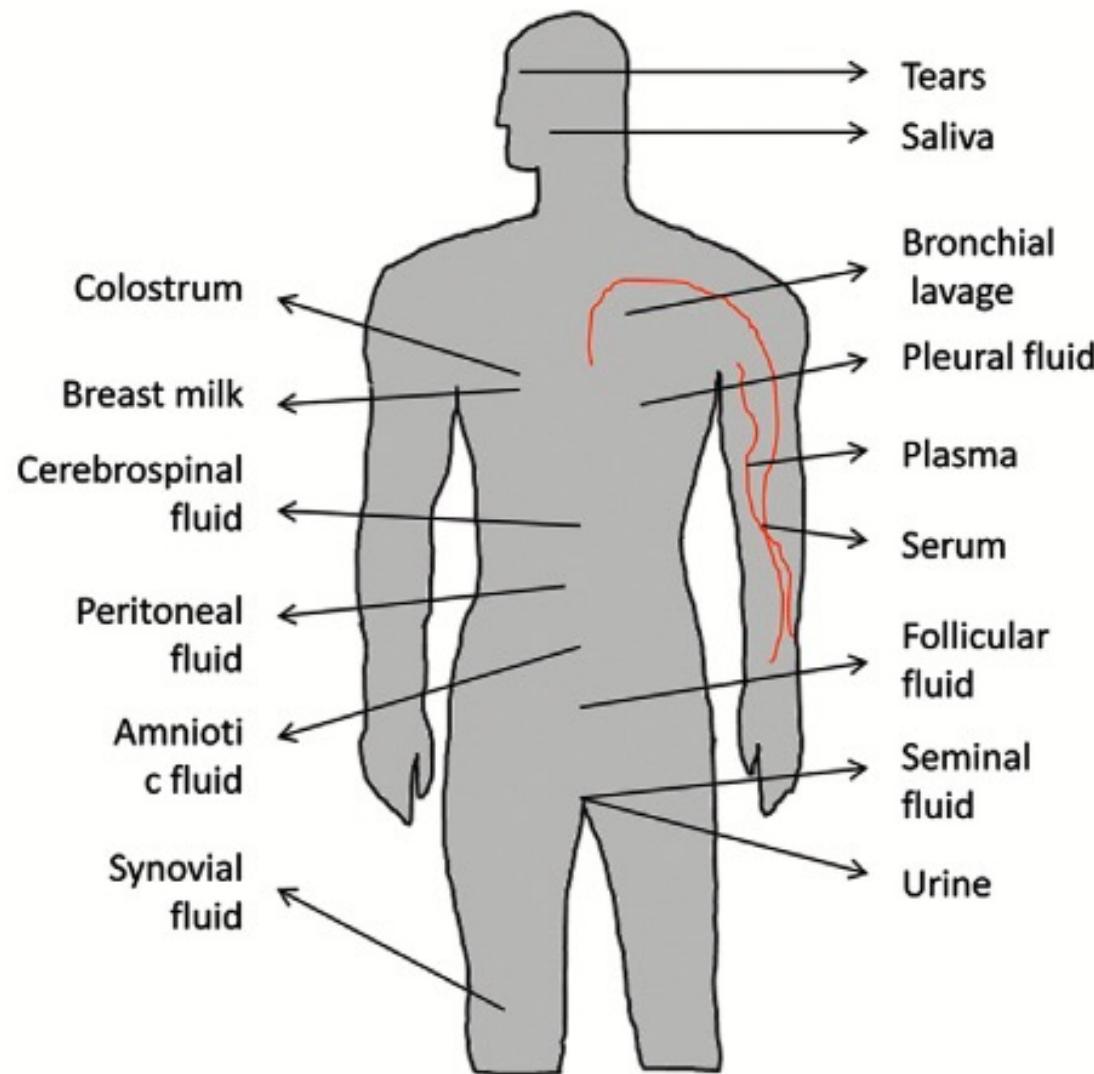
vezivanjem za 3' nekodirajuće regije iRNK dovode su supresije ekspresije gena: inhibicija translacije ili degradacije ciljne iRNK

mikroRNK-molekule vodiči za post-traskripcionu regulaciju ekspresije gena

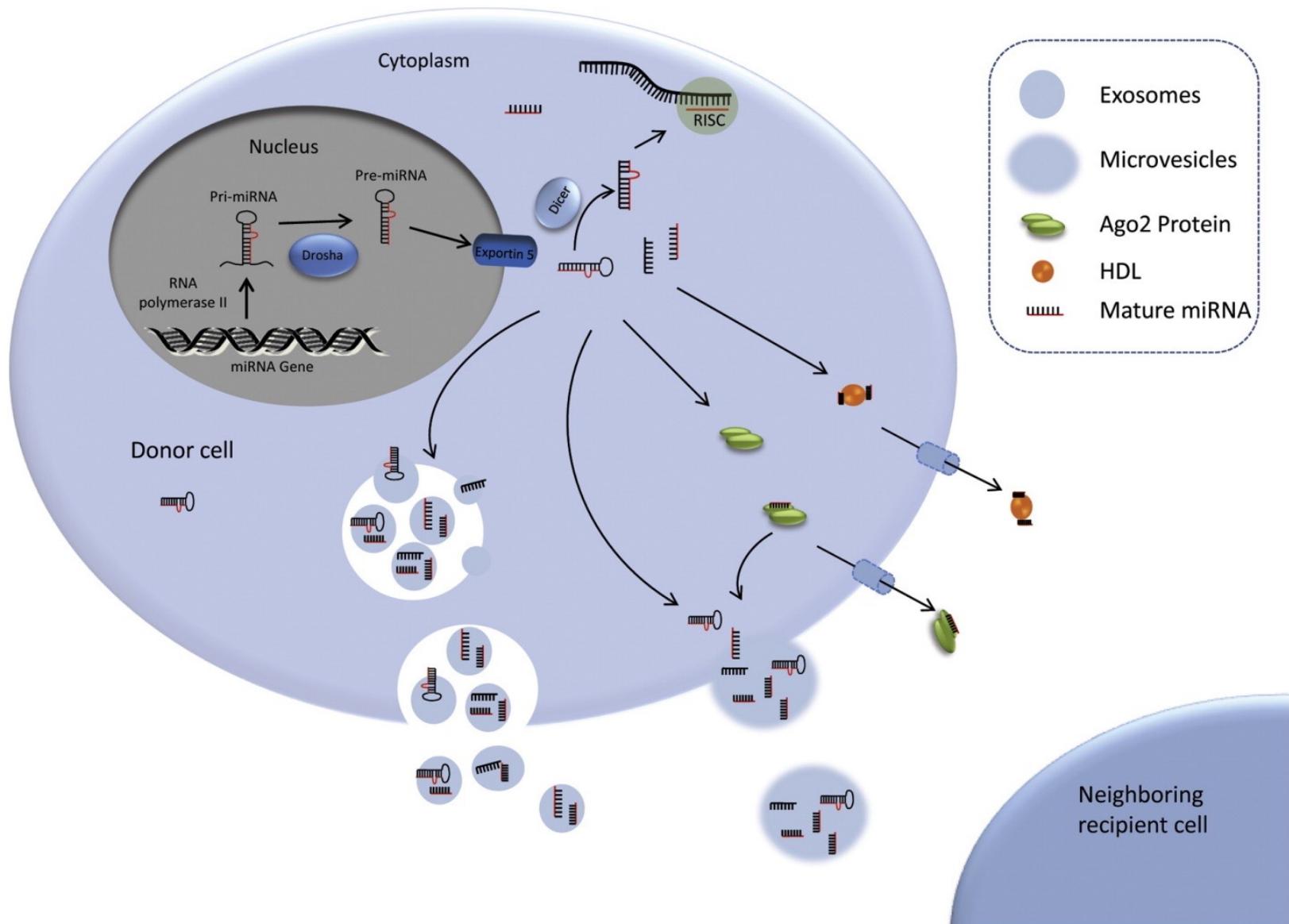
# mikroRNK

- u humanom genomu mikroRNK regulišu od 30-60% gena koji kodiraju proteine
- Vezivanje za 3' kraj iRNK sa većim ili manjim stepenom komplementarnosti!
- 1 microRNK može da reguliše ekspresiju više od jednog gena
- trenutni broj prema bazi <https://www.mirbase.org/> je **1.917**
- mikroRNK učestvuju u regulaciji velikog broja bioloških procesa: rast, metabolizam ćelije, diferencijacija, deoba, smrt ćelije, embriogeneza

# Cirkulišuće mikroRNK

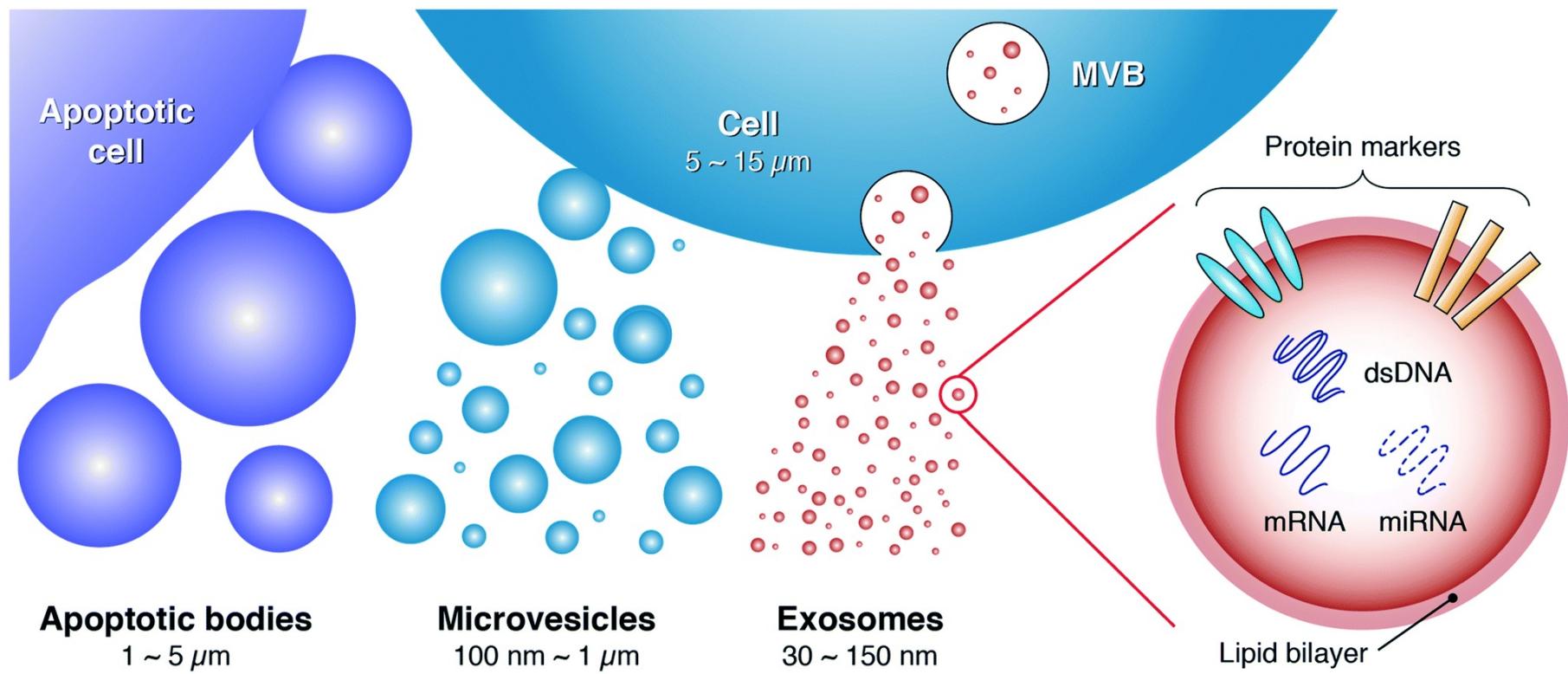


# Cirkulišuće mikroRNK



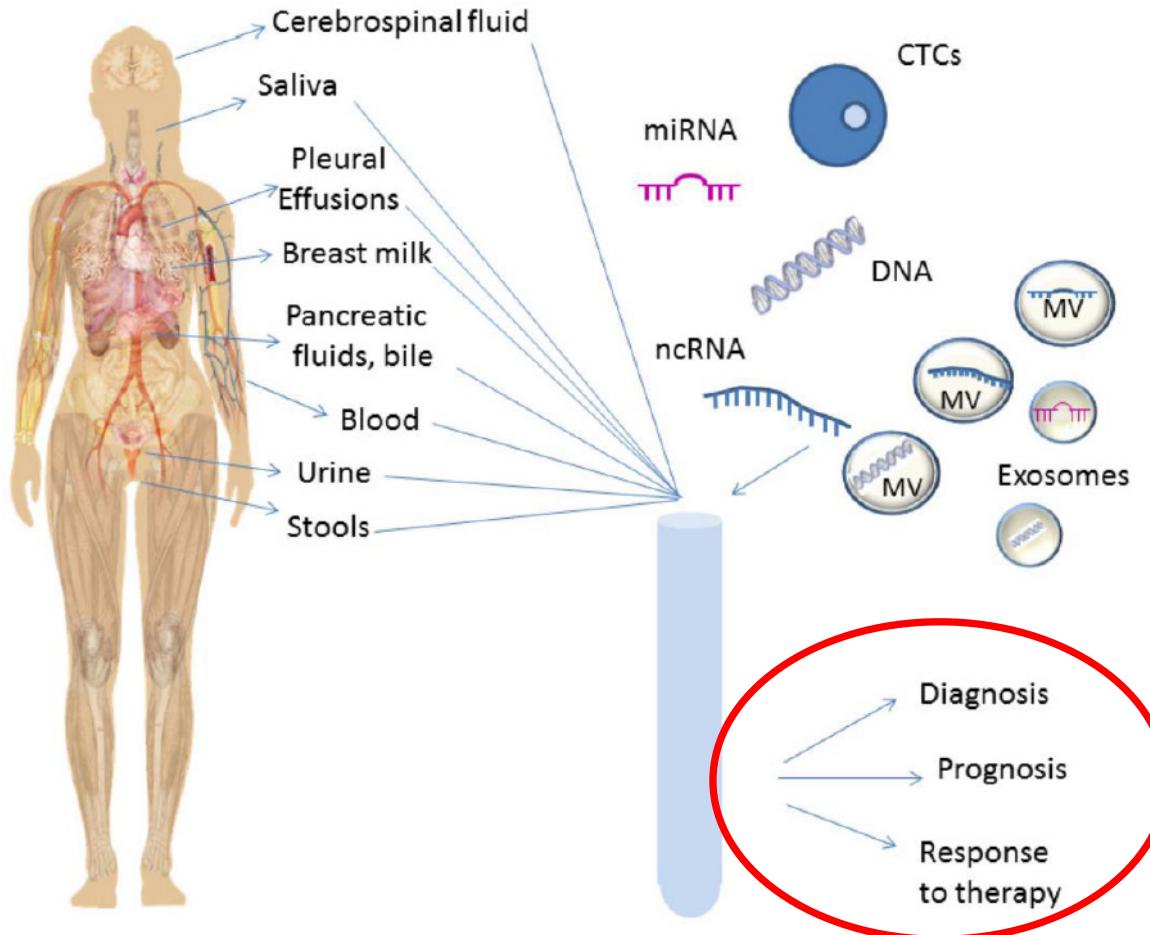
Sohel MH. Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges. Achievements in the Life Sciences. 2016 Dec 1;10(2):175-86.

# Cirkulišuće mikroRNK



# Cirkulišuće mikroRNK

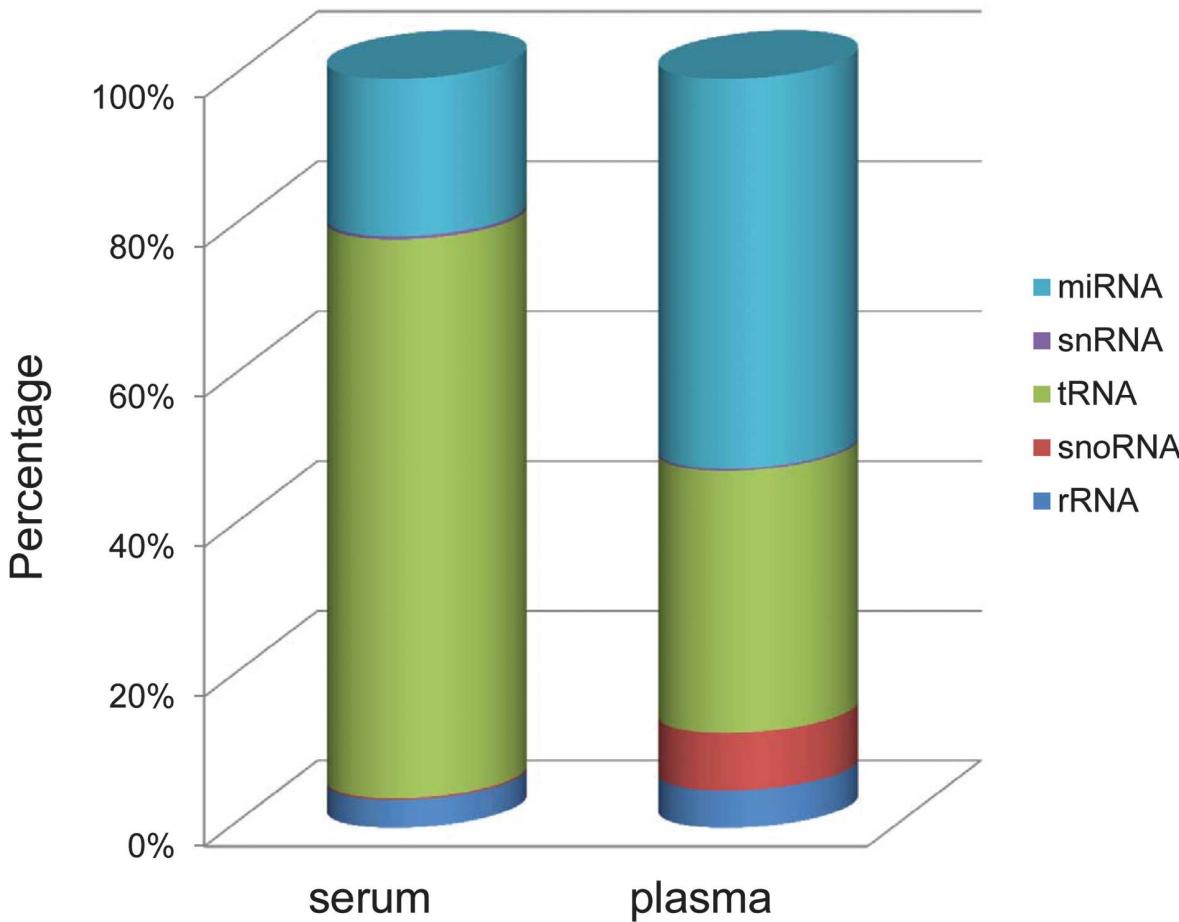
- RNK molekuli se razgrađuju u sekundama u ekstraćelijskom prostoru (RNaze)
- Ekstraćelislike mikroRNK su izuzetno stabilne!
- Nalaze se u vezikulama ili u kompleksima sa proteinima
- Pokazano je da koncentracija različitih mikroRNK u krvi se menja u patološkim stanjima, i pretpostavlja se da mogu kao takve služiti kao biomarkeri!



# Cirkulišuće mikroRNK

- Ali... vrlo malo preklapanja postoji između studija
- Koji su uzroci?
- Preanalitika
  - izbor uzorka
  - priprema uzorka, vreme od venepunkcije do obrade uzorka i zamrzavanja
  - izolacija
- Analitika
  - kvantifikacija
- Analiza podataka
  - normalizacija

# Cirkulišuće mikroRNK: Izbor uzorka- serum ili plazma

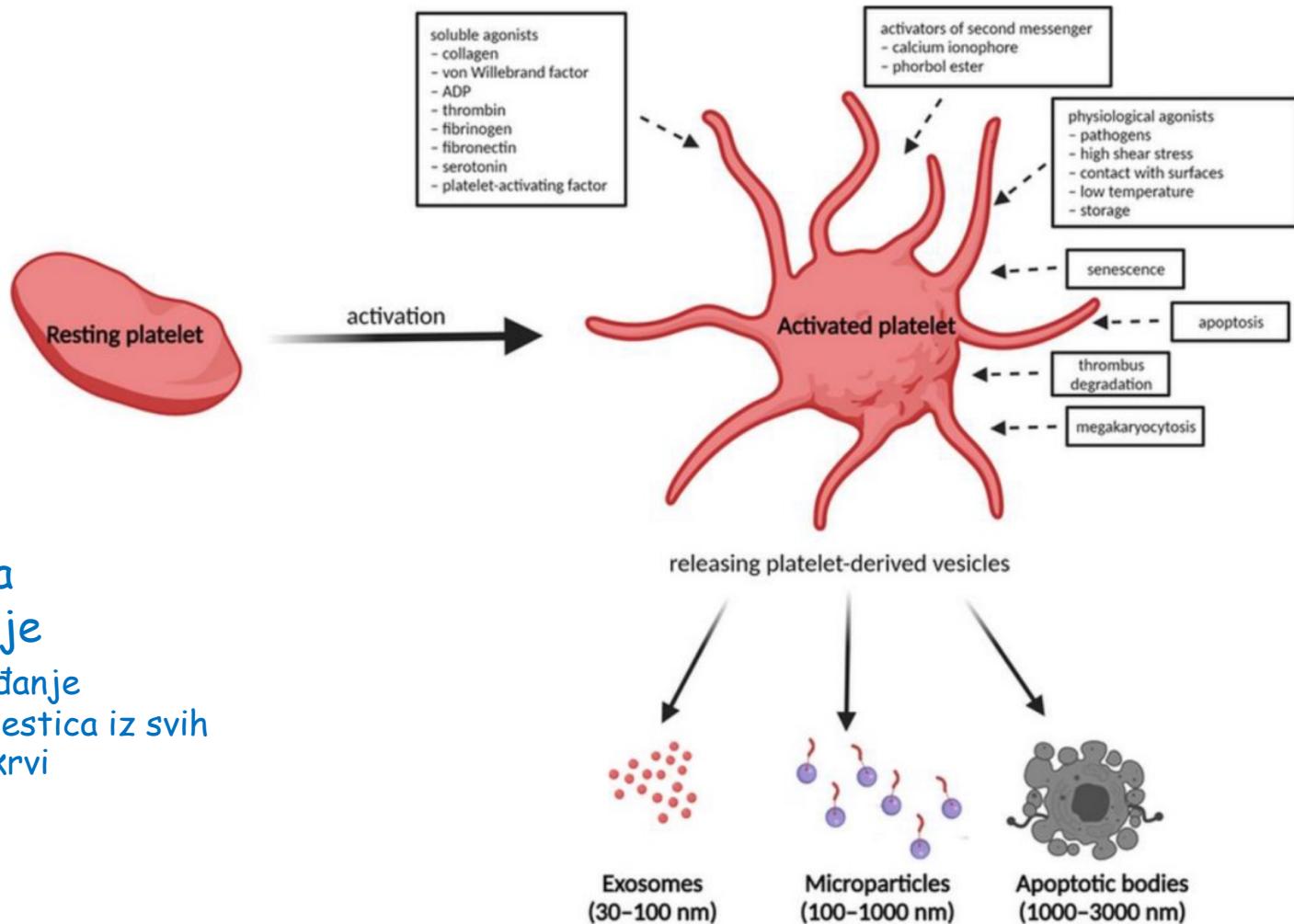


Ge Q, Shen Y, Tian F, Lu J, Bai Y, Lu Z. Profiling circulating microRNAs in maternal serum and plasma. *Molecular Medicine Reports*. 2015 Sep 1;12(3):3323-30.

Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*. 2012;7(7):e41561. doi:10.1371/journal.pone.0041561

# Koagulacija- oslobađanje mikročestica

- aktivacija koagulacije
  - oslobađanje mikročestica iz svih ćelija krvi

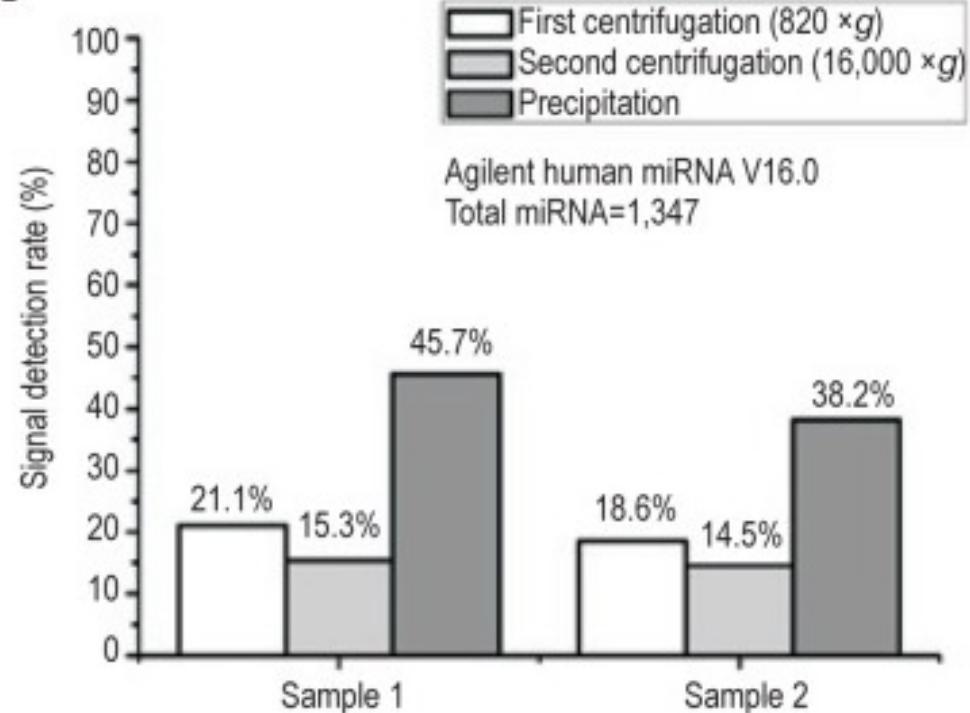


# Pre analitički faktori: obrada uzorka

A



B



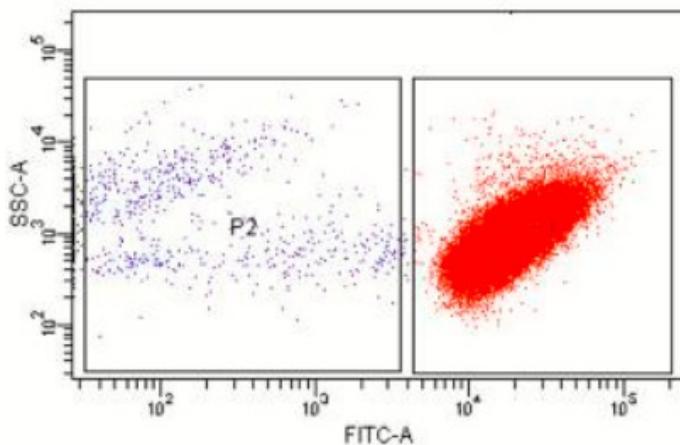
Zheng XH, Cui C, Zhou XX, Zeng YX, Jia WH. Centrifugation: an important pre-analytic procedure that influences plasma microRNA quantification during blood processing. Chinese journal of cancer. 2013 Dec;32(12):667.

# Cirkulišuće mikroRNK

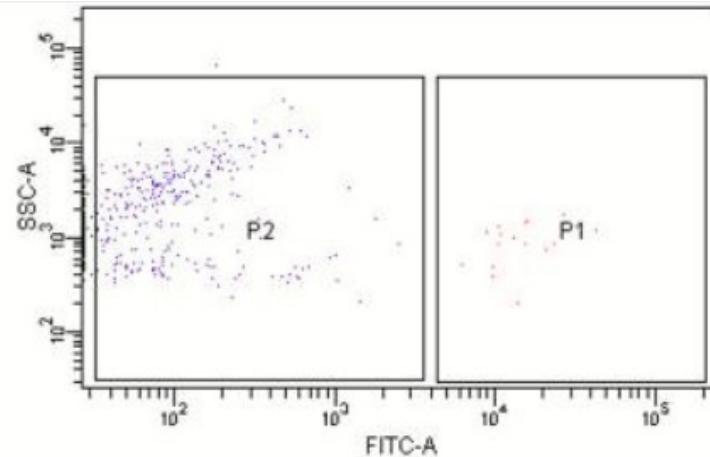
## Preanaliički fakotri: obrada uzorka/zamrzavanje

A

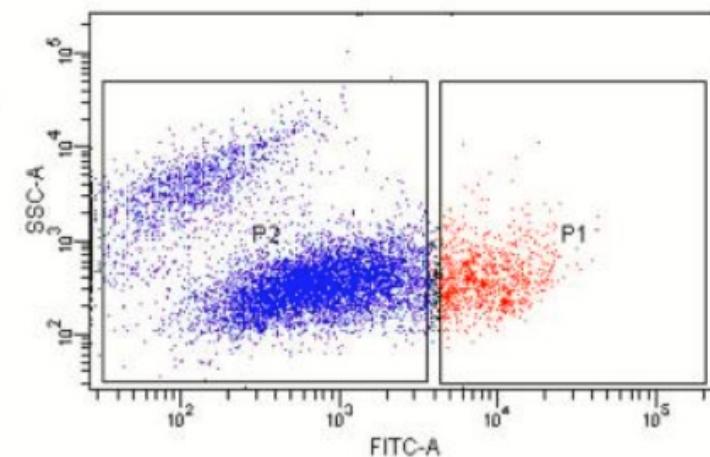
Standard plasma



1900 x g  
10 min



Freeze/thaw  
1900 x g  
10 min

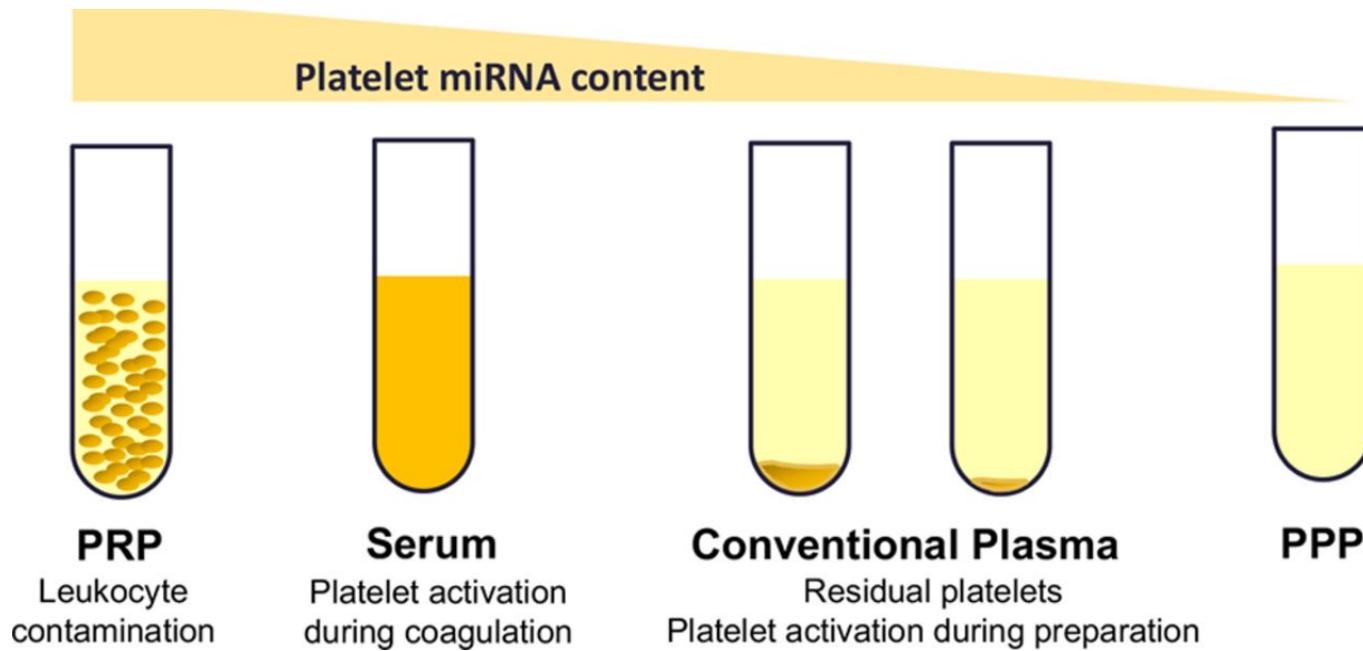


Merenje ekstracelularnih miRNA u arhiviranim  
uzorcima kritično zavisi od uklanjanja  
rezidualnih trombocita pre zamrzavanja  
uzorka plazme!!!  
*platelet-derived MPs*

Mitchell AJ, Gray WD, Hayek SS, et al. Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. Sci Rep. 2016;6:32651. Published 2016 Sep 13. doi:10.1038/srep32651

# Centrifuganje

- Plazma osiromašena trombocitima
- I  $1\times 890\times g$       II  $1\times 1900\times g$
- I  $1\times 890\times g.$       II  $10.000\times g-16.000\times g$

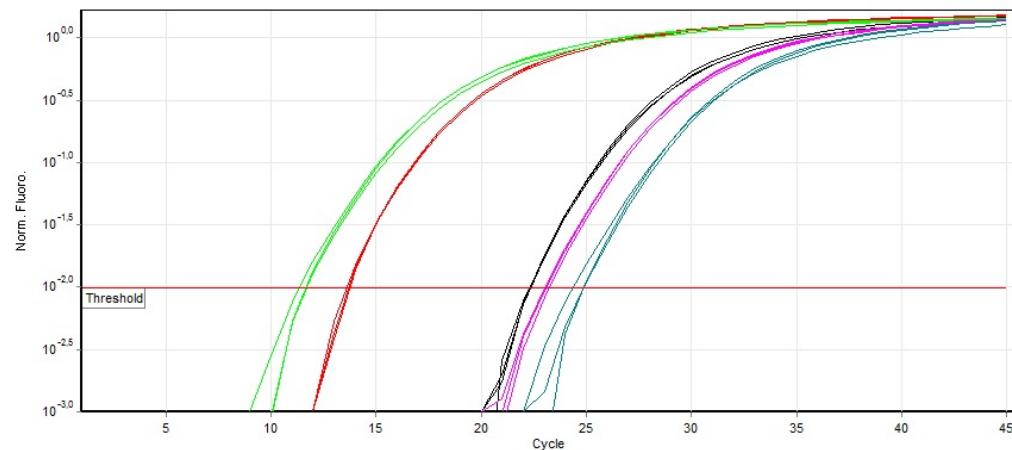


# Metode za kvantifikaciju mikroRNK

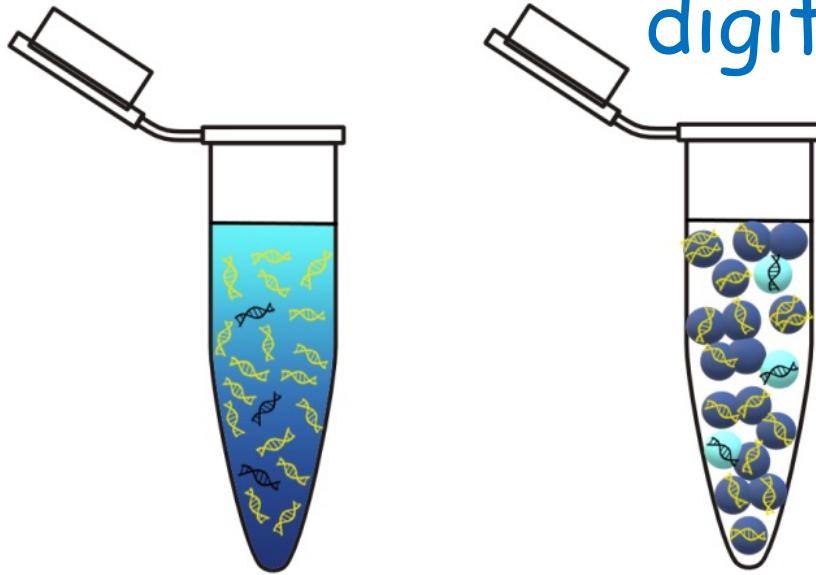
- platforme zasnovane na specifičnoj amplifikaciji:
  - qRT-PCR
  - ddPCR
- Real-time PCR
- Kvantifikacija mikroRNK
- Prevodenje mikroRNK u cDNK-reverzna transkripcija
- korišćenje standardne krive
- procena efikasnosti reakcije
- prisustvo inhibitora



7500 Real-time PCR

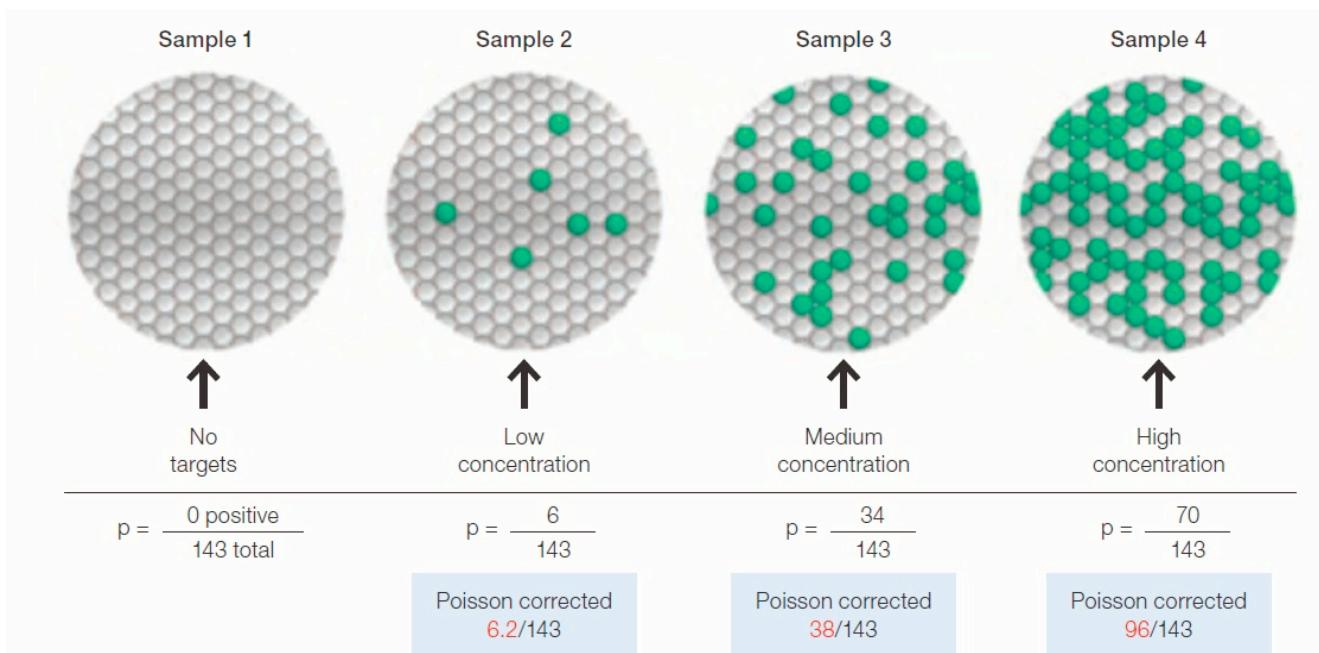


# digital droplet PCR



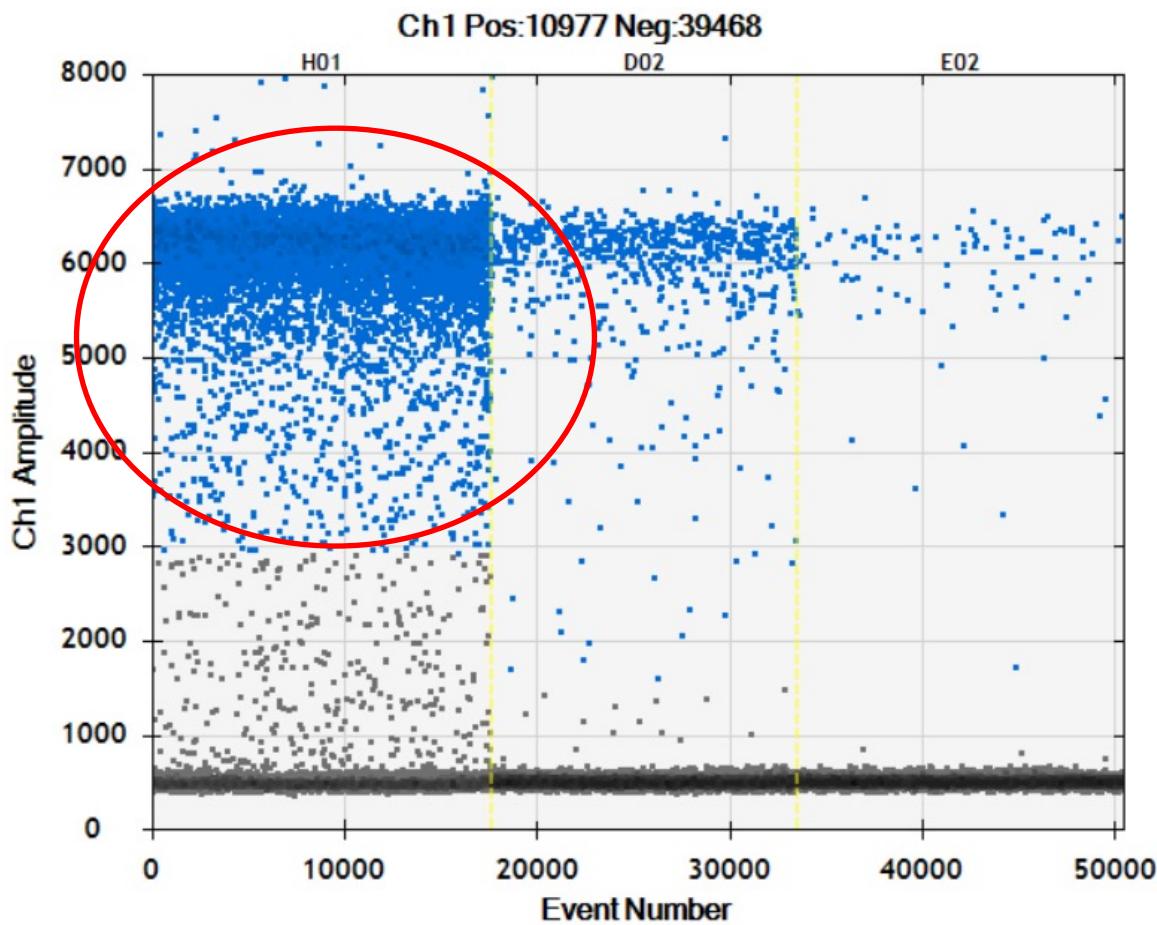
CONVENTIONAL PCR

DIGITAL PCR



# digital droplet PCR

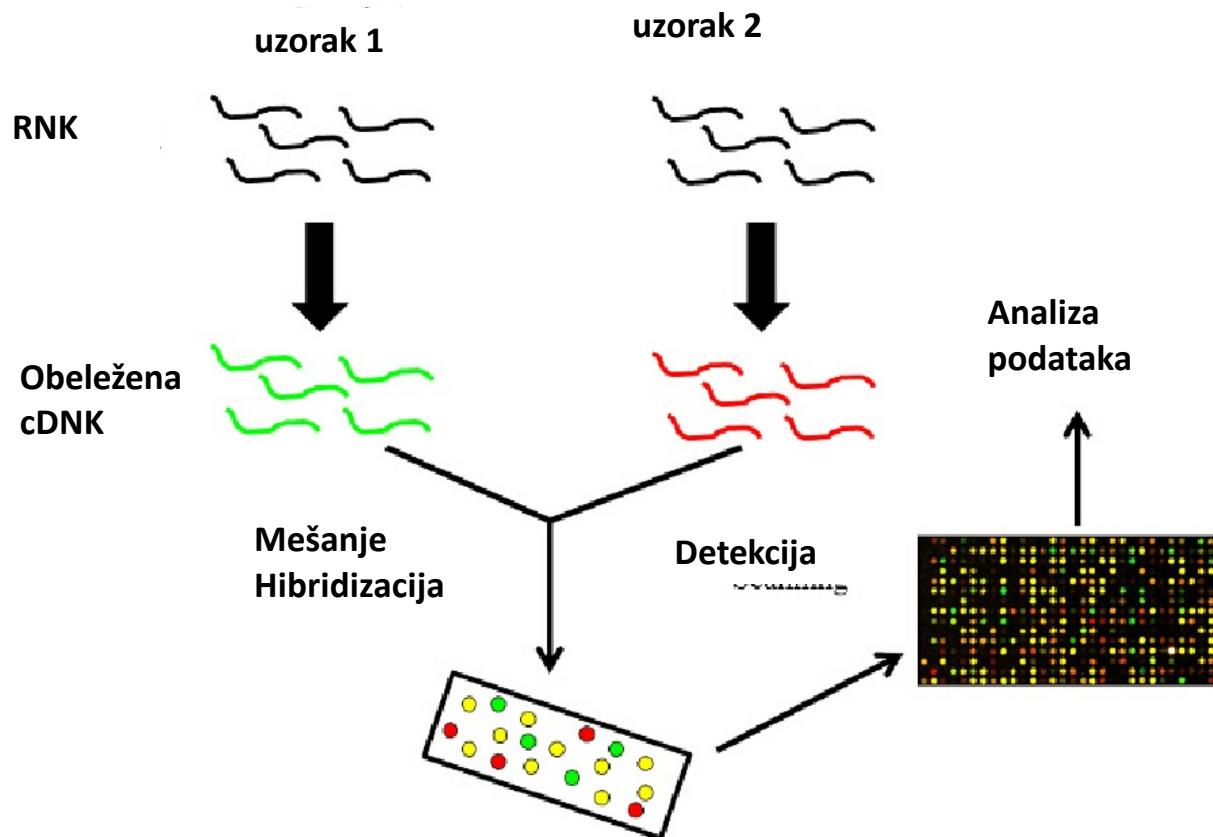
- Apsolutna kvantifikacija!
- Nema pravljenja St krive i korišćenja standarda!
- Detekcija: opseg linearnosti od 1-100.000 kopija!
- Inhibitori nemaju uticaj kao kod Real-time PCR-a!
- U kliničkim uzorcima- veća preciznost i dijagnostička korist!
- Posebno pogodno za uzorke sa niskim koncentracijama ciljnih sekvenci, kao što su serum i plazma!



# Metode za kvantifikaciju mikroRNK

## Microarray- specifična hibridizacija

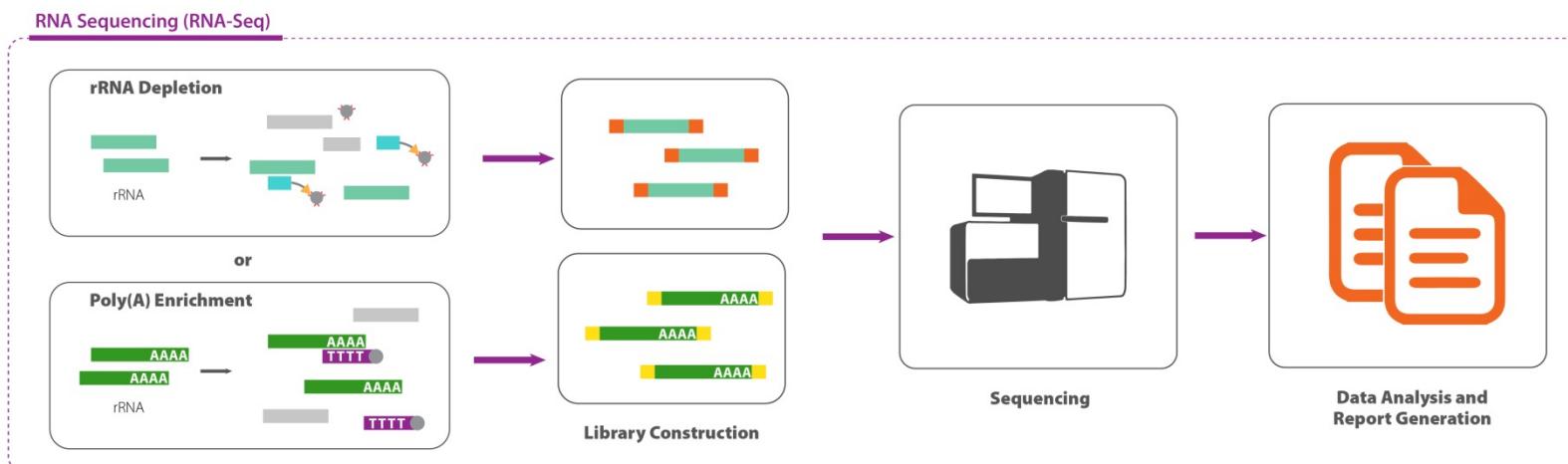
- veliki broj ciljnih sekvenci u isto vreme, ali loša osetljivost, preciznost i loša reproducibilnost
- problematično poređenje rezultata između različitih platformi



# Metode za kvantifikaciju mikroRNK

## Metode sekvencioniranja nove generacije:

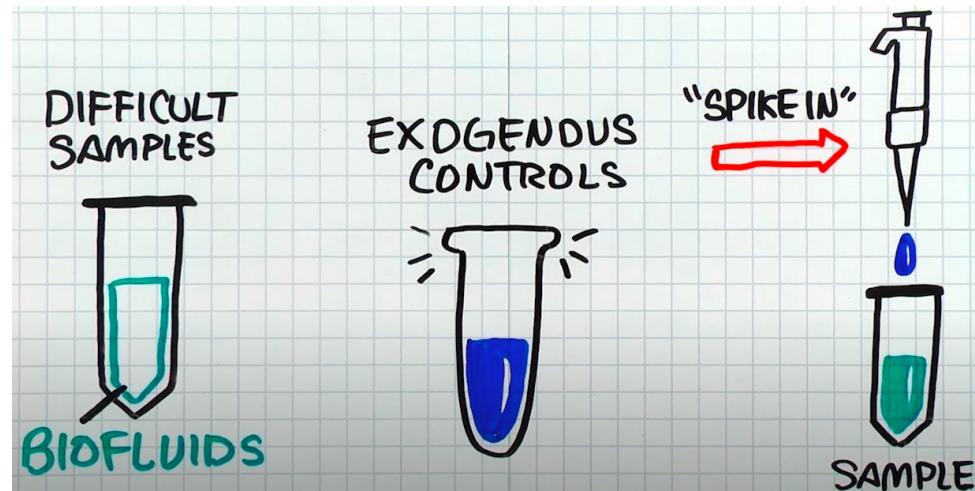
- odlične, otkrivanje novih miRNK, izoformi miRNK, ali velika količina RNK neophodna, čak 1 µg!
- problematično za uzorke kao što su serum/plazma
- novi protokoli sa malom količinom materijala, 5 ng, ali zahtevaju validaciju za svaku vrstu uzorka
- priprema biblioteke



# Analiza podataka

## Normalizacija:

- koristi se da bi se izbegla greška nastala pri izolaciji uzroka, reakcijama reverzne transkripcije
- endogene kontrole:  
*housekeeping geni*: problem za serum/plazmu
- egzogene kontrole: spike in, c. elegans 39-3p
- nema konsenzusa oko toga koje kontrole koristiti i koliko ih je dovoljno



[https://www.youtube.com/watch?v=pSBG4c79Y\\_U](https://www.youtube.com/watch?v=pSBG4c79Y_U)

## *Ongoing projects*

COST Action: CA21153 - Network for implementing multiomics approaches in atherosclerotic cardiovascular disease prevention and research (AtheroNET)

WG3: Standardization and harmonization of research

HORIZON-MSCA-2021-SE-01-01 - MSCA

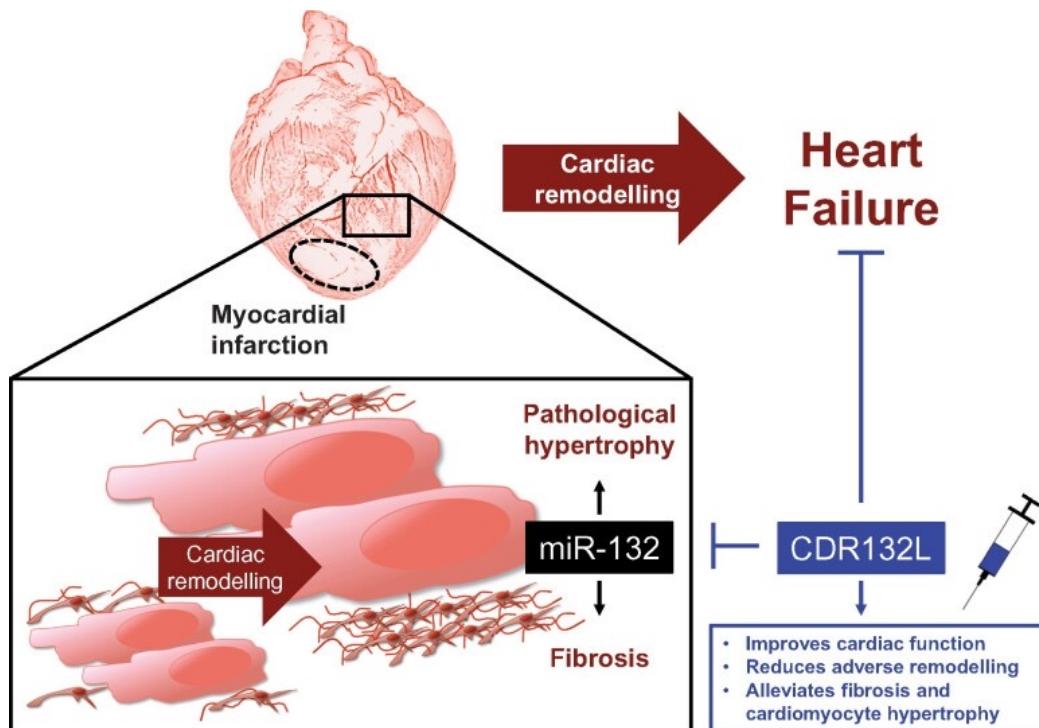
Staff Exchanges 2021

CardioSCOPE: Comprehensive and personalized assessment of acute coronary syndrome by multiomic approach and artificial intelligence strategy; WP4

# Razvoj lekova na bazi miRNA

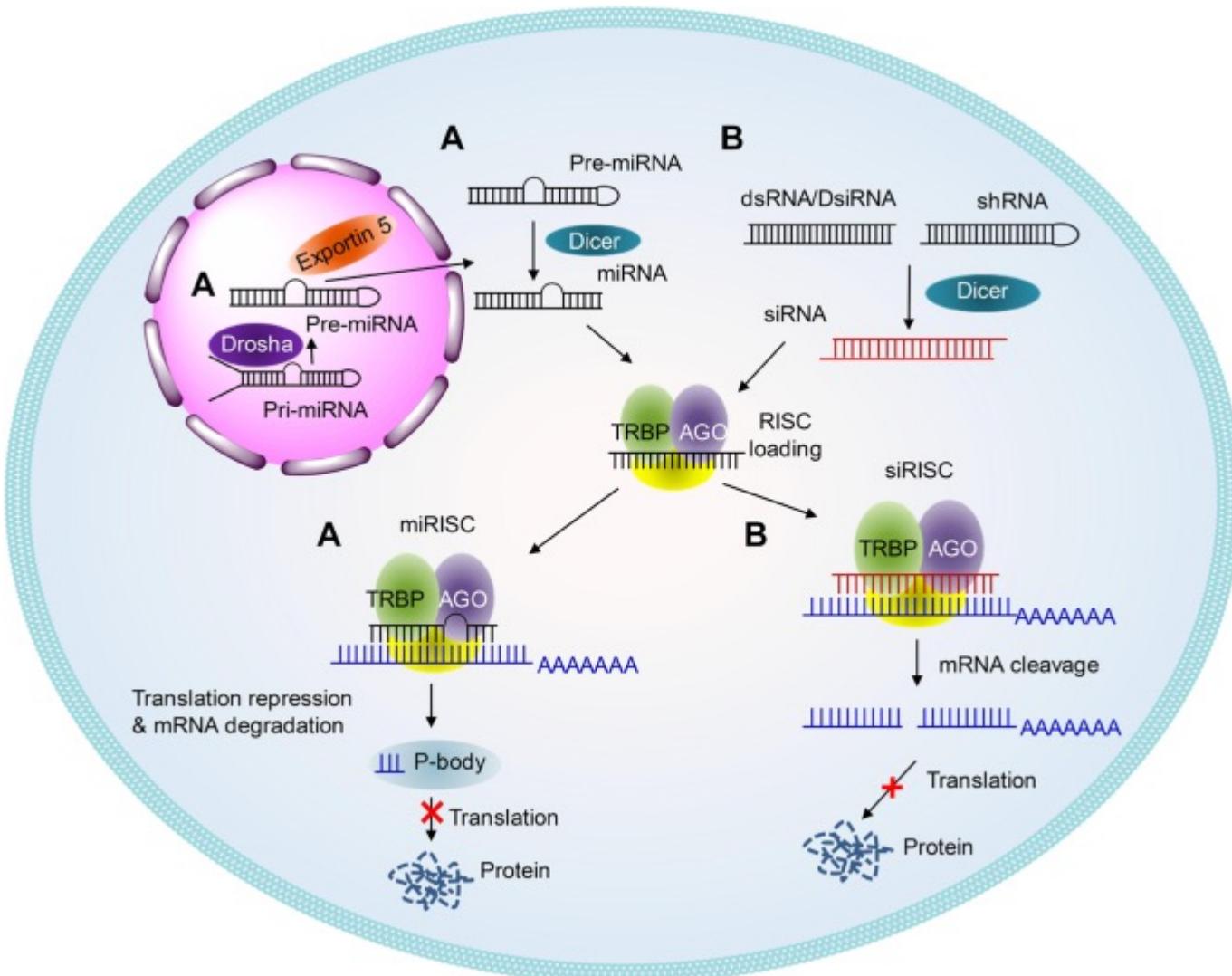
microRNA modulatori:

CDR132: oligonucleotide-based lock nucleic acid miR-132-3p inhibitor



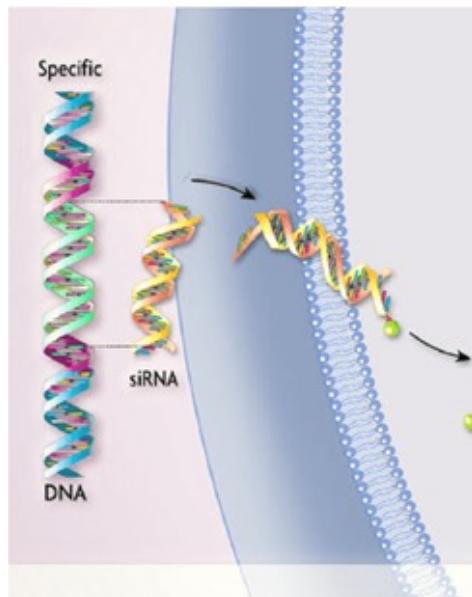
MIR-132 PCR KIT  
USED IN ONGOING  
HF-REVERT PHASE 2  
CLINICAL STUDY

# RNA interferencija, miRNAs vs. male interferirajuće RNA



# Terapija male interferirajuće RNK- small interfering RNA, siRNA

- ONPATTRO® (patisiran), GIVLAARI® (givosiran), OXLUMO® (lumasiran), Alnylam® Pharmaceuticals
- LEQVIO® Inclisiran, Novartis ®, Alnylam® Pharmaceuticals

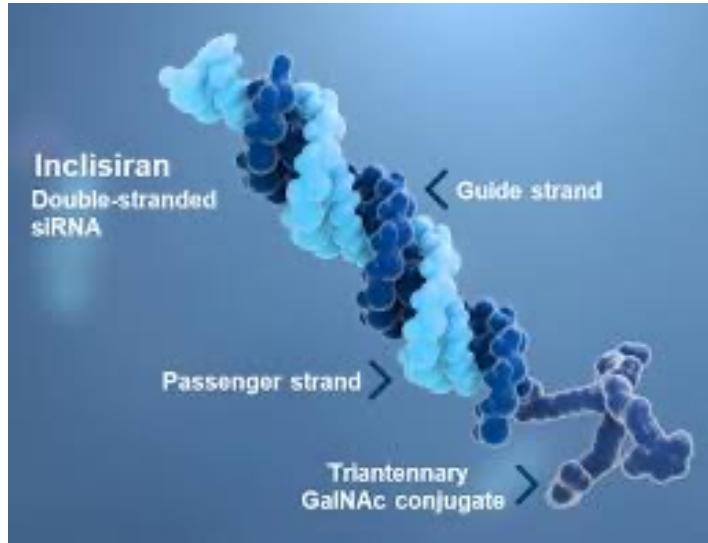


## FDA APPROVES FIRST RNA-BASED THERAPEUTIC



Patisiran is the first clinical treatment for polyneuropathy of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis in adult patients.

# LEQVIO® Inclisiran



*N-acetylgalactosamine  
(GalNAc)-conjugated  
siRNAs*

Vizuje se za iRNK  
PCSK9 i dovodi do  
degradacije iRNK  
Smanjenje  
koncentracije LDL-  
holesterola



- heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH)
- clinical atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD)

