BMD is most often described as a T-score or Z-score, both of which are units of standard deviation (SD). The Z-score describes the number of SDs by which the BMD in an individual differs from the mean value expected for age and sex. The T-score describes the number of SDs by which the BMD in an individual differs from the mean value expected in young healthy individuals.

The operational definition of osteoporosis is based on the T-score for BMD assessed at the femoral neck and is defined as a value for BMD 2.5 SD or more below the young female adult mean (T-score less than or equal to -2.5 SD).

The recommended reference range for calculating the T-score is the NHANES III reference database for femoral neck measurements in women aged 20-29 years. Note that the diagnostic criteria for men use the same female reference range as that for women. This arises fortuitously because for any age and BMD at the femoral neck, the risk of hip fracture or a major osteoporotic fracture is about the same in men and women. However, the T-score cannot be used interchangeably with different techniques and at different sites, since the prevalence of osteoporosis and proportion of individuals allocated to any diagnostic category would vary, as does the risk of fracture.

Because a variety of non-skeletal factors contributes to fracture risk, the diagnosis of osteoporosis by the use of BMD measurements is at the same time an assessment of a risk factor for the clinical outcome of fracture. For these reasons there is a distinction to be made between the use of BMD for diagnosis and for risk assessment. Since BMD forms but one component of fracture risk, accurate assessment of fracture risk should take into account other readily measured indices of fracture risk that add information to that provided by BMD.

A large number of additional risk factors for fracture have been identified. For the purposes of risk assessment, interest lies in those factors that contribute significantly to fracture risk over and above that provided by bone mineral density measurements or age. A caveat is that some risk factors are not amenable to particular treatments, so that the relationship between absolute probability of fracture

and reversible risk is important. Liability to falls is an appropriate example where the risk of fracture is high, but treatment with agents affecting bone metabolism may (arguably) have little effect on risk.

The FRAX algorithms, developed by the WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases at Sheffield, integrate the weight of clinical risk factors for fracture risk, with or without information on BMD, and have been developed by the WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases at Sheffield, UK. The risk factors comprise age, sex, low body mass index, previous fragility fracture, parental history of hip fracture, glucocorticoid treatment, current smoking, alcohol intake 3 or more units daily, rheumatoid arthritis and other secondary causes of osteoporosis. The output of FRAX is the 10-year probability of a major osteoporotic fracture and hip fracture.

The use of clinical risk factors in conjunction with BMD and age improves sensitivity of fracture prediction without adverse effects on specificity. The performance of FRAX is enhanced by the use of BMD tests, but FRAX without BMD has a predictive value for fractures that is comparable to the use of BMD alone. The availability and access to densitometry in many countries is low, so that a major advantage of FRAX is the ability to assess fracture risk where BMD is unavailable.

Fracture probability varies markedly in different regions of the world. Thus, the FRAX models need to be calibrated to those countries where the epidemiology of fracture and death is known. Models are currently available for 58 countries across the world, including Russia.

The question arises how to use FRAX to determine who should be targeted for treatment (i.e. to determine an intervention threshold). The most common approach is to recommend treatment in women with a prior fragility fracture and to reserve the use of FRAX to those without a prior fracture. If a prior fracture is an indication for treatment, then women (without fracture) but a fracture probability that is equivalent or higher also merit treatment. Such age-specific thresholds have been now adopted in more than 20 countries.

ОТ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ К ДИАГНОСТИКЕ ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ МИКРОРНК

MATTHIAS HACKL^{1,2}, SYLIVA WEILNER^{1,2}, URSULA HEILMAYER³, SUSANNA SKALICKY², FABIAN SCHRÖDER⁴, ELISABETH SCHRAML¹, KLEMENS VIERLINGER⁴, THOMAS LINK³, AND JOHANNES GRILLARI^{1,2}

¹ Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria

² TAmRNA GmbH, Vienna, Austria

³ Musculoskeletal Quantitative Imaging Research Group, Department of Radiology & Biomedical Imaging, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA

⁴ Department of Molecular Diagnostics, Austrian Institute of Technology, AIT, Vienna, Austria

Повреждение клеток и тканей – одна из «визитных карточек» и ведущих факторов старения и возраст-ассоциированных заболеваний [4]. Для противостояния этому функциональному спаду существуют различные системы репарации на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. Одной из систем тканевого уровня является свойство зрелых стволовых клеток к самообновлению и дифференцировке, что необходимо для гомеостаза и регенерации органов и тканей [6]. Однако не

только функциональность стволовых клеток снижается с возрастом, но и системное окружение в организме пожилых негативно воздействует на них: либо за счет циркулирующих факторов, подавляющих функции стволовых клеток, либо в связи с отсутствием факторов, необходимых для их поддержки [5]. Одна из тканей заметно подверженная низкому дифференцировочному резерву стволовых клеток – костная ткань, что ведёт к замедлению восстановления или низкотравматичным переломам [7].

В этом докладе мы сообщаем о циркулирующих микровезикулах, влияющих на резерв остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в зависимости от возраста донора. Во время поиска факторов, регулирующих ингибирующий эффект микровезикул на остеогенез, мы определили несколько миРНК и белков, являющихся ключевыми компонентами. Далее мы продемонстрировали, что эти факторы присутствуют в повышенном количестве в плазме у пожилых и у пациентов с остеопоротическими переломами. В качестве потенциального источника их секреции мы определили стареющие эндотелиальные клетки, количество которых, как известно, увеличивается при старении *in vivo* [1]. Наши исследования показывают, что стареющие эндотелиальные клетки секретируют повышенное количество миРНК-31 внутри внеклеточных везикул, которые захватываются мезенхимальными стволовыми клетками и, в свою очередь, подавляют остеогенную дифференцировку [9]. Секреция промотора остеогенеза Galectin-3 снижена в везикулах стареющих эндотелиальных клеток, что согласуется с данными, описанными выше [8].

Эти данные в сочетании с растущим количеством информации о том, что миРНК действительно влияют на ключевые регуляторы функций остеобластов и остеокластов [2,3], явились для нас стимулом более широко рассмотреть различия в циркулирующих миРНК у пациентов с недавними остеопоротическими переломами [10], и у пациентов с большими остеопоротическими переломами. В этих группах мы определили отличия в 4 миРНК с более достоверной предсказательной возможностью, чем золотой стандарт, измерение МПК по DXA. (Heilmeier et al. in revision). Для того чтобы определить, играют ли эти миРНК роль в костной биологии, мы протестировали их на предмет изменения остеогенной дифференцировки, и некоторые из них продемонстрировали влияние на этот процесс.

Проводимые нами до настоящего времени эксперименты позволяют предположить, что циркулирующие миРНК в сыворотке у пожилых пациентов могут играть роль в патогенезе возраст-ассоциированном нарушении формирования кости. Они также могут быть ценными биомаркерами для старения и для системного окружения, для которого применение клеточных технологий ограничено, а остеогенез является лимитирующим фактором.

From replicative senescence to microRNA based diagnostics of age-associated diseases.

Damage to cells and tissues is one of the hallmarks and driving forces of aging and age-related diseases [4]. To counteract this functional decline, various repair systems are in place at the molecular, cellular as well as tissue level. One of these systems at the tissue level, is the characteristics of adult stem cells to self-renew and to differentiate, which is an essential functionality for homeostasis and regeneration of tissues and organs (6). However, not only the functionality of stem cells declines with age, but also the systemic environment of the elderly negatively impacts on them, either by circulating factors that inhibit stem cell functions, or by the absence of factors needed to support it (5). One tissue notably affected by the reduced differentiation capacity of stem cells with age is the bone, leading to slow bone healing or low trauma bone fractures [7].

Here, we report that circulating microvesicles impact on the osteogenic differentiation capacity of mesenchymal stem cells in a donor-age dependent way. While searching for factors mediating the inhibitory effect of microvesicles on osteogenesis, we identified several miRNAs and proteins as crucial components. Furthermore, we demonstrate that these factors are present at elevated levels in the plasma of

elderly, and of osteoporotic fracture patients. As a potential source of its secretion, senescent endothelial cells, known to increase during aging *in vivo* [1], were identified. We demonstrate that senescent endothelial cells secrete elevated levels of miR-31 within extracellular vesicles which are taken up by mesenchymal stem cells where they inhibits osteogenic differentiation [9]. In synergy with this, the secretion of osteogenic promoting Galectin-3 is diminished in senescent endothelial cell vesicles [8].

These results together with the increasing knowledge, that miRNAs do impact on key regulators of osteoblast and osteoclast biology [2,3] prompted us to look more broadly at miRNAs differentially circulating in recent osteoporotic fracture patients [10], as well as in prevalent osteoporotic fractures, where, indeed, we identified a signature of 4 miRNAs with predictive power superior to the gold standard of DXA measurements (Heilmeier et al. in revision). In order to test, if these miRNAs also play a role in bone biology, we tested them for modulation of osteogenic differentiation, which several of these did indeed influence.

Our experiments performed since, allow us to suggest that circulating miRNAs in the serum of elderly might indeed play a role in the pathogenesis of age related impaired bone formation. They may also be a valuable plasma-based biomarker for aging and for a systemic environment that does not favour cell based therapies, whenever osteogenesis is a limiting factor.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erusalimsky JD & Kurz DJ (2006) Endothelial cell senescence. *Handb Exp Pharmacol*, 213–248. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17001772.
2. Jing D, Hao J, Shen Y, Tang G, Li M-L, Huang S-H & Zhao Z-H (2015) The role of microRNAs in bone remodeling. *J Oral Sci* 7, 131–143. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2015.22> [Accessed July 10, 2014].
3. Lian JB, Stein GS, Wijnen AJ Van, Stein JL, Hassan MQ & Gaur T (2012) MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 212–227. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.234>.
4. López-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M & Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3836174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 10, 2014].
5. Rando TA (2006) Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 441, 1080–1086. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16810243.
6. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B & Kucia M (2007) Bone-marrow-derived stem cells—our key to longevity? *J Appl Genet* 48, 307–319. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17998587.
7. Weilner S, Grillari-Voglauer R, Redl H, Grillari J & Nau T (2015) The role of microRNAs in cellular senescence and age-related conditions of cartilage and bone. *Acta Orthop.* 86, 92–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4366666&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 26, 2016].
8. Weilner S, Keider V, Winter M, Harreither E, Salzer B, Weiss F, Schraml E, Messner P, Pietschmann P, Hildner F, Gabriel C, Redl H, Grillari-Voglauer R & Grillari J (2016) Vesicular Galectin-3 levels decrease with donor age and contribute to the reduced osteo-inductive potential of human plasma derived extracellular vesicles. *Aging (Albany, NY)*. 8, 16–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26752347> [Accessed March 7, 2016].

9. Weilner S, Schraml E, Wieser M, Messner P, Schneider K, Wassermann K, Micutkova L, Fortschegger K, Maier AB, Westendorp R, Resch H, Wolbank S, Redl H, Jansen-Dürr P, Pietschmann P, Grillari-Voglauer R & Grillari J (2016) Secreted microvesicular miR-31 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Aging Cell*, 1–11. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/ace.12484>.

10. Weilner S, Skalicky S, Salzer B, Keider V, Wagner M, Hildner F, Gabriel C, Dovjak P, Pietschmann P, Grillari-Voglauer R, Grillari J & Hackl M (2015) Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* 79, 43–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026730> [Accessed February 16, 2016].

МикроРНК: ОТ БИОЛОГИИ К КЛИНИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ

LARISA NONN, PH.D.

*Department of Pathology University of Illinois at Chicago
Chicago, IL USA*

С момента открытия микроРНК (миРНК) в клетках млекопитающих [1] они стали изучаться не только в качестве регуляторов экспрессии белков, но и как перспективные ранние биомаркеры заболеваний и потенциальные мишени для разработки лекарственных средств. МиРНК являются короткими (18–22 нуклеотидов) некодирующими РНК, которые транскрибируются из собственных генов, либо из кодирующих генов или интронов. Транскрипция МиРНК начинается с образования длинной молекулы первичной микроРНК (pri-миРНК), из которой посредством ферментов Drosha и DGR8 в ядре образуется шпильчатая структура – предшественник микроРНК (pre-миРНК). После транспорта в цитозоль пре-миРНК разрезается ферментом Dicer1, с образованием одноцепочечных зрелых микроРНК. Наиболее хорошо изученным механизмом действия зрелой миРНК является РНК-интерференция (RNAi): миРНК связывается с 3' нетранслируемой областью матричной РНК (мРНК), подавляя трансляцию и/или снижая ее стабильность [2]. Механизм РНК-интерференции также может осуществляться путём связывания миРНК с кодирующим регионом мРНК [3]. Взаимодействие миРНК с их мишенями осуществляется путем связывания последовательностей из 6-8 нуклеотидов и ассоциации с РНК-индуцируемым сайленсинг-комплексом (RISC), который включает белок Argonaut 2. Также, помимо РНК-интерференции, были открыты другие функции миРНК в клетках млекопитающих. Например, связывание миРНК с 3' нетранслируемой областью мРНК может увеличивать трансляцию белка [4]. Также существуют данные о том, что миРНК могут проникать в ядро и путем взаимодействия с ДНК регулировать экспрессию генов [5, 6].

МиРНК могут использоваться как ранние биомаркеры различных заболеваний, так как они стабильны и устойчивы при задержках обработки материала [7, 8]. МиРНК присутствуют в сыворотке/плазме, внутри экзосом и/или связаны с белками семейства Argonaut. Мы вступили в эру широкого анализа экспрессии миРНК, что позволяет определять маркеры заболеваний. Существуют различия в опубликованных результатах по профилям экспрессии миРНК при различных состояниях, что обусловлено различиями в подготовке материала, РНК изоляции и оценке экспрессии миРНК. В настоящее время в клиническом использовании существует одна панель 64 миРНК для идентификации метастазов неизвестной природы [9].

Различная экспрессия миРНК была показана для многих заболеваний. МиРНК часто имеют биологическую функцию в фенотипах заболевания. Поэтому, миРНК – цели для разработки лекарственных средств: миРНК ми-

метиков, анти-миРНК (ингибиторов) или miR sponge (ингибиторы) [10]. Пока в клинической практике существует один препарат антимиРНК, ингибирующий активность миРНК-122 в печени у пациентов с гепатитом С [11]. МиРНК-122 экспрессируется только в печени и необходима для репликации вируса гепатита С. Пациенты, получавшие лечение анти-миРНК-122, имеют стойкое снижение вирусной нагрузки.

Исследования в нашей лаборатории фокусируются на миРНК в предстательной железе. Мы определили подавляющие опухоли миРНК, регулируемые витамином D, в эпителиальных клетках простаты и в эпителии простаты, полученном путём лазерной микродиссекции, у пациентов из клинического исследования витамина D [12]. Также мы определили панель миРНК в сыворотке у пациентов с раком простаты, которая прогнозирует отсутствие агрессивности заболевания [13].

В заключение следует отметить, что в изучении миРНК происходит интересный период: области знаний фундаментальной биологии и клинического применения быстро расширяются. Вероятно, проводимые в настоящее время исследования только начинают открывать истинные биологические функции микроРНК.

MicroRNAs: from biology to clinical implementation.

Since their discovery in mammalian cells [1], microRNAs (miRs) have emerged not only as regulators of protein expression, but also as attractive biomarkers for disease and potential therapeutic targets. miRs are short (18-22 bp) non-coding RNAs that are transcribed by their own genes or can exist within coding genes or introns. miRs are transcribed as a long pri-microRNA (pri-mir) that is processed into a pre-microRNA (pre-mir) hairpin structure by Drosha and DGR8 within the nucleus. After export to the cytosol, the pre-mir is further processed into single stranded mature miRs by Dicer1. The most well-understood mechanism for the mature miR function is that of RNA-interference (RNAi), in which the miRs bind to the 3'UTR of mRNAs to suppress protein translation and/or reduce the mRNA stability [2]. This RNAi mechanism can also occur from miR binding within the coding region of the mRNA [3]. miR interaction with their targets is via imperfect binding of a 6-8 bp seed sequence and association with the RNA-induced Silencing Complex (RISC) which includes Argonaut 2. In addition to RNAi, other functions of miRs in mammalian cells have been discovered. For example, binding of miRs to the 3'UTR of an mRNA can increase protein translation [4]. There is also evidence that miRs can enter the nucleus and interact with DNA to regulate gene expression [5, 6].

miRs are attractive biomarkers of disease because they are stable and resistant delays in sample processing [7, 8].