Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Mirna Tomašković

Analiza izraženosti miRNA-146a i miRNA let-7b u slini djece s cerebralnom paralizom

Doktorski rad

Ocjena rada u tijeku

Osijek, 2025.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Doktorski rad**
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

ANALIZA IZRAŽENOSTI MIRNA-146A I MIRNA LET-7B U SLINI DJECE S CEREBRALNOM PARALIZOM

Mirna Tomašković

Doktorski rad je izrađen u: Specijalnoj bolnici za zaštitu djece s neurorazvojnim i motoričkim smetnjama u Zagrebu i na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor/i: Izv.prof.dr.sc. Silva Katušić
Doc. dr. sc. Monika Ulamec

Kratki sažetak doktorskog rada:
Cerebralna paraliza (CP) je grupa neprogresivnih, promjenjivih motoričkih poremećaja, a postavljanje dijagnoze CP-a je zahtjevno i prethodi mu duži period kliničkog praćenja. miRNA-146a i let-7b se izlučuju u slini, a zbog svoje uloge u neuroinflamaciji i neurodegeneraciji analizirana je njihova izraženost u slini djece s CP-om i slini djece urednog motoričkog razvoja. Ovo istraživanje je pokazalo da se ispitivane skupine ne razlikuju po izraženosti odabranih miRNA već po količini ukupne RNA te ovaj parametar ima dijagnostički potencijal.

Broj stranica: 82
Broj slika: 19
Broj tablica: 23
Broj literaturnih navoda: 126
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: cerebralna paraliza, mikro-RNA, miRNA-146a, miRNA let-7b, dijagnostički marker, slina

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:
1.
2.
3.
4. (zamjena)

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb;Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ocjena rada u tijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **PhD thesis**
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: biology, basic medical sciences

ANALYSIS OF EXPRESSION OF MIRNA-146A AND MIRNA LET-7B IN SALIVA OF CHILDREN WITH CEREBRAL PALSY

Mirna Tomašković

Thesis performed at: Special Hospital for Children with Neuro-developmental and Movement Disorders, Zagreb and Department of Biology, School of Medicine, University of Zagreb

Supervisor/s: Assoc. Prof. Silva Katušić
Assist. Prof. Monika Ulamec

Short abstract:
Cerebral palsy (CP) is a group of non-progressive, variable motor disorders, and diagnosing CP is challenging, requiring a prolonged period of clinical monitoring. miRNA-146a and let-7b are secreted in saliva, and due to their role in neuroinflammation and neurodegeneration, their expression was analyzed in the saliva of children with CP and children with normal motor development. This research showed that the examined groups do not differ in the expression of the selected miRNAs, but rather in the total RNA quantity, and this parameter has diagnostic potential.

Number of pages: 82
Number of figures: 19
Number of tables: 23
Number of references: 126
Original in: Croatian
Key words: cerebral palsy, microRNA, miRNA-146a, miRNA let-7b, diagnostic marker, saliva

Date of the thesis defense:

Reviewers:
1.
2.
3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Original rada u tijeku

Ocjena rada u tijeku

Ovaj doktorski rad izrađen je u Specijalnoj bolnici za zaštitu djece s neurorazvojnim i motoričkim smetnjama, Zagreb i na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Silve Katušić Hećimović i doc. dr. sc. Monike Ulamec.

Sadržaj

1.UVOD 1
1.1 Cerebralna paraliza 1
1.1.1 Epidemiologija CP-a 1
1.1.2 Etiopatogeneza CP-a 2
1.1.3 Klinička slika CP-a i klasifikacija 3
1.1.4 Dijagnoza CP-a 10
1.1.5 Liječenje CP-a 13
1.2 MikroRNA 14
1.2.1 MiRNA u središnjem živčanom sustavu 15
1.2.2 Ekstracelularne miRNA 17
1.2.3 Slina 18
1.2.4 MiRNA u slini 19
1.2.5 MiRNA-146a 21
1.2.6 MiRNA let-7b 23
1.2.7 MiRNA 146a i miRNA let-7b kao potencijalni biomarkeri 24
2.1 Hipoteza 26
2.2 Očekivani znanstveni doprinos 26
3. MATERIJALI I METODE 27
3.1 Dizajn istraživanja 27
3.2 Ispitanici 27
3.3 Biološki materijal 28
3.3.1 Prikupljanje i pohrana uzoraka sline 28
3.3.2 Izolacija RNA iz sline 28
3.3.3 Kvantifikacija miRNA u slini 29
3.4 Statistička obrada podataka 31
4. REZULTATI 32

Ocjena rada u tijeku

4.1 Opća i klinička obilježja ispitanika 32
4.2 Ukupna RNA 33
4.2.1 Koncentracija ukupne RNA u slini istraživanih skupina 33
4.2.2 Koncentracija ukupne RNA prema stupnju motoričke disfunkcije 34
4.2.3 Koncentracija ukupne RNA u slini ispitanika s CP-om prema zahvaćenosti tijela 35
4.2.4 Koncentracija ukupne RNA prema spolu 36
4.2.5 Koncentracija ukupne RNA prema ostalim značajkama ispitanika 37
4.2.6 ROC analiza dijagnostičke značajnosti koncentracije RNA u slini 38
4.3 MiRNA-146a 40
4.3.1 Izraženost miRNA-146a u slini istraživanih skupina 40
4.3.2 Izraženost miRNA-146a u slini prema stupnju motoričke disfunkcije 40
4.3.3 Izraženost miRNA-146a u slini ispitanika s CP prema zahvaćenosti tijela 41
4.3.4 Izraženost miRNA-146a u slini prema spolu 42
4.3.5 Izraženost miRNA-146a prema ostalim značajkama ispitanika 43
4.3.6 ROC analiza dijagnostičke značajnosti miRNA-146a u slini 45
4.4 MiRNA let-7b 45
4.4.1 Izraženost miRNA let-7b u slini istraživanih skupina 45
4.4.2 Izraženost miRNA let-7b u slini prema stupnju motoričke disfunkcije 46
4.4.3 Izraženost miRNA let-7b u slini ispitanika s CP-om prema zahvaćenosti tijela. 47
4.4.4 Izraženost miRNA let-7b u slini prema spolu 48
4.4.5 Izraženost miRNA let-7b prema ostalim značajkama ispitanika 49
4.4.6 ROC analiza dijagnostičke značajnosti miRNA let-7b u slini 50
4.5 Kombiniranje markera za bolju razlučivost 52
5. RASPRAVA 53
5.1 Slina kao dijagnostički medij 54
5.2 Koncentracija ukupne RNA u slini 55

Ocjena rada u tijeku

5.3 MiRNA kao potencijalni biomarkeri CP-a 57
5.4 MiRNA -146a 58
5.5 MiRNA let-7b 61
5.6 RNA i miRNA kao biomarkeri CP-a 62
5.7 Nedostatci ovog istraživanja i preporuke za buduća istraživanja 63
5.8 Prednosti istraživanja 65
7. LITERATURA 67
8. SAŽETAK 77
9. SUMMARY 78
10. PRILOZI 79
10.1 Popis kratica 79
11. ŽIVOTOPIS 81

Ocjena rada u tijeku

1.UVOD

1.1 Cerebralna paraliza

Cerebralna paraliza (CP) klinički je entitet koji obuhvaća skupinu neprogresivnih, no često promjenjivih poremećaja pokreta i/ili držanja tijela i motoričke funkcije uzrokovanih razvojnim poremećajem ili oštećenjem mozga u ranom stadiju razvoja (*1*). Kliničko očitovanje posljedično oštećenju mozga u razvoju je trajno i neprogresivno, no često, tijekom vremena, promjenjivog karaktera.

Bolest je poznata i pod nazivom Littleova bolest prema engleskom ortopedu Williamu Johnu Littleu koji ju je prvi puta opisao 1843. godine navodeći da se u okviru bolesti javlja mišićna spastičnost posljedično oštećenju mozga nastalom u ranom stadiju razvoja mozga, prijevremenom porodu ili porođajnoj asfiksiji. Istraživanju bolesti doprinijeli su brojni znanstvenici kao što su Osler, Sach, Peterson, Freud, MacKeith, Polani i mnogi drugi.

Zbog potrebe jasnijeg definiranja i opisa bolesti 2004. godine održana je međunarodna radionica pod nazivom „Definicija i klasifikacija cerebralne paralize“ u Bethesdi (Maryland, SAD) podržana od nekoliko udruženja (United Cerebral Paly Research, Educational Foundation, Castang Foundation, National Institute of Helth/ National Institute of Neurological Disorders and Stroke i Dana Foundation). Tijekom radionice dogovoreno je da je u okviru dijagnoze CP-a potrebno naglasiti motorički poremećaj uz dodatno postojanje teškoća koje prate motoričke smetnje. Posljedično ovoj međunarodnoj radionici izvršni odbor stručnjaka iz područja neuropedijatrije, ginekologije i neuroepidemiologije (Peter Rosenbaum, Nigel Paneth, Alan Leviton, Murray Goldstein i Marin Bax 2006. je definiraoCP kao grupu trajnih razvojnih poremećaja kretanja i držanja tijela što uzrokuje ograničenje aktivnosti, a posljedica je oštećenja nastalih u ranom stadiju razvoja mozga (*2*).

CP je najčešći uzrok težih neuromotornih odstupanja kod djece i veliko je opterećenje za dijete, obitelj, zdravstvene i obrazovne ustanove te cjelokupnu društvenu zajednicu (*3*).

1.1.1 Epidemiologija CP-a

Prosječna indicdeCP se javlja u 2-3 na 1000 živorođene djece (*1*). Učestalost CP-a relativno je nepromijenjena tijekom desetljeća. Prevalencija CP-a imala je uzlazni trend do 1990. zbog boljeg preživljavanja prijevremeno rođene djece. Posljedično poboljšanju perinatalne skrbi, od 1990. godine do 2003. godine prevalencija ostaje ista i kreće se između 2,2 i 2,3.

Ocjena rada u tijeku

Europska mreža registara djece s cerebralnom paralizom (engl. *Surveillance of Cerebral Palsy in Europe,* SCPE) postoji od 1998. godine, a uključuje suradnju stručnjaka i istraživača koji rade s registrima cerebralne paralize (CP), okupljajući pedijatre, pedijatrijske neurologe, epidemiologe i terapeute iz cijele Europe. Rezultat suradnje unutar SCPE je zajednička baza podataka o prevalenciji CP-a u Europi. SCPE djeluje u 31 centru u 18 zemalja Europe, a hrvatski registar SCPE-a uvršten je kao Centar 28 – C 28 RCP-HR. CP registri uključuju baze podataka o prevalenciji CP-a, funkcionalnu klasifikaciju CP-a, podatke o paritetu majke, perinatalnim parametrima, oštećenju grubih i finih motoričkih funkcija, oštećenju vida i sluha, epilepsiji te zahvaćenosti govora. Od 2015. godine prikupljaju se podatci o slikovnom prikazu mozga (ultrasonografija (UZV), magnetska rezonanca (MR)). Prevalencija CP-a prema Hrvatskom SCPE registru iznosi 2.19/1000 (*4*). Incidencija CP-a stabilna je u brojnim svjetskim epidemiološkim istraživanjima, no postupci tijekom zbrinjavanja komplikacija povezanih s prijevremenim porodom doprinose povećanju incidencije CP-a (*5*).

U posljednjem desetljeću podatci iz literature identificiraju određene postupke i metode koji doprinose smanjenju pojavnosti bolesti.

Oko 45 % oboljelih od CP-a rođeno je prijevremeno (≤ 37 tjedana gestacije). U skupini ekstremno nedonošene djece (≤ 27 tjedana gestacije) došlo je do značajnog smanjenja učestalosti CP-a i porasta preživjelih bez oštećenja. Razlozi za navedeno su kompleksni i multifaktorijalni, a uključuju antenatalne strategije kao što su: implantacija jednog embrija u postupku izvantjelesne oplodnje, neuroprotektivna terapija magnezijevim sulfatom i kortikosteroidna terapija za poticanje sazrijevanja fetalnih pluća trudnicama s prijetnjom za prijevremeni porod, odgođeno podvezivanja pupkovine (30 do 60 sekundi po porodu) kod prijevremeno rođene djece i terapija kafeinom za apneje kod prijevremeno rođene djece.

Kod manjeg udjela djece rođene u terminu koja su pretrpjela intrapartalnu hipoksiju terapijska hipotermija izrazito je značajan neuroprotektivni postupak koji smanjuje i smrtnost i bolest (*6*).

1.1.2 Etiopatogeneza CP-a

Oštećenje mozga u razvoju prije, tijekom ili odmah nakon poroda obuhvaća i središnji živčani i mišićno-koštani sustav uzrokujući simptome kao što su: poremećaj mišićnog tonusa, promjene održavanja posture i ograničenje pokreta. Navedeno je često praćeno poremećajem senzoričkih i osjetilnih funkcija, kognitivnim teškoćama, teškoćama komunikacije i socijalne interakcije, epilepsijom i sekundarnim koštano-mišićnim oštećenjima.

Ocjena rada u tijeku

Ranije se tijekom povijesti smatralo da je za CP odgovoran nedostatak kisika tijekom samog porođaja, no recentnija istraživanja upućuju da su osim intrapartalne asfiksije i brojni drugi rizični čimbenici povezani s nastankom CP. Danas se smatra da je CP rezultat kombinacije serijskih događaja koji dovode do oštećenja mozga u periodu razvoja (*5*).

Rizični događaji povezani s CP-om zbivaju se u periodu začeća, tijekom trudnoće, perinatalnog perioda pa sve do 25. mjeseca nakon poroda. Poznati rizični čimbenici za nastanak CP-a su: genetske varijante, kongenitalne anomalije, prijevremeni porod (javlja se u 5 - 12 % svih trudnoća ovisno o populaciji), intrauterini zastoj rasta i infekcije, kernikterus hipoksična ishemija, cerebrovaksularni inzult tijekom trudnoće i neonatalnog perioda te traumatske i netraumatske ozljede mozga (*7*). Najčešći uzroci CP-a su: vaskularni poremećaji, hipoksija, infekcije i razvojni poremećaji u nezrelom mozgu i/ili mozgu u razvoju (*8*).

Brojni etiološki čimbenici mogu dovesti do oštećenja različitih dijelova mozga uzrokujući širok raspon kliničkog očitovanja CP-a. Najčešći čimbenici rizika za CP dijele se na prenatalne, perinatalne i postnatalne čimbenike i prikazani su u tablici 1.

Ocjena rada u tijeku

Tablica 1. Najčešći čimbenici rizika CP-a. (Preuzeto i prilagođeno prema *Patel DR, Neelakantan M, Pandher K, Merrick J. Transl Pediatr. 2020* (*9*) i *Sadowska M, Sarecka-Hujar B, Kopyta I.. Neuropsychiatr Dis Treat. 2020* (*1*))

Prenatalni čimbenici rizika	**Perinatalni čimbenici rizika**	**Postnatalni čimbenici rizika**
Infekcije i povišena tjelesna temperatura majke	Fetalna distocija	Hipoglikemija
Metabolički poremećaji	Prolaps pupkovine	Žutica
Intrauterine infekcije	Krvarenje prije poroda	Neonatalni meningitis
Korioamnionitis	Metabolička acidoza	Septikemija
Intoksikacija majke	Intrapartalna hipoksija	Malarija
Preeklampsija	Potpomognuta oplodnja	Malarija s konvulzijama
Trauma majke u trudnoći		Malarija s komom
Izlaganje metil-živi		Meningitis
Višeplodne trudnoće		Tuberkuloza
Itrauterini zastoj rasta		HIV
Abrupcija placente		Kongenitalne infekcije
Shizencefalija		Asfiksija
Mikrocefalija		Periventrikularna leukomalacija (PVL)
Genetski čimbenici		Hiperbilirubinemija
Rubeola		

Prva 24 tjedna gestacije period su kortikalne neurogeneze u kojem dolazi do proliferacije, migracije i organizacije najprije neuralnih prekursorskih stanica, a potom i neurona. Na navedene procese mogu utjecati genetske promjene ili stečena (viralna ili toksična) oštećenja i uzrokovati rijetke malformacije kao što su lizencefalija, nodularna heterotopija, polimikrogirija, shizencefalija i kortikalna displazija.

U drugom dijelu trudnoće odvijaju se procesi rasta i diferencijacije neurona, tj. aksonalni rast, rast dendrita, stvaranje sinapsi i mijelinizacija. Također se odvijaju i stabilizacijski procesi, uključujući apoptozu neurona, regresiju neurita, eliminaciju nepotrebnih sinapsi i specijalizaciju neurona. Navedeni procesi odvijaju se i nakon rođenja pa sve do druge godine žovota. Okolišni čimbenici kao što je hipoksija-ishemija mogu uzrokovati CP u ovom stadiju razvoja. Strukturne promjene posljedično oštećenju javljaju se predominantno u bijeloj tvari

Ocjena rada u tijeku

prijevremeno rođene novorođenčadi kao i u sivoj tvari i u jezgrama moždanog debla djece rođene u terminu i mogu se prikazati standardnim neuroslikovnim pretragama kao što su UZV i MR mozga. Štetni događaji odvijaju se u nezrelom mozgu i mogu mijenjati daljnji tijek njegovog razvoja. CP je stoga posljedica poremećaja razvojnih mehanizama.

Nedovoljna opskrba kisikom fetusa i mozga klasično se smatra glavnim uzročnim faktorom CP-a. Međutim, klinički definirana asfiksija pri porodu odgovorna je za manji broj slučajeva CP-a. U većini slučajeva CP-a uzročni faktori ne djeluju izolirano već u uzročno-posljedičnoj sinergiji. Set predisponirajućih antenatalnih faktora, akutni ili subakutni perinatalni događaji i postnatalni faktori zajedno djeluju na mozak u razvoju, utječu na procese sazrijevanja mozga i vode u CP (*10*).

Oko 92% svih slučajeva CP-a povezano je s perinatalnim razdobljem. Rizični čimbenici uključuju: prijevremeni porod, perinatalnu infekciju (osobito korioamnionitis), intrauterini zastoj u rastu, primjenu antibiotika prije rupture plodovih ovoja, acidozu ili asfiksiju i višeplodne trudnoće. Manje od 10 % slučajeva CP-a posljedica je intrapartalne asfiksije.

Postneonatalna oštećenja mozga uključuju štetne događaje u periodu nakon 28 dana života pa sve do 25 mjeseci života. U slučajeve CP-a uzrokovanog postneonatalnim oštećenjem mozga ubraja se 10 - 15 % slučajeva CP-a, a najčešći uzroci su: infekcije središnjeg živčanog sustava, vaskularni poremećaji, postnatalna traumatska oštećenja, hipoksično oštećenje mozga (gušenje, utapanje, operativni zahvati zbog prirođenih srčanih anomalija) (*11*).

CP značajno je povezana s prijevremenim porodom i niskom rodnom masom. 42-47 % svih pacijenata s CP-om prijevremeno je rođeno (*12*). Nedonoščad rođena prije navršena 32 tjedna gestacije predstavljaju samo 2 % poroda, ali čini 25 % ukupnog broja djece s CP (*13*).

Incidencija CP-a kod nedonošene novorođenčadi rodne mase ispod 1500 g 70 puta je veća nego kod novorođenčadi rodne mase iznad 2500 g (*14*).

Unatoč napretku perinatologije nije se smanjila incidencija CP-a, čak je prisutan i blagi porast incidencije zbog veće stope preživljavanja djece s izrazito niskom rodnom masom (*8*).

CP je najčešće posljedica okolišnih čimbenika koji mogu biti u interakciji s genetskom predispozicijom te mogu uzrokovati oštećenja vidljiva standardnim neuroslikovnim metodama (UZV, MR), predominantno u bijeloj tvari kod nedonošene novorođenčadi odnosno u sivoj tvari i moždanom deblu kod terminske novorođenčadi.

Ključni biokemijski čimbenici nakon smrti stanica ili oštećenja staničnih procesa uočeni u hipoksično-ishemičkim i upalnim stanjima su: pojačano stvaranje proupalnih citokina,

Ocjena rada u tijeku

oksidativni stres, promjene u ekstracelularnom matriksu, pojačano otpuštanje glutamata i smanjenje majčinog faktora rasta (*10*).

Unatoč identifikaciji brojnih rizičnih čimbenika, 80% slučajeva CP-a nema jasan uzrok i smatraju se idiopatskima (*15*).

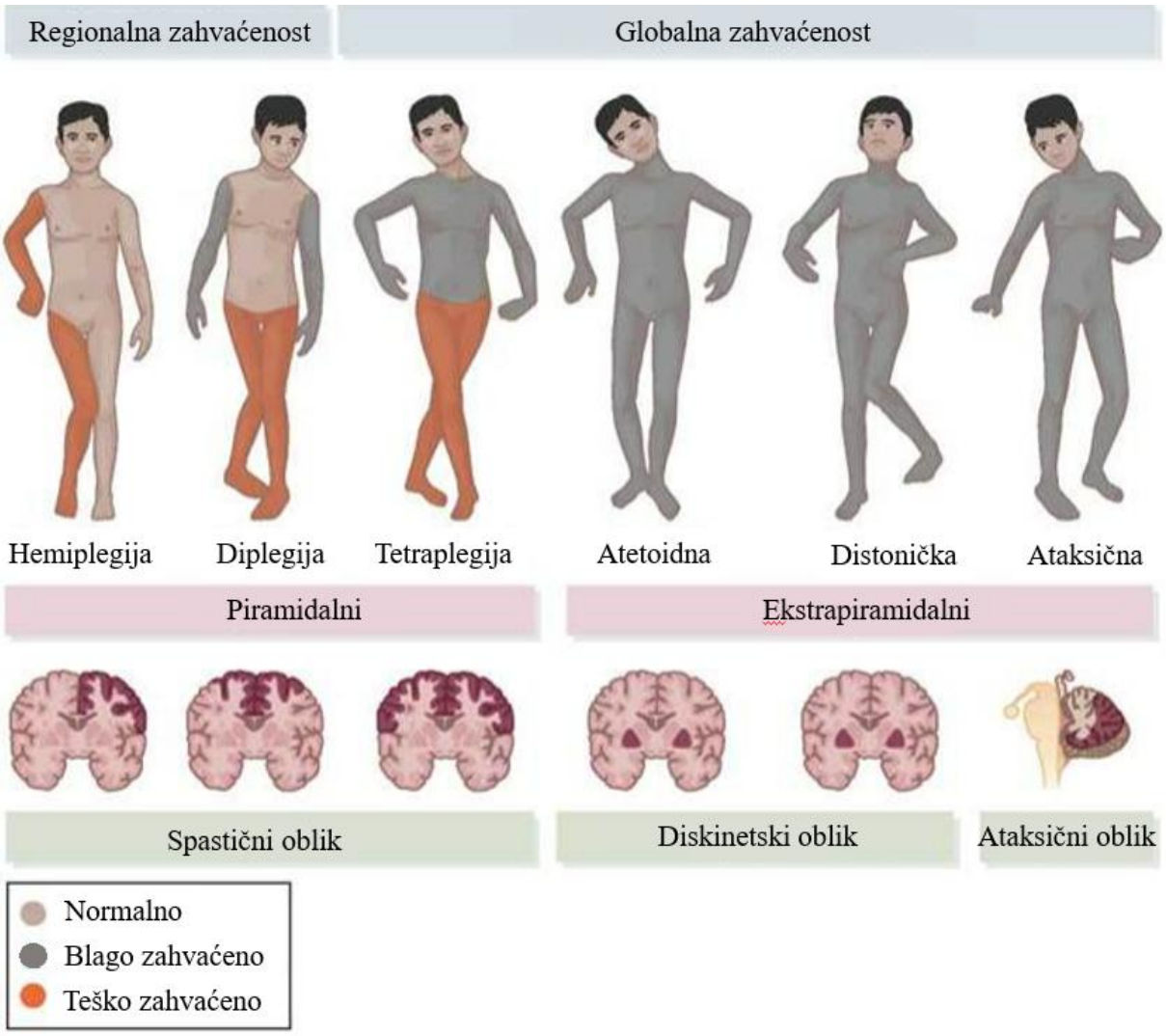
1.1.3 Klinička slika CP-a i klasifikacija

Klinička slika CP-a izrazito je varijabilna. Očituje se poremećajem kontrole i položaja tijela, poremećajem mišićnog tonusa i promijenjenom dinamikom neonatalnih refleksa. Simptomi su prisutni od rane dojenačke dobi, različiti su i promjenjivi, no najčešće je prisutno kašnjenje u usvajanju posturalnih aktivnosti i mehanizama uspravljanja.

Poremećaji pokreta koji se javljaju kod CP-a su: spastičnost, diskinezija (nekontrolirani pokreti), ataksija (slaba koordinacija i balans) ili kombinacija navedenih poremećaja.

Na osnovu kliničkog očitovanja poremećaja pokreta postoje četiri osnovna tipa CP-a: splastični, diskinetski, ataksični oblik te miješani oblik (Slika 1).

Ocjena rada u tijeku



Slika 1. Tipovi CP-a i područja oštećenja mozga. (Preuzeto i prilagođeno prema *Rouse MH, Jones & Bartlett Learning, 2019* (*16*))

1.1.3.1 Spastični oblik

Najčešći je oblik CP-a. Javlja se u 80 % slučajeva CP-a. Uključuje oštećenja kore cerebralnih hemisfera. Simptomi ovog oblika su dominantno ukočenost i rigiditet mišića. Navedeni simptomi mogu obuhvatiti jednu stranu tijela - unilateralni spastični oblik (hemipareza/hemiplegija) ili obje strane tijela - bilateralni spastični oblik koji može zahvatiti samo donje ekstremitete (dipareza/diplegija) ili sva četiri ekstremiteta (tetrapareza/tetraplegija). Slika 2 prikazuje tipično kliničko očitovanje spastičnog tipa CP-a.

Ocjena u tijeku

Slika 2. Spastični CP, deformiteti perifernih zglobova. (Preuzeto i prilagođeno prema *https://mobilephysiotherapyclinic.in/cerebral-palsy-physiotherapy-management/* (*17*))

1.1.3.1.a Bilateralni spastični oblik

Bilateralni spastični oblik CP-a najčešći je podtip CP-a s prevalencijom od 1,2 na 1000 živorođenih (*14*). Prevalencija se razlikuje u prijevremeno rođene djece u odnosu na djecu rođenu u terminu. Prevalencija iznosi oko 0,5 na 1000 djece normalne porođajne težine, 10 na 1000 kod djece umjereno niže porođajne težine i oko 40-50 na 1000 živorođene djece vrlo niske porođajne težine (*18*).

Razvojne anomalije mozga najčešće uključuju poremećaje kortikalnog ravoja bilateralne distribucije kao što su shizencefalija, lizencefalija ili polimikrogirija. Kod ovog podtipa CP-a također se mogu vidjeti i parasagitalna oštećenja ili kortiko-subkortikalna oštećenja, tzv. multicistična encefalomalacija. Promjene na MR-u vidljive su u gotovo 80 % slučajeva. Najčešće pomjene vidljive su u periventrikularnoj bijeloj tvari koje se opažaju u oko 60 % slučajeva. Oštećenja duboke sive tvari, npr.u bazalnim ganglijima ili talamusu obično zahvaćaju centralna kortikalna područja.Kortikalna oštećenja ili oštećenja duboke sive tvari te razvojne anomalije vidljive su u manjoj mjeri: u oko 15 % odnosno 10 % slučajeva. Oštećenja periventrikularne bijele tvari su ili periventrikularna leukomalacija (PVL) ili posljedica intraventrikularnog krvarenja ili oboje. Oštećenja periventrikularne bijele tvari značajnije se češće javljaju u prijevremeno rođene djece (90 %) u odnosu na djecu rođenu u terminu (21 %). Kod prijevremeno rođene djece se značajno rjeđe vide kortikalna oštećenja i oštećenja duboke sive tvari kao i razvojne anomalije mozga u odnosu na terminsku djecu (1,5% naspram 20 % i 4 % u odnosu na 26 %).

Ocjena rada u tijeku

1.1.3.1.b Unilateralni spastični oblik

Prevalencija ovog podtipa CP-a je 0,6 na 1000 živorođenih, a abnormalan nalaz MR-a prisutan je u 90 % slučajeva (*14*). Razvojne anomalije kao što su kortikalna displazija ili unilateralna shizencefalija prisutne su u 16 % slučajeva. Ozljede periventrikularne bijele tvari, fokalna periventrikularna glijoza ili posthemoragijske porencefaličke lezije prisutne su u 36 % slučajeva dok su kortikalna oštećenja ili oštećenja duboke sive tvari, uglavnom infarkti u području srednje cerebralne arterije, prisutni u 31 % slučajeva.

Kao i u bilateralnom spastičnom obliku, i u ovom podtipu CP-a postoji jasna razlika u distribuciji lezija kod prijevremeno rođene djece u odnosu na djecu rođenu u terminu. Oštećenja periventrikularne bijele tvari značajnije se češće javljaju u prijevremeno rođenih (86 %) u odnosu na djecu rođenu u terminu (20 %). Kortikalna oštećenja i lezije duboke sive tvari značajno su manje prisutna kod prijevremeno rođenih u odnosu na terminsku djecu (0 % naspram 41 %). No, za razliku od bilateralnog spastičnog oblika, razvojne anomalije jednakom učestalošću se pojavljuju i kod prijevremeno rođene djece i kod terminske djece (14 %, odnosno 16 %).

1.1.3.2 Diskinetski oblik

S obzirom na kliničku simptomatologiju ovaj oblik CP-a obuhvaća distone i atetoidne podtipove, a ukupna prevalencija oba podtipa iznosi 0,15 na 1000 živorođenih. Diskinetski oblik CP-a karakteriziran je nekontroliranim pokretima ekstremiteta, trupa i lica uz vrlo promjenjiv mišićni tonus. Mišićni tonus varira od dana do dana, ponekad čak od sata do sata.

Prema istraživanju Yokochi i suradnika provedenom na atetoidnom podtipu CP-a kod djece rođene u terminu, 68 % je imalo abnormalan nalaz MR-a uglavnom kortikalne lezije ili lezije duboke sive tvari (54 %), a 14 % slučajeva imalo je lezije periventrikularne bijele tvari.

Ovaj oblik CP-a rijedak je u prijevremeno rođene djece i nema dovoljno studija koje sistematično klasificiraju promjene u MR nalazu kod ove skupine djece. Dominantno diskinetski poremećaj zrelije nedonoščadi javlja se uz PVL i ozljede u području talamusa i bazalnih ganglija.

1.1.3.3 Ataksični oblik

Ovaj tip CP-a obilježen je poremećenom koordinacijom između mišićnih skupina posljedično oštećenju malog mozga što rezultira nespretnim pokretima i teškoćama koordinacije i

Ocjena rada u tijeku

ravnoteže. Prevalencija ovog oblika CP-a iznosi 0.08 na 1000 živorođenih, a sistematični izvještaji o promjenama u nalazu MR-a su rijetki.

1.1.3.4 Miješani oblici

Uključuju više oblika CP-a posljedično oštećenju različitih dijelova mozga, a kliničko očitovanje obuhvaća različite simptome pojedinih oblika CP-a. Najčešća je kombinacija spastičnog i diskinetskog oblika CP-a.

Poremećaji kretanja mogu uzrokovati sekundarne teškoće kao što su deformiteti kralježnice (skolioza), kontrakture i deformiteti perifernih zglobova (Slika 3) (*15*).

Slika 3. Deformiteti zglobova u miješanom obliku CP-a. (Dostupno na *https://mobilephysiotherapyclinic.in/cerebral-palsy-physiotherapy-management/* (*17*))

Posljedično motoričkom oštećenju, djeca mogu imati različiti stupanj funkcionalnog oštećenja što uzrokuje otežano funkcioniranje u svakodnevnim aktivnostima te, u različitoj mjeri, ovisnost o tuđoj pomoći i brizi.

U objektiviziranju motoričkog funkcionalnog statusa djece s CP-om SCPE preporuča korištenje standardiziranih instrumenata: GMFCS (engl. *Gross Motor Function Classification System*) za grubo motoričko funkcioniranje i BFMF (engl. *Bimanual Fine Motor Function classification*) ili, sve više prihvaćeno, MACS (engl. *Manual Ability Classification System*) za klasifikaciju finih motoričkih funkcija šaka (*19–21*). Kriteriji navedenih klasifikacija prikazani su u Tablicama 2, 3 i 4.

Ocjena rada u tijeku

Tablica 2. GMFCS sustav klasifikacije grubog motoričkog funkcioniranja. (Preuzeto i prilagođeno prema *Beckung, Dev Med Chils Neurol, 2002* (*20*))

Razina	**Kriterij**
Razina I	Hoda bez ograničenja
Razina II	Hoda uz ograničenja
Razina III	Hoda koristeći ručno pomagalo za kretanje (štake, štapovi, hodalice)
Razina IV	Samopokretanje uz ograničenja, može koristiti pomagalo za kretanje na električni pogon
Razina V	Prevozi se u ručnim kolicima

Ocjena rada u tijeku

Tablica 3. BFMF sustav stupnjevanja finih motoričkih funkcija šaka. (Preuzeto i prilagođeno prema *Beckung, Dev Med Chils Neurol, 2002* (*20*))

Stupanj	**Kriterij**
Prvi stupanj	Jedna šaka: fina motorika je bez ograničenja Druga šaka: bez ograničenja ili ona postoje u zahtjevnijim motoričkim vještinama
Drugi stupanj	a) Jedna šaka: fina motorika je bez ograničenja. Druga šaka: moguće samo prihvaćanje predmeta ili zadržavanje u ruci b) Obje šake: ograničenja postoje u zahtjevnijim finim motoričkim vještinama
Treći stupanj	a) Jedna šaka: fina motorika je bez ograničenja Druga šaka: bez ikakvih funkcionalnih sposobnosti b) Jedna šaka: ograničenja postoje u zahtjevnijim finim motoričkim vještinama. Druga šaka: moguće samo prihvaćanje predmeta ili čak ni to
Četvrti stupanj	a) Obje šake: sposobnost hvatanja i držanja predmeta b) Jedna šaka: samo sposobnost hvatanja Druga šaka: samo sposobnost držanja predmeta ili čak ni to
Peti stupanj	Obje šake samo sposobnost zadržavanja predmeta ili čak ni to

Ocjena rada u tijeku

Tablica 4. MACS sustav klasifikacije finih motoričkih funkcija šaka. (Preuzeto i prilagođeno prema *Eliasson, Dev Med Child Neurol, 2006* (*21*))

Stupanj	Kriterij
1	Koristi predmete lako i uspješno. Ograničenja se mogu uočiti samo pri izvedbi manualnih zadataka koji zahtijevaju brzinu i točnost. No, bilo kakva ograničenja u manualnim sposobnostima ne ograničavaju neovisnost u aktivnostima svakodnevnog života.
2	Koristi većinu predmeta, ali s ponešto smanjenom kvalitetom i/ili brzinom uspješnosti. Određene aktivnosti se mogu izbjegavati ili mogu biti izvedene s ponekim poteškoćama. Mogu se koristiti alternativni načini izvedbe, ali manualna sposobnost obično ne ograničuje samostalnost pri aktivnostima svakodnevnog života.
3	Koristi predmete s poteškoćama; treba pomoć pri pripremi i/ili adaptaciji aktivnosti. Izvedba je spora i rezultira ograničenim uspjehom s obzirom na kvalitetu i kvantitetu. Treba neprestanu podršku i pomoć i/ili adaptiranu opremu, čak i za djelomično uspješnu aktivnost.
4	Koristi ograničen izbor jednostavnih predmeta u prilagođenim situacijama. Izvodi dijelove aktivnosti uz napor i s ograničenim uspjehom. Treba stalnu podršku i pomoć i/ili prilagođenu opremu, čak i za polovično uspješnu izvedbu aktivnosti.
5	Ne koristi predmete i ima teško ograničenu sposobnost izvođenja čak i jednostavnih aktivnosti. Treba stalnu pomoć.

Uz CP uobičajeno se javlja niz pridruženih stanja, bolesti i teškoća. Najčešće se javljaju: bol (75 %), intelektualne teškoće (50 %), dislokacija kuka (33 %), teškoće govora (25 %), epilepsija (25-35 %), inkontinencija (25 %), poremećaji ponašanja i teškoće spavanja (20-25 %), teže oštećenje vida ili slabovidnost (12 %) (*22*).

Procjenjuje se da više od 50 % djece s CP-om i intelektualnim teškoćama ima epilepsiju. Epilepsija kod djece s CP-om predstavlja biljeg težeg oblika bolesti i povećava rizik smrtnosti uključujući i iznenadnu neočekivanu smrt u epilepsiji (*23*).

1.1.4 Dijagnoza CP-a

Postavljanje dijagnoze CP-a temelji se na anamnezi, kliničkoj slici i tijeku bolesti. Prije svega je neophodno prepoznati trajan, ali neprogresivan motorički poremećaj od strane kliničara kroz niz kliničkih pregleda.

Ocjena rada u tijeku

Dijagnoza CP-a se isključuje iz sve većeg broja definiranih neurogenetičkih sindroma kao i progresivnih poremećaja, nasljednih metaboličkih i heredodegenerativnih bolesti, bolesti kralježnične moždine te hipotonije kao zasebnog entiteta.

Važno je također dijagnosticirati komorbiditet koji je uobičajen pratilac CP-a (epilepsija, intelektualne teškoće, teškoće govora, teškoće vida, teškoće ponašanja, teškoće spavanja). U Tablici 5 prikazani su najčešći komorbiditeti CP-a te preporučeni postupci (*15*, *22*).

Ocjena rada u tijeku

Tablica 5. Postupanje kod najčešćih komorbiditeta CP-a. (Preuzeto i prilagođeno prema Vitrikas K, Dalton H, Breish D. Am Fam Physician. 2020 (*15*))

Komorbiditet	**Preporuka**
Teškoće govora i komunikacije	Logoterapija Korištenje asistivnih metoda komunikacije
Oštećenje oralno-motoričke funkcije: može uzrokovati hipoksemiju, pojačano slinjenje, povraćanje, aspiracijsku pneumoniju pothranjenost	Posebna prehrana Različite tehnike pozicioniranja i hranjenja hranjenje putem gastrostostome ili nazogastrične sonde Korištenje lijekova Kirurški zahvati na žlijezdama slinovnicama i biofeedback-a za smanjenje salivacije
Epilepsija	Medikamentozna terapija Kirurški postupci - implantacija vagusnog stimulatora
Oštećenja vida- strabizam ili hemianopsija	Redovno praćenje i postupci prema specijalisti oftalmologu (okluzija oka, ordiniranje naočala, kirurški postupci)
Oštećenje sluha	Audiološka obrada, pregled i postupci specijaliste otorinolaringologa
Oštećenje kognitivnih funkcija, emocionalne teškoće, teškoće ponašanja, pridružena psihijatrijska bolest	Psihološko praćenje i terapija Edukacijsko- rehabilitacijski postupci Radna terapija Medikamentozna terapija Psihijatrijski nadzor
Gastrointestinalni poremećaji - povraćanje, opstipacija, opstrukcija crijeva	Dijetetske mjere Medikamentozna terapija U nekim slučajevima kirurško liječenje
Osteoporoza	Medikamentozna terapija Vježbe Prevencija padova

Ocjena rada u tijeku

U postavljanju dijagnoze koriste se slikovne metode kao što su UZV mozga i MR mozga. Slikovne metode mogu pokazati različite abnormalnosti kao što su: intrakranijalno krvarenje, shizencefaliju, hidrocefalus, PVL (*24*).

Prema jednoj studiji lezije tipične za hipoksično-ishemičku ozljedu mozga uočene su MR-om u samo 5 % snimljene novorođenčadi (*25*).

Zbog promjenjivosti kliničkog nalaza uslijed procesa sazrijevanja i plastičnosti središnjeg živčanog susutava, ali i terapijskih postupaka, ne preporuča se dijagnozu CP-a postaviti prije četvrte godine života (optimalno pete godine života odnosno minimalno treće godine života (*3*, *11*, *26*).

Naime, rano postavljanje dijagnoze (prije treće godine života) krije u sebi opasnost da se u CP uvrste prolazna neuromotorna odstupanja ili da se propuste blagi oblici CP-a. Rano postavljanje dijagnoze CP-a također može dovesti i do pogrešnog uključivanja u CP sporo progresivnih encefalopatija kod kojih tek naknadno tijekom razvoja dolazi do gubitka stečenih motoričkih funkcija (*26*).

Iako su čimbenici rizika poznati, etiologija i patogeneza razvoja CP-a nepoznata je u velikom broju slučajeva (čak u 75 % slučajeva) (*27*). Dugo se smatralo da se CP u prvom redu javlja kao posljedica hipoksije i ishemije novorođenčeta tijekom poroda, međutim istraživanja su pokazala da se u samo manjeg broja oboljelih od CP-a nastalo neurorazvojno odstupanje može povezati s hipoksijom nastalom tijekom poroda (*28*).

Definiranje faktora rizika kod novorođenčadi prema opstetričkim i perinatalnim zbivanjima nije pouzdan pokazatelj razvoja CP-a. UZV mozga je također važan prognostički čimbenik za CP sa specifičnošću od 86%, ali senzitivnošću od samo 29 % (*29*). Nameće se potreba za ranijim postavljanjem dijagnoze CP-a s ciljem terapijskog djelovanja u razdoblju najveće plastičnosti središnjeg živčanog sustava.

1.1.5 Liječenje CP-a

Liječenje CP-a izrazito varira u ovisnosti o specifičnim simptomima. Od izuzetne je važnosti multidisciplinirani pristup zbog potrebe terapijskog djelovanja na više organskih sustava i razvojnih područja. Liječenje uključuje i terapiju raznih komorbiditeta koji se uobičajeno javljaju uz CP te njihovih komplikacija.

Multidisciplinirani tim najčešće čine: fizijatar razvojne dobi, neuropedijatar, ortoped, fizioterapeut, radni terapeut, edukacijski rehabilitator, logoped, psiholog i terapeut senzorne

Ocjena rada u tijeku

integracije. U liječenje brojnih komorbiditeta uključeni su: oftalmolog, gastroenterolog, nefrolog, psihijatar i otorinolaringolog (*15*).

Osnovno liječenje teškoća kretanja, poremećaja koordinacije i balansa su različiti modaliteti fizikalne terapije, u prvom redu individualna medicinska gimnastika. Često se koriste različita ortopedska pomagala koja služe za prevenciju kontraktura i deformiteta koštanozglobnog sustava i olakšavaju ili omogućavaju hod odnosno pokretanje. Ponekad je potrebno kirurško liječenje, npr. liječenje dislokacije kuka, operativno popuštanje tetiva ili liječenje deformiteta perifernih zglobova. U liječenju spastičnost primjenjuju se i intramuskularne injekcije OnabotulinumA toksina (Botox) te neurokirurški zahvati selektivne dorzalne rizotomije.

Liječenje brojnih komorbiditeta složeno je i vrlo diferentno. Uključuje i medikamentoznu terapiju u liječenju epilepsije, gastrointestinalnih poremećaja, urinarne inkontinencije, osteoporoze, teškoća spavanja.

Osim usredotočenosti na motoričke teškoće i terapiju komorbiditeta od iznimne je važnosti poticanje djetetove komunikacije, socijalnih, akademskih, i u konačnici i profesionalnih vještina (*30*).

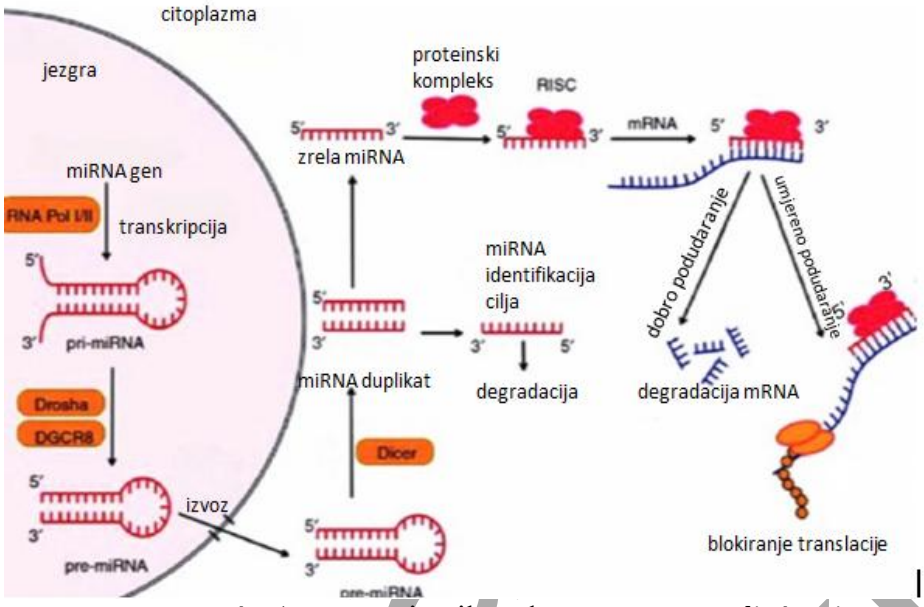
1.2 MikroRNA

MikroRNA (engl. *microRNA, miRNA*) su male nekodirajuće molekule RNA od 20 - 22 nukleotida i imaju važne uloge u finoj regulaciji izraženosti gena na posttranskripcijskoj razini koja je potrebna za razvoj i funkciju stanica i organa (*31–33*). Do sada je poznato više od 2000 miRNA koje reguliraju više od 60 % genoma (*34*).

Osnovni put stvaranja miRNA započinje u jezgri transkripcijom miRNA gena čime nastaje dugački endogeni primarni traskript miRNA. Potom se primarni miRNA transkript prerađuje u pre-miRNA duljine oko 70 nukleotida pomoću kompleksa kojeg tvore DGCR8 (engl. *RNA binding protein DiGeorge Syndome Critical Region 8*) i enzim Drosha (ribonukleaza III enzim). Stvorena pre-miRNA transportira se iz jezgre u citoplazmu pomoću kompleksa eksportin 5 (XPO5)/RanGTP. U citoplazmi iz pre-miRNA djelovanjem enzima Dicer (RNaza III endonukleaza) nastaje zrela miRNA. MiRNA i protein Argonaut (AGO) čine kompleks za utišavanje induciran molekulom miRNA (mi-RISC kompleks, engl. *minimal miRNA-induced silencing complex*) kojega miRNA vodi do komplementarne sekvence na ciljnoj mRNA (engl. *miRNA response elements*, MRE). Ovisno o stupnju kompementarnosti mi-RISC i MRE

Ocjena rada u tijeku

dolazi do degradacije ciljne mRNA, inhibicije translacije ili cijepanja ciljnih transkripata (*35*). Proces stvaranja miRNA je prikazan na slici 4.



Slika 4. Biogeneza miRNA. (preuzeto i prilagođeno prema *Denli AM i sur., Nature, 2004* (*35*))

S obzirom na činjenicu da miRNA dovode do supresije gena temeljem parcijalne komplementarnosti s mRNA, više miRNA može ciljano djelovati na jednu mRNA molekulu, a također i jedna miRNA može za cilj imati više mRNA. Posljedica navedenog je koordinirano moduliranje genske izraženosti u različitim tkivima i stanicama.

1.2.1 MiRNA u središnjem živčanom sustavu

Čak 70 % svih miRNA nalazi se u središnjem živčanom sustavu (*36*). Tijekom razvoja mozga i u mozgu odraslih izraženost mnogih miRNA je vremenski i prostorno različita (*37*).

U razvoju središnjeg živčanog sustava bitnu ulogu ima niz miRNA molekula ključnih za proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu neuralnih stanica. Interakcija između miRNA i njihovih ciljnih mRNA ima regulatornu ulogu u neuralnom razvoju (*38*). MiRNA sudjeluju u neurogenezi, oligodendrogenezi i astroglijogenezi (*39*).

Mnoge miRNA specifične su za određeni tip stanica ili staničnu liniju, a neke miRNA imaju različitu izraženost prije i nakon rođenja što ukazuje na potrebu za različitim miRNA tijekom razvoja (*40*, *41*).

Ocjena u tijeku

Povećana izraženost miRNA uzrok je usmjeravanju pluripotentnih matičnih stanica u specifičnu liniju. miR-9 i miR-124a od iznimne su važnosti za neuralni razvoj. Visoko su izražene u neuronima i astrocitima gdje moduliraju fosforilaciju STAT3, važne molekule u diferencijaciji neurona (*42*).

Također, miRNA su važni modulatori neurogeneze, neuralne migracije, stvaranja sinapsi, plastičnosti sinapsi i memorije (*31, 33, 32*). Glavni način modulacije je kompartmentalizacija i lokalizacija izraženosti i translacije mRNA u specifičnoj podregiji stanice kao što su sinapse, dendriti ili aksoni (*43*). U regulaciji diferencijacije astrocita, glavnog tipa glija stanica u središnjem živčanom sustavu, ključnu ulogu imaju miRNA let-7b i miRNA-125 (*40*).

Dosadašnja istraživanja ukazala su na ključnu ulogu miRNA u sazrijevanju oligodendrocita i stvaranju mijelina uključujući i njihovu ulogu u patofiziologiji hipoksično ishemičkih ozljeda mozga u razvoju (*44, 45*).

Izraženost miRNA se mijenja kod različitih oštećenja mozga i u neuroinflamaciji, a upalni odgovori imaju ključnu ulogu u regulaciji neurorazvoja (*46*).

Za sada nije poznato razlikuju li se uloge i profili specifičnih miRNA u odgovoru na ozljedu mozga ovisno o gestacijskoj dobi. Za pretpostaviti je da razlike u izraženosti postoje s obzirom na njihovu različitu potrebu tijekom razvoja i s obzirom da postoje razlike u neuropatologiji mozga ovisno o gestacijskoj dobi (*47*).

Kod terminske novorođenčadi kod ozljeda mozga dominira selektivna nekroza praćena oštećenjem paracentralnog korteksa i pripadajuće bijele tvari u parasagitalnoj ili tzv. razvodnoj zoni (irigacijsko područje prednje i stražnje srednje moždane arterije (lat. *arteria cerebri media*)) (*46*).

Osnovna patofiziološka zbivanja u podlozi difuznog oštećenja bijele tvari u nedonošene novorođenčadi su gubitak i smanjena diferencijacija premijelniziranih progenitora oligodendrocita što u konačnici rezultirala smanjenom mijelinizacijom mozga (*47,48*).

Kod prijevremeno rođene novorođenčadi, rođenih između 23. i 32. tjedna gestacije, najveći je rizik od ozljede bijele tvari. Ovisno o veličini ozljede, spektar oštećenja može značajno varirati, a u najtežem su slučaju zahvaćene sve vrste stanica uključujući glije, oligodendrocite i neuralne aksone što rezultira žarišnim cistično-nekrotičnim lezijama (periventrikularna leukomalacija) koje nastaju u bijeloj tvari periventrikularno i mogu se protezati sve do centrum semiovale i subkortikalne bijele tvari (*47*).

Ocjena rada u tijeku

Upalni odgovori imaju ključnu ulogu u neurorazvoju, neurodegeneraciji i ozljedama središnjeg živčanog sustava. Zbog svoje sposobnosti istodobne regulacije više različitih gena uključenih u upalne odgovore miRNA su ključni regulatori neuroinflamacije. Ovisno o ciljnoj mRNA, miRNA mogu imati proupalne, protupalne ili mješovite imunomodulatorne uloge (*45*).

Disregulacija izraženosti miRNA primjećena je u mnogim razvojnim, neuropsihijatrijskim i neurodegenerativnim bolestima (*43*).

1.2.2 Ekstracelularne miRNA

Brojna dosadašnja istraživanja potvrdila su da se miRNA izlučuju u ekstracelularne tekućine kao što su plazma, slina, cerebrospinalni likvor, urin, suze, majčino mlijeko, kolostrum, peritonealna tekućina, bronhalni lavat, seminalna tekućina i folikularna ovarijalna tekućina te mogu služiti kao biomarkeri za različite bolesti (*48*).

Ekstracelularnim tekućinama miRNA dolaze do različitih stanica gdje mogu djelovati kao autokrini, parakrini i/ili endokrini regulatori različitih staničnih funkcija odnosno ponašati se kao hormoni (*49*).

Za razliku od unutarstaničnih miRNA, ekstracelularna miRNA je visoko stabilna i otporna na degradaciju na sobnoj temperaturi do četiri dana kao i na štetne učinke kuhanja, višekratnog zamrzavanja i visokog ili niskog pH (*50, 51*).

U biološkim tekućinama dvije su osnovne skupine miRNA. Jedna se nalazi unutar vezikula kao što su egzosomi, mikrovezikule i apoptotička tjelešca (*49*) dok se druga skupina miRNA nalazi unutar kompleksa s proteinima kao što su AGO2, lipoprotein visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein,* HDL) i nukleofosmin-1 (*52, 53*). Smatra se da navedeni oblici miRNA unutar vezikula, odnosno u kompleksu s protenima osiguravaju stabilnost miRNA u ekstracelularnim tekućinama (*52*).

Poremećena izraženost miRNA otkrivena je u različitim neurodegenerativnim bolestima (Huntingtonova bolest, Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, amiotrofična lateralna skleroza) i neuropsihijatrijskim bolestima (shizofrenija, poremećaj autističnog spektra (engl. *Autism spectrum disorder,* ASD), depresija, ovisnost, anksioznost) (*54*).

Neuroni i glija su bogati izvor miRNA koje mogu prijeći krvno-moždanu barijeru te bi ekstracelularne miRNA mogle poslužiti kao dijagnostički i/ili prognostički biomarkeri (*43*).

Ocjena rada u tijeku

Za dijagnostiku epilepsije temporalnog režnja pokazale su se dobrim biomarkerima ((površina ispod krivulje (engl. *area under curve*, AUC) > 0,82)) miR-106b-5p, miR-146a u serumu, miR-19b-3p i miR-451a u cerebrospinalnoj tekućini te miR-3613-5p u egzosomima plazme (*55*).

Analizom miRNA iz obitelji miR-132 i miR-134 u plazmi moguće je uspješno razlikovati blago kognitivno oštećenje od kontrole što je jako bitno s obzirom da je blago kognitivno oštećenje karakteristično za rane stadije mnogih neurodegenerativnih bolesti (*56*).

MicroRNA-222 se pokazala dobrim biomarkerom Alzheimerove bolesti (AB) s obzirom da je u serumu pacijenata oboljelih od AB značajno niža koncentracija ove miRNA nego u kontrolnoj skupini ispitanika (*57*). Nadalje, Takousis i sur. proveli su meta-analizu cirkulirajućih miRNA kao biomarkera Alzheimerove bolesti te su miR-342-3p u krvi ($p = 9.16 \times 10^{-24}$) i miR-127-3p u cerebrospinalnoj tekućini ($p = 2.79 \times 10^{-5}$) istaknute kao miRNA s najvećim potencijalom (*58*). Osim toga, miRNA let-7a, let-7f, miR-142-3p i miR-222 u plazmi pokazale su se dobrim biomarkerima za ranu dijagnostiku Parkinskonove bolesti (AUC > 0,8) (*59*).

MiR-614, miR-572, miR-648, miR-1826, miR-422a, miR-22 i miR-1979 su kandidati za dijagnostiku i prognostiku multiple skleroze (*60*).

1.2.3 Slina

Funkcija sline je da štiti usnu šupljinu od infekcija, održava pH usne šupljine, prekriva i štiti zube od karijesa i erozije te regulira enzimsku aktivnost u ustima (*61*). Žlijezde slinovnice izlučuju oko 90 % sline, a ostalo čine gingivna tekućina, iskašljaj bronha, sekret nosa, bakterije, virusi, gljivice, epitelne stanice, ostaci hrane te krv i njeni derivati (*61*). U zdravih odraslih osoba slina se proizvodi brzinom od 0,5 mL u minuti (*62*).

Slina je ultrafiltrat plazme pa od tuda aforizam da je slina ogledalo tijela. U slini se, kao i u perifernoj krvi, nalaze protutijela, enzimi, hormoni i genetski materijal koji su procesima difuzije, ultrafiltracije, aktivnim transportom i paracelularnim putevima dospjeli u slinu (*63*).

U posljednjem se desetljeću broj istraživanja biomarkera sline više nego utrostručio. Razlog tomu je otkrivanje značajnih biokemijskih i molekularnih čimbenika uključenih u patogenezu različitih bolesti. Uzorkovanje i analiziranje sline je neinvazivan i financijski prihvatljiv način proučavanja sistemskih bolesti, lako dostupan, može se višekratno ponavljati te ne zahtijeva

Odjena rada u tijeku

posebnu edukaciju i zahtjevnu metodologiju (*64*). Slina se može pohraniti na sobnoj temperaturi i poslati poštom do laboratorija (*62*).

Ispitivanje roditelja djece uključene u longitudinalne kohortne studije pokazalo je da roditelji daju prednost analizi sline u odnosu na uzorkovanje drugih bioloških tekućina kao što je npr. vađenje krvi zbog čega je poboljšano uključenje ispitanika kao i njihovo zadržavanje u takvim ispitivanjima (*65*).

Istraživanja potencijalnih biomarkera u slini djece uključuju istraživanja bolesti usne šupljine (karijes, učinci ortodontskih zahvata, gingivitis), gastrointestinalnih bolesti (eozinofilni ezofagitis, gastroezofagealni refluks, apendicitis), metaboličkih bolesti (dijabetes, debljina), respiratornih bolesti (astma, alergijski rinitis, upala pluća), razvojnih poremećaja, neuropsihijatrijskih, onkoloških i autoimunih bolesti. Ovisno o tipu biomarkera metode se klasificiraju u područja genomike, metabolomike, mikrobiomike, proteomike i transkriptomike (*66*).

Kod djece s CP-om utvrđena je poremećena simptovagalna ravnoteža u odnosu na zdrave vršnjake. Navedeno je posljedica samog oštećenja dijelova autonomnog živčanog sustava , ali i deficita motoričkih aktivnosti što mehanizmima povratne sprege utječe na funkcioniranje autonomnog živčanog sustava. Posljedično, bolesnici s CP-om imaju povećanu srčanu frekvenciju, više vrijednosti krvnog tlaka i povećan rizik od kardiovaskularnih bolesti. Zbog predominacije simpatikusa i povećane vazokonstrikcije kod djece s CP-om, vađenje uzorka krvi dodatno je otežano te je zbog toga istraživanje markera u lako pristupačnim uzorcima, kao što je slina, od iznimne važnosti (*67*).

90% humane RNA u slini je mRNA, a većima istraživanja mRNA biljega u slini odnosi se na bolesti raka, periodontitisa i Sjögrenovog sindroma (*62*, *68*).

1.2.4 MiRNA u slini

Istraživanje je pokazalo da je od 12 različitih bioloških tekućina (slina, plazma, majčino mlijeko, sjemenska tekućina, suze, urin, amnijska tekućina, cerebrospinalni likvor, kolostrum, bronhalni lavat, peritonejska tekućina) u slini, majčinom mlijeku i sjemenskoj tekućini detektiran najveći broj različitih miRNA (*48*).

miRNA u slini uglavnom se nalaze u egzosomima što ih štiti od degradacije (*52*, *63*).Većina istraživanja miRNA biljega u slini odnosi se na bolesti usne šupljine i zloćudne tumore

Ocjena rada u tijeku

probavnog sustava, a u posljenje vrijeme raste broj istraživanja bolesti živčanog i imunološkog sustava, zaraznih bolesti i forenzičkih istraživanja (*68*).

MiRNA u slini je potencijalni biljeg neuroloških stanja kao što su ASD, ovisnost o alkoholu i potres mozga (*61*).

ASD heterogena je skupina kompleksnih neurorazvojnih poremećaja čija je etiopatogeneza nedovoljno istražena. Poremećaj se dominantno manifestira teškoćama socijalne interakcije i komunikacije, suženim interesom i ponavljajućim radnjama.

U ASD-u su česta pridružena stanja i bolesti od kojih se neka javljaju s visokom učestalošću i kod djece s CP-om. Najčešća pridružena stanja su: poremećaj pažnje, senzoričke teškoće, pridružene psihijatrijske bolesti, intelektualne teškoće, teškoće hranjenja i motoričke teškoće. Najčešće motoričke teškoće koje se javljaju uz ASD su: kašnjenje u motoričkom razvoju (tipično i za CP), poremećaj mišićnog tonusa- hipotonija (tipičan za CP), hod po prstima (vrlo čest u spastičnom obliku CP-a) te ograničene kretnje gležnjeva (vrlo često kod CP-a). Rizični čimbenici za nastanak ASD-a su: nasljedni faktori, obiteljska anamneza psihijatrijskih bolesti, prijevremeni porod te prenatalna izloženost fetusa psihotropnim lijekovima (*69*).

Hicks i sur. ispitali su izraženost 246 miRNA u slini 24 pacijenta s ASD-om i 21 kontrolna ispitanika te su otkrili 14 diferencijalno izraženih miRNA od kojih je promjena izražaja miR-628-5p bila najznačajnija, a njena AUC vrijednost iznosila je 0,90 (*70*). Dvije godine kasnije isti autori opisali su novu neinvazivnu poli-omic detekciju RNA iz sline djece s ASD-om kojom se nedetektiraju samo miRNA već i ostale nekodirajuće RNA kao što su male nukleolarne RNA (engl. *Small nucleolar RNA,* snoRNA) i duge intergenske nekodirajuće RNA (engl. *Long intergenic non-coding RNA,* lincRNA). U navedenom istraživanju koje je uključilo 426 djece, pronađena je povećana izraženost 11 miRNA, između ostalog i miRNA-146a, miRNA analizirane u ovom istraživanju (*71*).

Trenutno nekoliko miRNA iz sline ima potencijal da se koriste kao biomarkeri kod djece s ASD-om. Najveću razliku u izraženost u slini djece s ASD-om u odnosu na djecu normalnog razvoja imaju miRNA 23a-3p, miRNA-32-5p i miRNA-628-5p (*72*).

Istraživanje Hicksa i suradnika na miRNA u slini djece s traumatskom ozljedom mozga ukazalo je da nekoliko miRNA ima slične promjene u cerebrospinalnom likvoru i u slini djece s traumatskom ozljedom mozga (miRNA-182-5p, miRNA-221-3p, miRNA-26b- 5p, miRNA-320c, miRNA-29c-3p i miRNA-30e-5p). Koncetracije miRNA-320c direktno koreliraju s nedostatkom pažnje (*73*).

Ocjena rada u tijeku

Od 643 miRNA konzistentno prisutnih u ljudskoj slini najzastupljenija je miRNA-27b-3p, a na visokom se mjestu nalaze i miRNA let-7b (1137 uzorka) te miRNA-146a (836 uzorka) (*64*).

1.2.5 MiRNA-146a

Obitelj miR-146 čine miR-146a i miR-146b čije sekvence se međusobno razlikuju u zadnja 2 nukleotida na 3' kraju (*74*). Istraživanja miRNA-146a su puno zastupljenija od istraživanja miRNA-146b te je gotovo 5 puta više članaka objavljeno o miRNA-146a (*75*).

Primarna funkcija miRNA-146a je regulacija upalnih procesa, hematopoeze, odgovora na alergiju i druge segmente urođenog imunološkog sustava. Glavni mehanizam regulacije je kontrola izraženosti proteina uključenih u različite signalne puteve kao što su čimbenik tumorske nekroze α (engl. *tumor necrosis factor α*, TNF α), nuklearni čimbenik kappa B (engl. *nuclear factor κappa B*, NFκB), mitogenom aktivirane protein-kinaze 1 i 2 (engl. *mitogen activated protein kinase MEK-1/2*) i JNK-1/2 (engl. *c-Jun N-terminal kinase*). Djelujući na interleukin 1 kinazu pridruženu receptoru (engl. *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*, IRAK1) i čimbenik povezan s receptorom za TNF-6 (engl. *TNF associated factor 6*, TRAF6), miRNA-146a smanjuje aktivnost transkripcijskog faktora NF-κB koji predstavlja centralnu molekulu signalnog puta interleukin 1/ receptori slični toll-u (engl. *Toll-like receptors*, TLR). Nadalje, miRNA-146a suprimira proupalne kemokine interleukin 8, ligande koji se vežu na kemokinske receptore te potiče interferon lambda (*76, 77*).

Jedna od najznačajanijih neuroinflamatornih miRNA je miRNA-146a. MiRNA-146a je ključni regulator upale posredovane astrocitima (*78*). MiRNA-146a negativan je regulator upale i njena je izraženost povećana u patogenezi različitih neuroloških stanja, a značajno je izražena u korteksu, amigdalama i hipokampusu, strukturama odgovornim za složene kognitivne funkcije (*79*).

miRNA-146a je važan regulator oligodendrogeneze kako u normalnom mozgu tako i u mozgu u okolnostima ishemije (*80, 81*). MiRNA-146a inhibira izraženost neuronalno specifičnih gena Nlgn1 i Syt1 povezanih s diferencijacijom glija stanica (*82*), dok tijekom razvoja mozga miRNA-124 regulira diferencijaciju astrocita (*39*).

MiRNA-146a je jedna od najproučavanijih miRNA u epilepsiji. Ima središnju ulogu u neuroinflamaciji jer regulira signalni put NF-κB. Poremećena izraženost ove miRNA može

Ocjena rada u tijeku

uzrokovati nekontroliranu proizvodnju neurotoksičnih upalnih faktora kao što su interleukin 1, TNF-α, dušikov oksid i vodikov peroksid, uzrokujući smrt neurona i neurodegeneraciju (*83*).

Istraživanje koje je ispitivalo neuroinflamatorne procese u epileptogenezi ukazalo je na povećanu izraženost miRNA-146a i kod nezrelih štakora s epilepsijom medijalnog temporalnog režnja (engl. *Mesial Temporal Lobe Epilepsy*, MTLE) i kod djece s MTLE ukazujući na proinflamatornu ulogu miRNA-146a djelovanjem na faktor upale interleukin 6 (*84*). Istraživanja epilepsije su važna i za CP jer se epilepsija vrlo često javlja kod djece s CP-om, a pridruženost epilepsije značajno narušava kvalitetu života i veže se uz teže oblike bolesti (*23*).

Dok sve veći broj istraživanja ukazuje na važnu ulogu nekoliko miRNA, uključujući i miRNA-146a, u regulaciji opsega i trajanja TLR odgovora i prirođenih imunoloških reakcija, malo se zna o neuroinflamatornim odgovorima nakon ozljede nastale u nezrelom mozgu. Promjene miRNA-146a uočene su i kod traumatskih ozljeda mozga na animalnim modelima (trauma je učinjena kirurškim postupkom kompresije mozga s posljedičnim oštećenjem korteksa iznad hipokampusa) u odnosu na mozak zdravih životinja te je analiziran stupanj oštećenja mitohondrija kao pokazatelj oporavka ili smrti stanice. Stupanj disfunkcije mitohondrija koji vodi ozljedi od kritične je važnosti za preživljavanje stanice. U neoštećenim hipokampalnim mitohondrijima značajno je viša razina miRNA-146a unutar mitohondrija u odnosu na citosol. Dvanaest sati nakon traumatske ozljede dolazi do sniženja miRNA-146a u mitohondriju, dok je u isto vrijeme uočen značajni porast miRNA-146a u citosolu. Navedeno je odgovor na stresne čimbenike posljedično traumatskoj ozljedi, no mehanizam pomaka razina miRNA u mitohondriju odnosno citosolu nije sasvim razjašnjen. Uočen je također različit odgovor na traumatsku ozljedu u smislu izraženijeg oštećenja kortikalnih mitohondrija u odnosu na hipokampalne mitohondrije. MiRNA-146a detektirana je u kotrikalnim neuronima, astrocitima i mikrogliji no značajnije su više razine u astrocitima i mikrogliji (*85*).

Epidemiološke studije ukazale su na pojačanu upalnu aktivnost i povišene razine proinflamatornih citokina u pupkovini, amnijskoj tekućin i fetalnoj cirkulaciji prilikom ozljede bijele moždane tvari. U stvari, prijevremeno rođena novorođenčad rođena su u okolnostima ozbiljnih upalnih zbivanja (*86*).

U mozgu miša pojačana izraženost miRNA-146a inducira oštećenje neuronalnih dendrita i dovodi do skraćivanja dendrita te povećanog preuzimanja glutamata u astrocitima. U

Ocjena rada u tijeku

konačnici poremećaj homeostaze glutamata oštećuje sinaptičku transmisiju kod djece s autizmom (*33*).

Son Nguyen i sur. su proučavali izraženost miRNA-146a u više različitih tkiva pacijenata s autizmom i kontrolnih ispitanika. Iz nosa pacijenata izolirali su olfaktorne matične stanice jer su one slične neuralnim matičnim stanicama te su pokazali da je izraženost miRNA-146a duplo veća u tkivu pacijenata s autizmom nego u tkivu izoliranom iz kontrola. Međutim, dvije skupine pacijenata nisu se statistički značajno razlikovale po razini izraženosti ove miRNA u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Također, iz kože kontrolnih ispitanika, pacijenata s autizmom i, dodatno, pacijenata s intelektualnim poteškoćama, ali bez autizma izolirali su fibroblaste te pokazali da je miRNA-146a statistički značajno veća u pacijenata s intelektualnim poteškoćama naspram kontrola, a ta je razlika bila još značajnija uspoređujući pacijente s autizmom naspram kontrola (*33*).

U okviru CP-a, kako je već navedeno, često se javlja oštećenje kognitivnih funkcija. Istraživanja pokazuju da se intelektualne teškoće javljaju u čak do 50 % djece s CP-om (*22*).

Dosadašnja istraživanja pokazala su pojačanu izraženost miRNA-146a kod djece koja boluju od ASD-a (*87*).

Sumarno, poremećena razina miRNA-146a je dokazana u oštećenjima mozga, epilepsiji, autizmu i intelektualnim poteškoćama, tj. u svim stanjima povezanim s CP-om. Stoga navedena istraživanja upućuje na to da bi miRNA-146a mogla biti promijenjena, odnosno povećana i u djece s CP-om.

1.2.6 MiRNA let-7b

MiRNA let-7 jedna je od dvije prvo otkrivene miRNA u *Caenorhabditis elegans* te prvootkrivena humana miRNA (*88*).

Obitelj let-7 čini 12 gena u humanom genomu koji kodiraju 10 miRNA (let-7a, b, c, d, e, f, g, , miRNA-98 i miRNA-202). Sve su duge 22 nukleotida, neke imaju istu sekvenicu ili se razlikuju u do 3 nukleotida, ali funkcionalno se bitno razlikuju (*89*).

Sazrijevanje miRNA let-7 je preciznije regulirano od sazrijevanja drugih miRNA. Različiti proteini nakon transkripcije let-7 se vezuju na preE regiju pri- let-7 i pre-let-7, a jedan od najznačajnih mehanizama je posredovan s RNA vezujućim proteinom LIN28 (*90*).

LIN28 inhibira biogenezu miRNA let-7, a miRNA let-7 inhibira izraženost *Lin28* (*91*). LIN28/let-7 reguliraju pluripotentnost matičnih stanica, diferencijaciju te vremenski usklađuju

Ocjena rada u tijeku

razvoj (*92*). Stanice koje proliferiraju imaju visoke razine LIN28 i niske razine miRNA let-7 dok stanice koje se diferenciraju imaju niske razine LIN28 i visoke razine miRNA let-7b (*90*).

Ime potječe od lethal-7 jer je izraženost let-7 nužna za prenatalni razvoj. Pojavljuje se netom nakon oplodnje te sudjeluje u procesu vezanja blastociste za uteralne spiralne arterije tijekom implantacije blastociste u endometrij (*89*). Niske razine LIN28 i visoke razine miRNA let-7 u stanicama trofoblasta uzrokuju smanjenu proliferaciju i abnormalan razvoj placente (*90*). Nakon prvog trimestra miRNA let-7 zaustavlja proliferaciju stanica koje nisu potrebne te na taj način sudjeluje u organogenezi (*89*).

Neuralne matične stanice, nediferencirane prekursorske stanice, imaju sposobnost samoobnavljanja i proliferacije i diferencijacije i u neuronske stanične linije i u glija stanične linije (*88*).

MiRNA Let-7 je izražena u mozgu tijekom razvoja i zrelome mozgu, a povećana izraženost i sazrijevanje miRNA let-7 zabilježena je tijekom diferencijacije u neuralne stanice. Pokazano je da miRNA let-7a ima ulogu u diferencijaciji embrionalnih progenitora u neurone dok miRNA let-7b regulira proliferaciju i diferencijaciju neuralnih matičnih stanica (*88*).

Tijekom neuralne diferencijacije miRNA let-7b pojačano je izražena u središnjem živčanom sustavu sisavaca. MiRNA let-7b regulira proliferaciju i diferencijaciju neuralnih matičnih stanica ciljnim djelovanjem na regulator matičnih stanica TLX i na regulator staničnog ciklusa ciklin D1. Pojačana izraženost miRNA let-7b uzrokuje povećanu neuralnu diferencijaciju matičnih neuralnih stanica i njihovu smanjenu proliferaciju dok prigušivanje gena za miRNA let-7b rezultira povećanom proliferacijom matičnih neuralnih stanica (*88*).

Kod perinatalnih ozljeda mozga iz oštećenih neurona i imunoloških stanica oslobađa se miRNA let-7b i uzrokuje povećanje neuronalne stanične smrti te inducira neuroinflamaciju (*93*). Kroz aktivaciju TLR7 signalnog puta u mikrogliji i makrofazima miRNA let-7b inducira neurodegeneraciju (*88*).

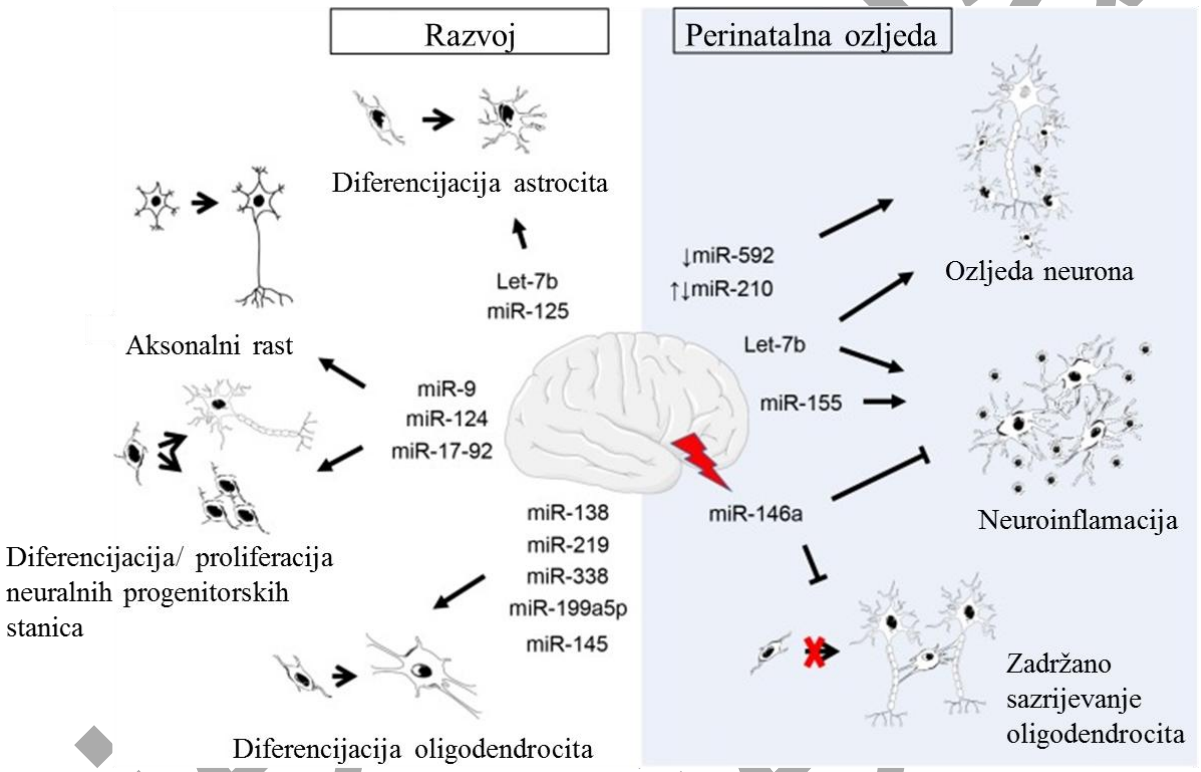
Izraženost miRNA let-7b u slini djece s autizmom slabija je od izraženost u djece koja ne boluju od autizma (*94*).

1.2.7 MiRNA 146a i miRNA let-7b kao potencijalni biomarkeri

MiRNA-146a i miRNA let-7b visoko su izražene u središnjem živčanom sustavu i imaju izuzetno važne uloge u održavanju homeostaze tijekom neuralnog razvoja. Izraženost miRNA let-7b i miRNA-146a mijenja se posljedično perinatalnoj ozljedi koja zahvaća različite tipove

Ocjena rada u tijeku

neuralnih stanica (Slika 5). Složeni međuodnosi miRNA nakon ozljede mogu definirati stupanj oštećenja moždanog tkiva i procese neuroinflamacije u mozgu u ranom stadiju razvoja ili u nezrelom mozgu što posljedično može dovesti do različitog stupnja motoričkog oštećenja kao i oštećenja kognitivnih funkcija (*95*).



Slika 5. MiRNA-146a i miRNA let-7b u razvoju središnjeg živčanog sustava i u perinatalnim ozljedama mozga. (Preuzeto i prilagođeno prema *Cho KHT i sur., Front Physiol,* 2019 (*95*))

Dijagnoza CP-a postavlja se relativno kasno, nakon duljeg kliničkog praćenja, a etiologija bolesti nije u potpunosti razjašnjena. Nameće se potreba za boljim razumijevanjem molekularnih procesa bolesti kao i identificiranjem biomarkera koji bi mogli doprinijeti ranijem postavljanju dijagnoze i identificiranju prognostički težih oblika bolesti.

MiRNA-146a i miRNA let-7b stabilno se izlučuju u slini. Uzimanje uzorka sline jednostavan je, financijski dostupan, lako ponovljiv i netraumatičan zahvat za dijete, a miRNA u slini u vezikulama i kompleksima s proteinima izuzetno su stabilne. Zbog jednostavnog uzorkovanja, prisutnosti miRNA let-7b i miRNA-146a u slini te ogromnog značaja navedenih miRNA za neurorazvoj, ovo istraživanje može doprinijeti boljem razumijevanju molekularne podloge CP-a i identificiranju navedenih miRNA kao potencijalnih biomarkera bolesti.

Ocjena u tijeku

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Odrediti prisutnost i izraženos miRNA-146a u slini djece s CP-om i u slini djece urednog motoričkog razvoja
2. Odrediti prisutnost i izraženost miRNA let7b u slini djece s CP-om i u slini djece urednog motoričkog razvoja
3. Usporediti izraženost miRNA-146a u slini djece s CP-om u odnosu na izraženost u slini djece urednog motoričkog razvoja
4. Usporediti izraženost miRNA let7b u slini djece s CP-om u odnosu na izraženost u slini djece urednog motoričkog razvoja
5. Usporediti razlike u izraženost i miRNA let 7b i miRNA-146a kod svih ispitanika prema spolu, dobi, perinatalnim čimbenicima, motoričkoj disfunkciji i komorbiditetu

2.1 Hipoteza

Izraženost miRNA let7b i miRNA-146a bit će promijenjena u slini djece s cerebralnom paralizom u odnosu na izraženost u slini djece urednog motoričkog razvoja.

2.2 Očekivani znanstveni doprinos

Postavljanje dijagnoze cerebralne paralize je zahtjevno i prethodi mu duži period kliničkog praćenja. Brojne metaboličke i genetske bolesti mogu imati sličnu kliničku sliku. Temeljem rezultata našeg istraživanja očekujemo bolje razumijevanja etiopatogeneze i molekularnih promjena odgovornih za nastanak bolesti te moguću primjenu miRNA let-7b i miRNA-146a kao biomarkera bolesti i/ili potencijalnih terapijskih meta.

Ocjena rada u tijeku

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Dizajn istraživanja

Probir i uključivanje ispitanika trajalo je u razdoblju od ožujka 2022. g. do studenog 2022. g., a provedeno je u Specijalnoj bolnici za zaštitu djece s neurorazvojnim i motoričkim smetnjama, Zagreb.

Prije uzorkovanja sline roditelji svih ispitanika su informirani o istraživanju te su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

Svi uzorci i podaci o ispitanicima su bili kriptirani, a istraživanje je provedeno u skladu sa svim važećim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje postupaka uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju i Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske. Prije početka istraživanja dobivene su sve etičke dozvole od nadležnih Etičkih povjerenstava:

Odluka Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zgarebu, Ur.broj 380-59-10106-22-111/111, 18.7.2022 i Etička dopusnica Specijalne bolnice za zaštitu djece s neurorazvojnim i motoričkim smetnjama Zagreb, Goljak. Ur.broj 145/202, 27.1.22.

3.2 Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 54 ispitanika, od čega 27 s potvrđenom dijagnozom CP-a i 27 kontrolnih ispitanika koji ne boluju od CP-a što bi trebalo biti dovoljno ispitanika jer je analiza snage testa provedena pomoću MedCalc® Statistical Software version 20 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2021) i uzimajući u obzir rezultate dosadašnjih istraživanja miRNA pokazala da je za snagu testa od 80 % i razinu značajnosti α od 0,05 u istraživanje potrebno uključiti najmanje 50 ispitanika, odnosno 25 po skupini. U kontrolnu skupinu uključeni su ispitanici urednog motoričkog razvoja koji nisu imali nikakav komorbiditet (populacija zdrave djece) bez poznatih perinatalnih čimbenika rizika.

Uključni kriteriji za ispitanike s CP-om su bili: postavljena dijagnoza bolesti prema kriterijima Europske mreže za nadzor cerebralne paralize.

Isključni kriteriji za ispitanike s CP-om su bili: definirani neurogenetski sindromi, progresivni neurološki poremećaji, nasljedne metaboličke i heredodegenerativne bolesti, oštećenja

Ocjena rada u tijeku

kralježnične moždine i hipotonija kao zaseban entitet, infekcije usne šupljine i/ili druge bolesti usne šupljine.

Uključni kriteriji za kontrolnu skupinu je bio uredan motorički razvoj.

Isključni kriteriji za kontrolnu skupinu su bili: neurorazvojne smetnje i djeca s perinatalnim čimbenicima rizika, infekcije usne šupljine i/ili druge bolesti usne šupljine.

Svim ispitanicima uključenim u istraživanje prikupljen je uzorak sline te klinički i anamnestički podaci (spol, dob, stupanj motoričkog oštećenja, komorbiditet).

3.3 Biološki materijal

3.3.1 Prikupljanje i pohrana uzoraka sline

Za prikupljanje i pohranu sline korišten je set DNA/RNA Shield™ Saliva Collection Kit (R1210, Zymo Research, Njemačka) koji olakšava uzorkovanje i osigurava stabilnost uzorka tijekom skladištenja i transporta na sobnoj temperaturi.

Ispitanici su 30 minuta nakon pranja zubi običnom vodom i četkicom za zube dali (ispljunuli) uzorak nestimulirane sline u plastičnu tubicu s lijevkom. Uzorci su prikupljeni između 8 i 11 sati ujutro. Potom je slina pomiješana s tekućinom za stabilizaciju DNA/RNA u jednakim omjerima. Uzorci su transportirani na Zavod za biologiju na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je unutar mjesec dana od uzorkovanja iz njih izolirana ukupna RNA.

3.3.2 Izolacija RNA iz sline

Za izolaciju RNA iz sline korišten je set Quick-cfRNA Serum & Plasma Kit (R1059, Zymo Research, Njemačka). S obzirom da je nakon kupnje ovog seta ustanovljeno da tekućina za stabilizaciju lizira stanice, protokol za izolaciju je modificiran na način da omogućava bolju izolaciju i slobodne i stanične RNA i to u dogovoru s proizvođačem seta. U 800 µL uzorka (400 µL sline + 400 µL tekućine za stabilizaciju) dodano je 20 µL proteinaze K, epruvetica je vorteksirana i stavljena dva sata u termoblok pri 37 °C. Potom je sadržaj epruvetice prebačen u veću epruvetu volumena 10 ml u koju je dodano 800 µL pufera za digestiju (Quick-cfRNA™ Digestion Buffer). Nakon 10 s vorteksiranja u epruvetu je dodano 1600 µL pufera za vezivanje (Quick-cfRNA™ Binding Buffer). Uzorak je vorteksiran 10 s te je dodano 4800 µL 100%-tnog izopropanola. Nakon vorteksiranja 10 s uzorak je centrifugiran 10 min pri najvećoj brzini (4136 x g) i sobnoj temepraturi. Pripremljena je vakuum stanica na način da je lijevak umetnut u kolonu (Spin-Away™ Filter) spojenu na vakuumski *manifold*. Supernatant je preliven u lijevak te je pod tlakom propušten kroz kolonu pri čemu je RNA

Ocjena rada u tijeku

ostala vezana za membranu kolone. Kolonica je isprana sa 600 µL pufera (RNA Prep Buffer) te je prebačena u epruveticu za kolekciju uzorka i centrifugirana 2 min pri 13 000 RCF kako bi se isprao zaostali pufer. Potom je kolonica prebačena u novu epruveticu te je na nju dodano 200 µL pufera (RNA Recovery Buffer). Nakon inkubacije 3 min, kolonica s epruveticom je centrifugirana 2 min pri 13 000 RCF. Eluat je pomiješan s 300 µL 100 %-tnog etanola te je smjesa prenesena na novu kolonu (Zymo-Spin™ IC Column) umetnutu u novu epruveticu za kolekciju uzorka. Nakon centrifugiranja 2 min pri 13 000 RCF na kolonu je dodano 400 µL pufera (RNA Prep Buffer) te je ponovno centrifugirana 2 min pri 13 000 RCF. Kolona je isprana dva puta s puferom RNA Wash Buffer (prvo sa 700 µL pa s 400 µL) te centrifugirana oba puta 2 min pri 13 000 RCF. Kolona je prebačena u novu epruveticu te je na nju dodano 12 µL vode bez nukleaza. Nakon inkubacije 2 min RNA je elutirana s kolone centrifugiranjem 2 min pri 13 000 RCF.

Koncentracija izolirane RNA izmjerena je spektrofotometrijski na uređaju Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, SAD). Izolirana RNA pohranjena je pri -80 °C do daljnje analize.

3.3.3 Kvantifikacija miRNA u slini

Izolirana RNA je prepisana u cDNA metodom reverzne transkripcije koristeći set TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (A28007, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) i uređaj C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Relativna količina odabranih miRNA u uzorcima određena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time or Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) na kalupu cDNA iz prijašnjeg koraka. S obzirom na to da se sekvence miRNA unutar porodice let-7 razlikuju u samo nekoliko nukleotida, za detekciju su korišteni TaqMan eseji jer su bolje specifičnosti od SYBR Green tehnologije. Sastav reakcijske smjese naveden je u tablici 5. Za svaku miRNA korišten je poseban set početnica i proba TaqMan™ Advanced miRNA Assay (Tablica 6).

Ocjena rada u tijeku

Tablica 5. Sastav qPCR reakcijske smjese

Komponenta	**Volumen (µL)**
SsoAdvanced Universal Probes Supermix (2x) (1725280, Bio-Rad Laboratories, Njemačka)	10
TaqMan™ Advanced miRNA Assay (20x) (A25576, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific,SAD)	1
cDNA	5
Voda bez nukleaza	4
Ukupan volumen	20

Tablica 6. Korišteni TaqMan™ Advanced miRNA Assay

miRNA	**Assay ID**
hsa-let-7b-5p	478576_mir
hsa-miR-146a-5p	478399_mir
hsa-miR-21-5p	477975_mir

Reakcije su izvođene u triplikatima u uređaju CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Njemačka) prema sljedećim uvjetima: aktivacija enzima pri 95°C tijekom 20 s, a zatim 40 ciklusa denaturacije (95°C 1 s) i vezivanje/amplifikacija (60°C 20 s, mjerenje količine fluorescencije).

Korištene su i odgovarajuće kontrole. Kako bi ispitali eventualnu kontaminaciju uzoraka s DNA, tijekom reverzne transkripcije jednom uzorku nije dodan enzim reverzna transkriptaza te je to bila kontrola reverzne transkrpcije (engl. *No reverse transcriptase control*, NRT). Kako bi ispitali kontaminaciju kemikalija s DNA, na svakoj pločici qPCR nalazio se uzorak kojem je umjesto cDNA dodana voda (engl. *No template control*, NTC).

Za očitavanje kvantifikacijskih ciklusa (Cq) miRNA molekula od interesa korišten je CFX Maestro Software (Bio-Rad Laboratories, Njemačka). Normalizacija podataka napravljena je prema miR-21. Rezultati su analizirani pomoću ΔΔCt metode, a prikazani grafički kao relativna promjena (engl. *Fold change, 2^-ΔΔCt*) u $\log_2$ skali.

Ocjena rada u tijeku

3.4 Statistička obrada podataka

Rezultati su pripremljeni za statističku analizu pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel, a sama statistička obrada podataka rađena je u računalnom programu GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, SAD). Zbog malog broja uzoraka, korišteni su neparametrijski statistički testovi. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Mann-Whitney U test korišten je za usporedbu kvantitativnih vrijednosti između dvije nezavisne skupine, a Kruskal-Wallisov test s naknadnim Dunnovim testom za usporedbu između više od dvije skupine. Rezultati deskriptivne statistike prikazani su tablično, a ostali rezultati grafički koristeći medijan s interkvartilnim rasponom. Sve p-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Povezanost ispitivanih varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Dijagnostička točnost koncentracije RNA ili relativne promjene odabranih miRNA među skupinama ispitana je analizom krivulje odnosa specifičnosti i osjetljivosti (engl. *receiver operating characteristics*, ROC) krivulje u program GraphPad Prism. Dijagnostička točnost kombinacije varijabli ispitana je koristeći logističku regresiju u programu MedCalc® Statistical Software version 20.110 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

Ocjena rada u tijeku

4. REZULTATI

4.1 Opća i klinička obilježja ispitanika

U istraživanju je ukupno sudjelovalo 54 ispitanika, od kojih 27 ispitanika koji boluju od CP-a i 27 ispitanika kontrolne skupine koji imaju uredan motorički razvoj, nemaju dijagnozu CP-a niti dijagnozu bilo koje druge bolesti kao niti poznate perinatalne čimbenike rizika.

Medijan dobi kontrolne skupine iznosio je 9 godina (interkvartilni raspon 5,5 – 12 godina), a medijan ispitanika s CP je 7,5 godina (interkvartilni raspon 6 – 13 godina) te se skupine ispitanika nisu statistički značajno razlikovale u dobi (p = 0,799, Mann-Whitney U-test) (Tablica 7). U jednoj i u drugoj skupini bilo je po 13 djevojčica i 14 dječaka (p = >0,9999, Fisherov egzaktni test).

Tablica 7. Raspodjela ispitanika prema dobi i spolu.

	Kontrolna skupina (N = 27)	**Ispitanici s CP-om (N = 27)**	**p - vrijednost**
Dob (medijan, interkvartilni raspon)	9 (5,5 - 12)	7,5 (6 - 13)	0,799
Djevojčice **(N)**	13	13	
Dječaci **(N)**	14	14	>0,9999

Tri ispitanika s CP-om imaju grubu motoričku funkciju stupnja I, 11 ispitanika stupnja II, 5 ispitanika stupnja IV te 8 ispitanika stupnja V. U istraživanje nije bio uključen niti jedan ispitanik s grubom motoričom funkcijom stupnja III (Tablica 8).

Većina ispitanika s CP-om (56%) ima bilateralni tip, a 37% unilateralni tip spastičnog oblika. Dva ispitanika (7%) imaju miješani oblik.

Poteškoće u govoru ima 19 (70%) ispitanika s CP-om te ih isto toliko ima i oštećen vid. Poteškoće s govorom i vidom ima 17 (63%) ispitanika.

Epilepsiju ima 9 (33%) ispitanika s CP-om te svi imaju i poteškoće govora i vida.

Ocjena rada u tijeku

Tablica 8. Raspodjela ispitanika s CP-om prema gruboj motoričkoj funkciji, neurološkim simptomima , funkciji vida, funkciji govora i prisutnosti epilepsije

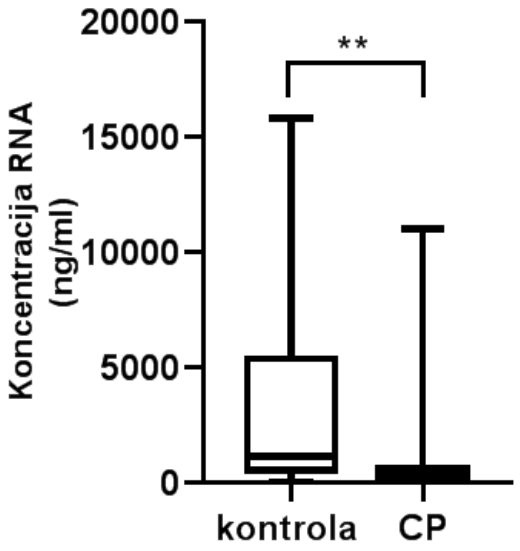
Raspodjela ispitanika s CP-om prema gruboj motoričkoj funkciji (GMFC)	
Stupanj I (N, %)	3 (11%)
Stupanj II (N, %)	11 (41%)
Stupanj III (N, %)	0 (0%)
Stupanj IV (N, %)	5 (18%)
Stupanj V (N, %)	8 (30%)
Raspodjela ispitanika s CP-om prema neurološkim simptomima	
Bilateralni spastični oblik (N, %)	15 (56%)
Unilateralni spastični oblik (N, %)	10 (37%)
Drugi oblici (N, %)	2 (7%)
Raspodjela ispitanika s CP-om prema funkciji vida	
Oštećen vid (N, %)	19 (70%)
Neoštećen vid (N, %)	8 (30%)
Raspodjela ispitanika s CP-om prema funkciji govora	
Teškoće govora (N, %)	19 (70%)
Bez teškoća govora (N, %)	8 (30%)
Raspodjela ispitanika s CP-om prema prisutnosti epilepsije	
Ima epilepsiju (N, %)	9 (33%)
Nema epilepsiju (N, %)	18 (67%)

4.2 Ukupna RNA

4.2.1 Koncentracija ukupne RNA u slini istraživanih skupina

Izmjerena je koncentracija ukupne RNA u slini ispitanika s CP-om i u kontrolnoj skupini, a rezultat se odnosi na koncentraciju u slini pomiješanoj s tekućinom za stabilizaciju. Medijan koncentracije RNA u slini kontrolne skupine iznosio je 1170 ng/ml (interkvartilni raspon 564,7 - 5407), a u slini CP skupine 459,8 ng/ml (interkvartiln raspon 184,8 - 644) (Slika 6). Ispitanici iz kontrolne skupine imali su statistički značajno višu koncentraciju RNA u slini naspram ispitanika s CP-om ($p = 0,0018$, Mann-Whitneyjev U-test).

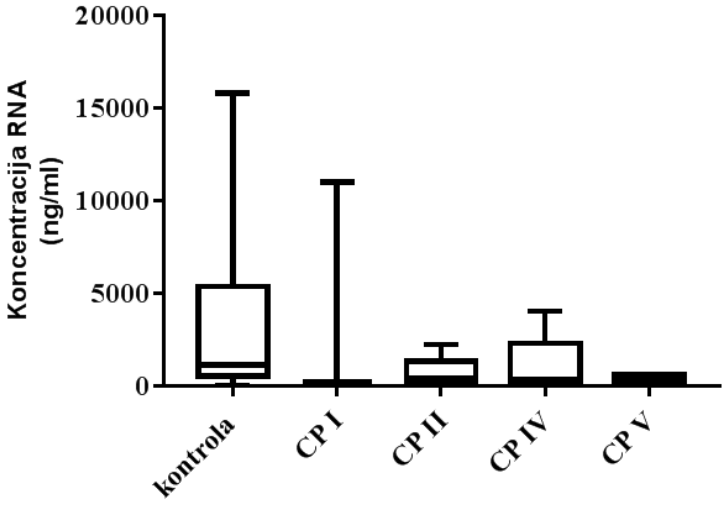
Ocjena rada u tijeku



Slika 6. Koncentracija ukupne RNA u slini ispitivanih skupina. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicom (** p -vrijednost ≤ 0,01).

4.2.2 Koncentracija ukupne RNA prema stupnju motoričke disfunkcije

Ispitana je ovisnost koncentracije ukupne RNA prema stupnju motoričke disfunkcije u skupini ispitanika s CP-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji RNA između pojedinih skupina GMFC (p = 0,1730 – 0,9999, Kruskal-Wallis analiza s naknadnim Dunnovim testom) (Slika 7).



Ocjena rada tijeku

Slika 7. Koncentracija ukupne RNA u slini ispitivanih skupina s obzirom na GMFC stupanj. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću.

U tablici 9 prikazane su deskriptivne vrijednosti koncentracija RNA (ng/ml) u svakoj pojedinoj podskupini motoričke disfunkcije.

Tablica 9. Deskriptivna statistika koncentracija RNA (ng/ml) po podskupinama

	kontrola	**CP I**	**CP II**	**CP IV**	**CP V**
Minimum	74,4	176	104,5	132	165
Donji kvartil	565,7	176	182,9	179,4	198,1
Medijan	1170	221,5	459,8	387,6	481,3
Gornji kvartil	5407	11043	1365	2317	622,6
Maksimum	15836	11043	2271	4055	644

Spearmanovom korelacijskom analizom nije nađena povezanost koncentracije RNA u slini i GMFC ($r = -0,04$, $p = 0,8276$).

4.2.3 Koncentracija ukupne RNA u slini ispitanika s CP-om prema zahvaćenosti tijela

Ispitano je postojanje razlika u koncentraciji RNA između ispitanika u ovisnosti sa spastičnim bilateralnim ili unilateralnim oblikom CP-a. Zbog malog broja ispitanika s drugim oblicima ($N = 2$), oni nisu uzimani u obzir. Nije nađena nikakva razlika u koncentraciji RNA između ispitanika s unilateralnim i ispitanika s bilateralnim oblikom CP-a ($p = 0,2164$, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Deskriptivna statistika koncentracija RNA (ng/ml) prema zahvaćenosti tijela

	Unilateralni spastični	**Bilateralni spastični**

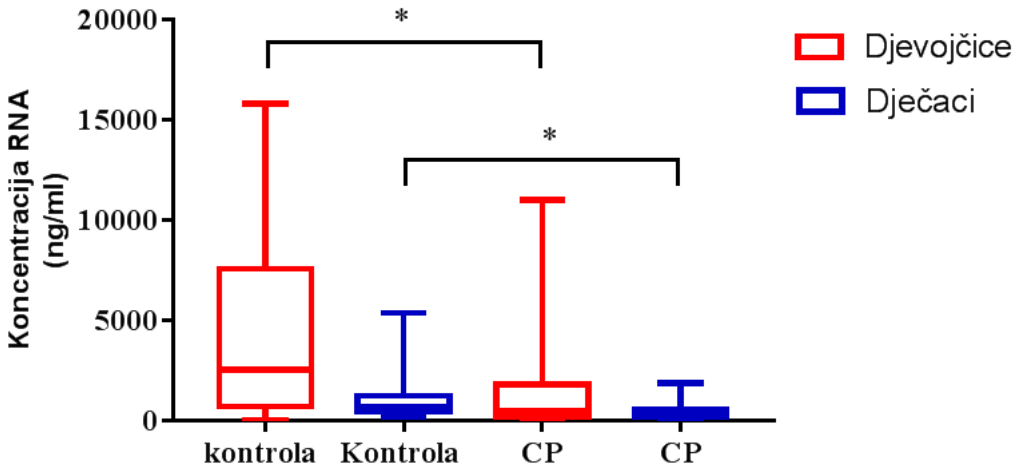
Ocjena rada u tijeku

	oblik (N = 10)	oblik (N = 15)
Minimum	104,5	132
Donji kvartil	159	233,6
Medijan	258,2	502,5
Gornji kvartil	764,5	644
Maksimum	11043	4055

4.2.4 Koncentracija ukupne RNA prema spolu

S obzirom na utvrđenu značajno nižu koncentraciju ukupne RNA u ispitanika s CP-om u odnosu na kontrolnu skupinu ispitano je jeli ova razlika prisutna i u ovisnosti o spolu. Koncentracija RNA niža je u djevojčica s CP (medijan 502,5, interkvartilni raspon 183,8 – 1818) nego u djevojčica iz kontrolne skupine (medijan 2567, interkvartilni raspon 717,4 – 7590). Koncentracija RNA niža je u dječaka s CP (medijan 34,65, interkvartilni raspon 0,06 – 1253) nego u dječaka iz kontrolne skupine (medijan 341,2, interkvartilni raspon 214,1 – 548,8). (Slika 8).

Oba spola kontrolne skupine imaju statistički značajno veću koncentraciju naspram istog spola CP skupine (djevojčice p = 0,0482, dječaci p = 0,0125, Mann-Whitneyjev U-test).



Original rad

Slika 8. Koncentracija RNA u slini ispitivanih skupina s obzirom na spol. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću. (* p-vrijednost < 0,05)

4.2.5 Koncentracija ukupne RNA prema ostalim značajkama ispitanika

Koncentracija ukupne RNA ne razlikuje se između ispitanika s CP-om i epilepsijom i ispitanika s CP-om bez epilepsije (p = 0,2120, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 11.

Tablica 11. Deskriptivna statistika koncentracija RNA (ng/ml) u slini ispitanika s CP-om s obzirom na prisutnost epilepsije

	CP ispitanici bez epilepsije (N = 18)	**CP ispitanici s epilepsijom (N = 9)**
Minimum	104,5	132
Donji kvartil	230,6	173,9
Medijan	519,4	226,9
Gornji kvartil	1013	533,5
Maksimum	11043	1910

Koncentracija ukupne RNA ne razlikuje se između ispitanika s CP-om s obzirom na sposobnost vida (p = >0,9999, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 12.

Tablica 12. Deskriptivna statistika koncentracija RNA (ng/ml) u slini ispitanika s CP-om s obzirom sposobnost vida

	CP ispitanici bez oštećenja vida s (N = 8)	**CP ispitanici s oštećenjem vida (N=19)**
Minimum	108	104.5
Donji kvartil	205.7	184.8

Ocjena rada u tijeku

Medijan	423.7	460
Gornji kvartil	1168	644
Maksimum	2271	11043

Koncentracija ukupne RNA ne razlikuje se između ispitanika s CP-om s obzirom na sposobnost govora (p = 0,8150, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 13.

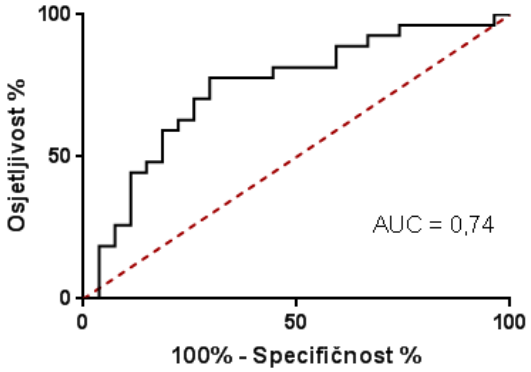
Tablica 13. Deskriptivna statistika koncentracija RNA (ng/ml) u slini ispitanika s CP-om s obzirom na funkciju govora

	CPispitanici bez poteškoća u govoru (N = 8)	**CP ispitanici s poteškoćama u govoru (N = 19)**
Minimum	108	104,5
Donji kvartil	187,4	184,8
Medijan	423,7	460
Gornji kvartil	2044	629,5
Maksimum	11043	4055

4.2.6 ROC analiza dijagnostičke značajnosti koncentracije RNA u slini

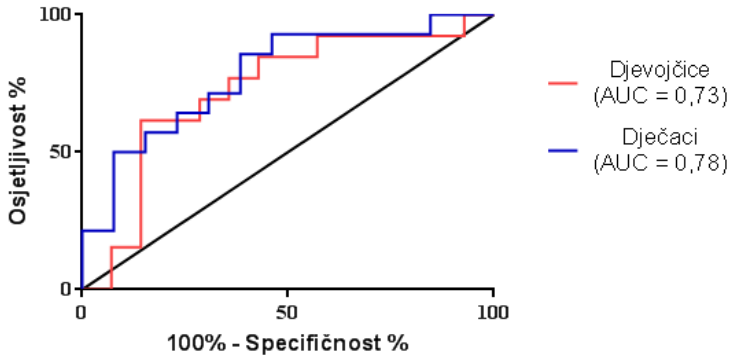
Kako bi se ocijenila sposobnost razlikovanja dvije skupine ispitanika koncentracijom RNA u slini, napravljena je analiza ROC krivulje. AUC iznosi 0,74 (p = 0,0021). Izračunavanjem Youdenovog indeksa dobivena je „*cut-off*" vrijednost koncentracije od 647,5 ng/ml za koju je osjetljivost 77,78 %, a specifičnost 70,37 % (Slika 9).

Ocjena rada u tijeku



Slika 9. ROC krivulja za koncentraciju RNA u slini

S obzirom da se koncentracija RNA razlikuje i između spolova, napravljena je ROC analiza osjetljivosti i specifičnosti te je dobivena bolja razlučivost između dječaka iz kontrolne skupine i dječaka s CP. Za diskrimnaciju dječaka iz kontrolne skupine od dječaka iz CP skupine AUC iznosi 0,78 (p = 0,0133). Izračunavanjem Youdenovog indeksa dobivena je „*cut-off*" vrijednost koncentracije od 608,3 ng/ml za koju je osjetljivost 85,71 %, a specifičnost 61,54 % (Slika 10). Za diskrimnaciju djevojčica iz kontrolne skupine od djevojčica iz CP AUC iznosi 0,73 (p = 0,0466). Izračunavanjem Youdenovog indeksa dobivena je „*cut-off*" vrijednost koncentracije od 640,3 ng/ml za koju je osjetljivost 61,54 %, a specifičnost 85,71 % (Slika 10).



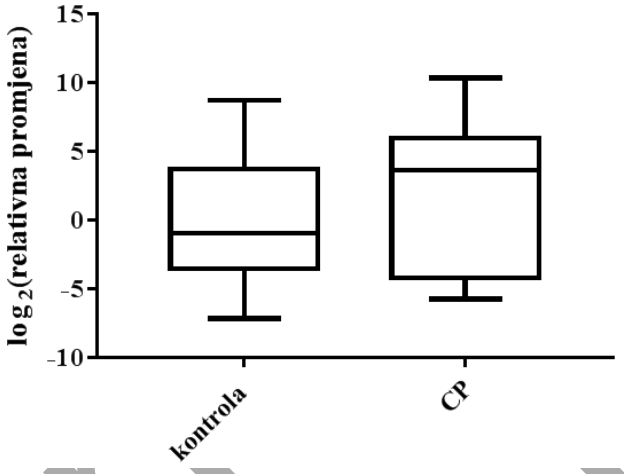
Slika 10. ROC krivulja za koncentraciju RNA u slini ovisno o spolu

Ocjena rada

4.3 MiRNA-146a

4.3.1 Izraženost miRNA-146a u slini istraživanih skupina

Izraženost miRNA-146a u kontrolnoj skupini i skupini ispitanika s CP-om prikazan je na slici 11. Medijan relativne promjene u kontrolnoj skupini iznosio je 0,53 (interkvartilni raspon 0,09 – 13,43), a medijan u skupini CP 12,56 (interkvartilni raspon 0,06 – 63,96). Iako je izraženost miRNA-146a u CP skupini veća, ta razlika nije statistički značajna (p = 0,1032, Mann-Whitney U-test).

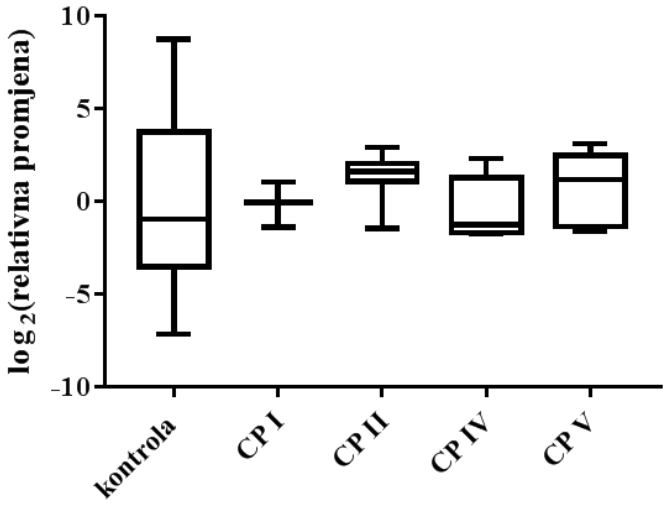


Slika 11. Relativna promjena miRNA-146a u u slini ispitivanih skupina. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću u log2 skali

4.3.2 Izraženost miRNA-146a u slini prema stupnju motoričke disfunkcije

Nadalje, ispitana je ovisnost izraženosti miRNA-146a prema stupnju motoričke disfunkcije. Nema statistički značajne razlike u izraženosti miRNA-146a između pojedinih skupina GMFC (p = 0,0968, Kruskal-Wallis analiza s naknadnim Dunnovim testom) (Slika 12).

Ocjena u tijeku



Slika 12. Relativna promjena miRNA-146a u slini ispitivanih skupina s obzirom na GMFC stupanj. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću u $\log_2$ skali

U tablici 14 prikazane su deskriptivne vrijednosti relativne promjene izraženosti miRNA-146a u svakoj pojedinoj podskupini motoričke disfunkcije.

Tablica 14. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA-146a po podskupinama

	Kontrola	**CP I**	**CP II**	**CP IV**	**CP V**
Minimum	0,01	0,04	0,04	0,02	0,02
Donji kvartil	0,09	0,04	12,56	0,025	0,045
Medijan	0,53	0,89	42,17	0,06	19,18
Gornji kvartil	13,43	11,35	119,1	107,3	439,2
Maksimum	437,9	11,35	851,2	212,7	1346

Spearmanovom korelacijskom analizom nije nađena povezanost izraženosti miRNA-146a i stupnja motoričke disfunkcije GMFC ($r = -0,04$, $p = 0,8276$).

4.3.3 Izraženost miRNA-146a u slini ispitanika s CP prema zahvaćenosti tijela

Ispitano je postojanje razlika u izraženosti miRNA-146a između ispitanika sa spastičnim oblikom CP, bilateralnim ili unilateralnim. Zbog malog broja ispitanika s drugim oblicima (N

Ocjena rada u tijeku

= 2), oni nisu uzeti u obzir. Nije nađena nikakva razlika u izraženosti miRNA-146a između ispitanika s unilateralnim i ispitanika s bilateralnim oblikom CP-a (p = 0,9457, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 15.

Tablica 15. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA-146a prema zahvaćenosti tijela

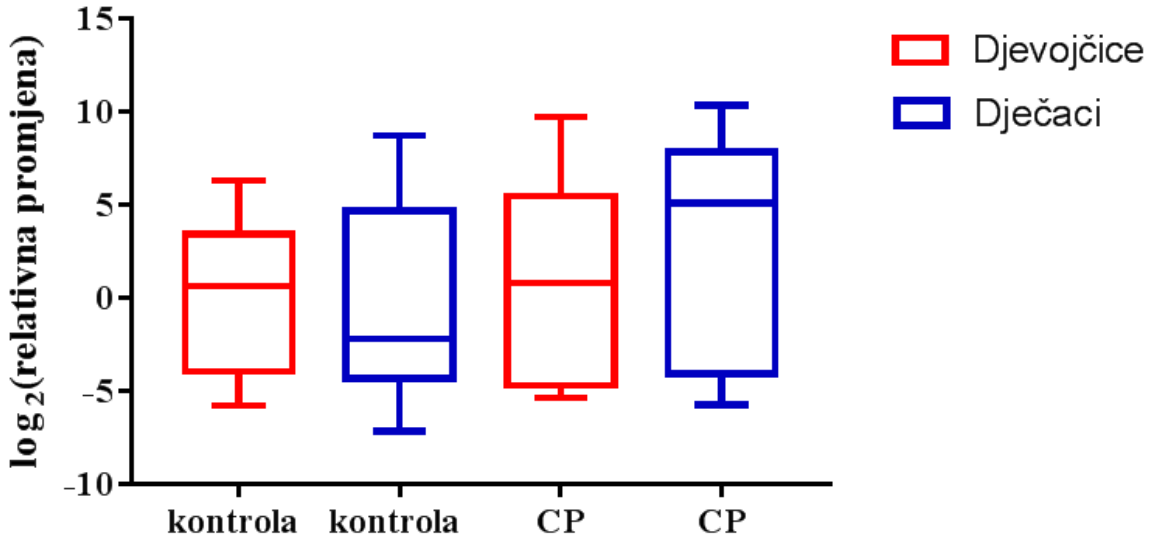
	Unilateralni spastični oblik (N = 10)	**Bilateralni spastični oblik (N = 15)**
Minimum	0,04	0,02
Donji kvartil	0,055	0,04
Medijan	21,53	30,15
Gornji kvartil	77,75	212,7
Maksimum	851,2	1346

4.3.4 Izraženost miRNA-146a u slini prema spolu

MiRNA-146a više je eksprimirana u dječaka s CP-om (medijan 34,65, interkvartilni raspon 0,06 – 243,3) nego u dječaka iz kontrolne skupine (medijan 0,23, interkvartilni raspon 0,06 – 26,73), dok je medijan izraženosti u djevojčica sličan (kontrola 2,08, interkvartilni raspon 0,075 – 11,14; CP 1,8, interkvartilni raspon 0,04 – 46,65) (Slika 13).

Međutim, nema statistički značajne razlike u izraženosti miRNA-146a između djevojčica iz kontrolne i djevojčica iz CP skupine (p = 0,5904, Mann-Whitney U-test) niti između dječaka iz kontrolne i dječaka iz CP skupine (p = 0,1245, Mann-Whitney U-test).

Ocjena rada u tijeku



Slika 13. Relativna promjena miRNA-146a u slini ispitivanih skupina s obzirom na spol. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću u $\log_2$ skali

4.3.5 Izraženost miRNA-146a prema ostalim značajkama ispitanika

Izraženost miRNA-146a ne razlikuje se između ispitanika s CP-om i epilepsijom i ispitanika s CP-om bez epilepsije (p = 0,9295, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 16.

Tablica 16. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA-146a u slini ispitanika s CP-om s obzirom na prisutnost epilepsije

	CP ispitanici bez epilepsije (N = 18)	**CP ispitanici s epilepsijom (N = 9)**
Minimum	0,02	0,04
Donji kvartil	0,04	0,06
Medijan	22,14	8,2
Gornji kvartil	77,75	125,1
Maksimum	1346	566,5

Ocjena rad u tijeku

Izraženost miRNA-146a ne razlikuje se između ispitanika s obzirom na sposobnost vida (p = 0,5923, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 17.

Tablica 17. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA-146a u slini ispitanika s CP-om s obzirom na sposobnost vida

	CP ispitanici bez oštećenja vida s (N = 8)	**CP ispitanici s oštećenjem vida (N = 19)**
Minimum	0,02	0,02
Donji kvartil	2,883	0,04
Medijan	36,94	8,2
Gornji kvartil	60,25	119,1
Maksimum	851,2	1346

Izraženost miRNA-146a ne razlikuje se između ispitanika s CP-om s obzirom na funkciju govora (p = 0,9475, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 18.

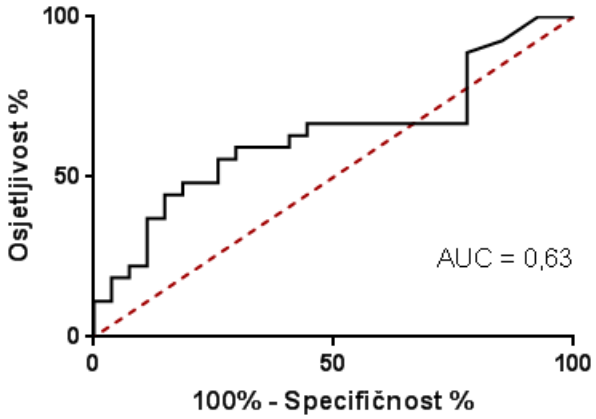
Tablica 18. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA-146a u slini ispitanika s CP-om s obzirom na funkciju govora

	CP ispitanici bez poteškoća u govoru (N = 8)	**CP ispitanici s poteškoćama u govoru (N = 19)**
Minimum	0,02	0,02
Donji kvartil	0,2525	0,06
Medijan	26,76	12,56
Gornji kvartil	60,25	119,1
Maksimum	851,2	1346

Ocjena rada u tijeku

4.3.6 ROC analiza dijagnostičke značajnosti miRNA-146a u slini

Iako nema statistički značajne razlike u relativnoj izraženosti ove miRNA između skupina, napravljena je analiza ROC krivulje. Za ispitivanu miRNA AUC iznosi 0,63 (p = 0,1021). Izračunavanjem Youdenovog indeksa dobivena je „*cut-off*" vrijednost izraženosti od 8,095 za koju je osjetljivost 59,26 %, a specifičnost 70,37 % (Slika 14).



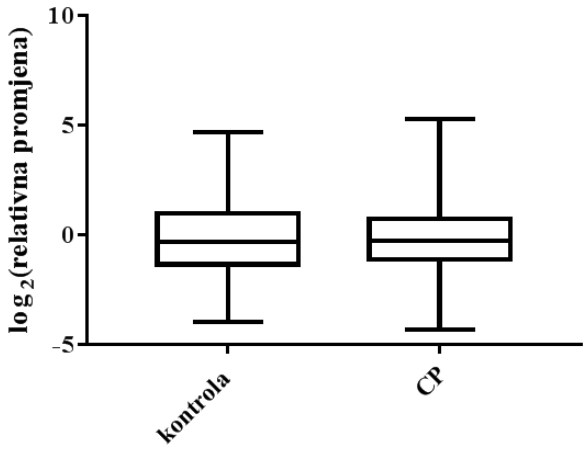
Slika 14. ROC krivulja za izraženost miRNA-146a u slini

4.4 MiRNA let-7b

4.4.1 Izraženost miRNA let-7b u slini istraživanih skupina

Izraženost miRNA let-7b u kontrolnoj skupini i skupini ispitanika s CP-om prikazana je na slici 15. Medijan relativne promjene u kontrolnoj skupini iznosio je 0,82 (interkvartilni raspon 0,40 – 2,01), a medijan u skupini CP 0,84 (interkvartilni raspon 0,47 – 1,68) te razlika među skupinama nije statistički značajna (p = 0,9760, Mann-Whitney U-test).

Ocjena u tijeku

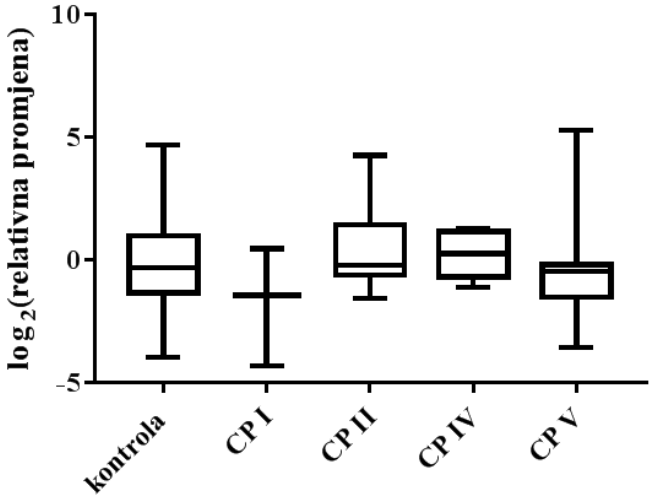


Slika 15. Relativna promjena miRNA let-7b u u slini ispitivanih skupina. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću u $\log_2$ skali

4.4.2 Izraženost miRNA let-7b u slini prema stupnju motoričke disfunkcije

Nema statistički značajne razlike u izraženosti miRNA let-7b između pojedinih skupina GMFC ($p = > 0.9999$, Kruskal-Wallis analiza s naknadnim Dunnovim testom) (Slika 16).

Ocjena rada u tijeku



Slika 16. Relativna promjena miRNA let-7b u slini ispitivanih skupina s obzirom na GMFC stupanj. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću u $\log_2$ skali

U tablici 19 prikazane su deskriptivne vrijednosti relativne promjene izraženosti miRNA let-7b u svakoj pojedinoj podskupini motoričke disfunkcije.

Tablica 19. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA let-7b po podskupinama

	Kontrola	**CP I**	**CP II**	**CP IV**	**CP V**
Minimum	0,06	0,05	0,34	0,47	0,09
Donji kvartil	0,4	0,05	0,66	0,655	0,355
Medijan	0,82	0,37	0,88	1,21	0,74
Gornji kvartil	2,01	1,39	2,75	2,26	0,8875
Maksimum	25,83	1,39	19,3	2,42	39,27

Spearmanovom korelacijskom analizom nije nađena povezanost izraženosti miRNA let-7b i GMFC ($r = -0,02$, $p = 0,9181$).

4.4.3 Izraženost miRNA let-7b u slini ispitanika s CP-om prema zahvaćenosti tijela

Ispitano je postojanje razlika u izraženosti miRNA let-7b između ispitanika sa spastičnim oblikom CP-a (bilateralni ili unilateralni). Zbog malog broja ispitanika s drugim oblicima (N

Ocjena rada u tijeku

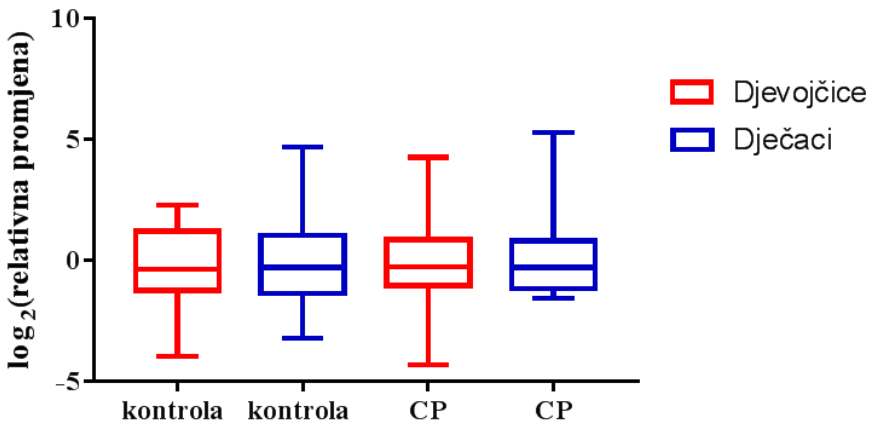
= 2), oni nisu uzimani u obzir. Nije nađena nikakva razlika u izraženosti između ispitanika s unilateralnim i ispitanika s bilateralnim oblikom CP-a (p = 0,8170, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 20.

Tablica 20. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA let-7b prema zahvaćenosti tijela

	Unilateralni spastični oblik (N = 10)	**Bilateralni spastični oblik (N = 15)**
Minimum	0,05	0,34
Donji kvartil	0,445	0,47
Medijan	0,805	0,85
Gornji kvartil	1,775	2,1
Maksimum	19,3	39,27

4.4.4 Izraženost miRNA let-7b u slini prema spolu

Izraženost miRNA let-7b ne razlikuje se po spolovima (Slika 17) pa je tako medijan relativne promjene u djevojčica iz kontrolne skupine 1,52 (interkvartilni raspon 0,39– 5,743), djevojčica iz CP skupine 0,51 (interkvartilni raspon 0,06 – 7,84, p = 0,8395, Mann-Whitney U-test), dječaka iz kontrolne skupine 2,63 (interkvartilni raspon 1,605 – 14,87), dječaka iz CP skupine 9,685 (interkvartilni raspon 2.38 – 18,04, p = 0,4296, Mann-Whitney U-test).



Ocjena rada tijeku

Slika 17. Relativna promjena miRNA let-7b u slini ispitivanih skupina s obzirom na spol. Rezultati su prikazani medijanom, interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednošću u log2 skali

4.4.5 Izraženost miRNA let-7b prema ostalim značajkama ispitanika

Izraženost miRNA let-7b ne razlikuje se između ispitanika s CP-om i epilepsijom i ispitanika s CP-om bez epilepsije (p = 0,9100, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 21.

Tablica 21. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA let-7b u slini ispitanika s CP-om s obzirom na prisutnost epilepsije

	CP ispitanici bez epilepsije (N = 18)	**CP ispitanici s epilepsijom (N = 9)**
Minimum	0,05	0,09
Donji kvartil	0,3925	0,635
Medijan	0,725	0,85
Gornji kvartil	2,263	1,29
Maksimum	39,27	2,42

Izraženost miRNA let-7b ne razlikuje se između ispitanika s obzirom na funkciju vida (p = 0,0599, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 22.

Tablica 22. Deskriptivna statistika relativne promjene miRNA let-7b u slini ispitanika s CP-om s obzirom na funkciju vida

	CP ispitanici bez oštećenja vida (N = 8)	**CP ispitanici s oštećenim vidom (N = 19)**
Minimum	0,47	0,05
Donji kvartil	0,7225	0,37
Medijan	1,745	0,8
Gornji kvartil	2,885	1,01
Maksimum	19,3	39,27

Ocjena rada u tijeku

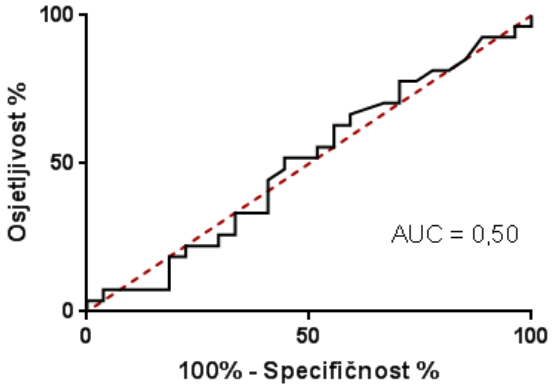
Izraženost miRNA let-7b ne razlikuje se između ispitanika s CP s obzirom na funkciju govora (p = 0,6680, Mann-Whitneyjev U-test), a rezultati deskriptivne statistike prikazani su u tablici 23.

Tablica 23. Deskriptivna statistika relativne promjene let-7b u slini ispitanika s CP-om s obzirom na funkciju govora

	CP ispitanici bez poteškoća u govoru (N = 8)	**CP ispitanici s poteškoćama u govoru (N = 19)**
Minimum	0,05	0,09
Donji kvartil	0,395	0,47
Medijan	1,06	0,84
Gornji kvartil	2,885	1,21
Maksimum	19,3	39,27

4.4.6 ROC analiza dijagnostičke značajnosti miRNA let-7b u slini

Iako nema statistički značajne razlike u izraženosti ove miRNA između skupina, napravljena je analiza ROC krivulje. Za ispitivanu miRNA ROC iznosi 0,50 (p = 0,9724). Izračunavanjem Youdenovog indeksa dobivena je „*cut-off*" vrijednost izraženosti od 0,67 za koju je osjetljivost 66,67 %, a specifičnost 40,74 % (Slika 18).



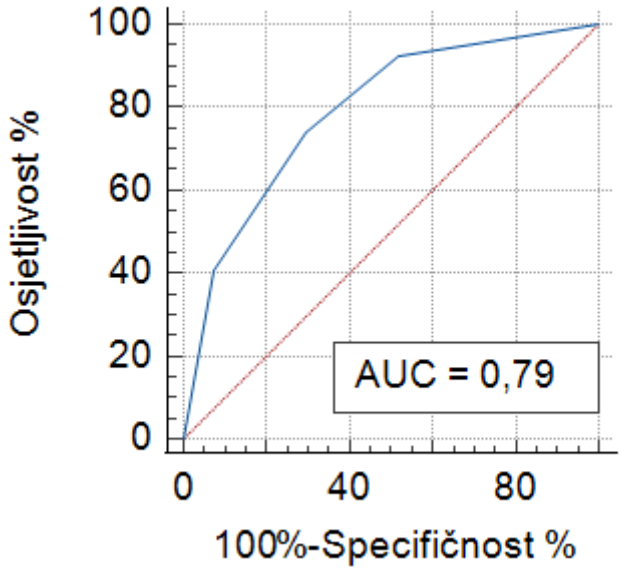
Slika 18. ROC krivulja za izraženost miRNA let-7b u slini

Ocjena rada tijeku

Ocjena rada u tijeku

4.5 Kombiniranje markera za bolju razlučivost

Ispitana je sposobnost razlikovanja dvaju skupina ispitanika kombiniranjem dvaju varijabli, tj. koncentracije RNA u slini i izraženosti miRNA-146a. Za ispitivanu kombinaciju AUC iznosi 0,79 (p = <0,0001), osjetljivost 74,07 %, a specifičnost 70,37 % (logistička regresija) (Slika 19) što je bolje od sposobnosti koncentracije RNA zasebno.



Slika 19. ROC krivulja za kombinaciju varijabli koncentracije RNA i relativnu promjenu miRNA-146a

S obzirom da je koncentracija RNA u slini pokazala veću diskriminatornu sposobnost između dječaka iz kontrolne skupine i dječaka s CP-om, ispitana je kombinacija koncentracije i relativne promjene miRNA-146a samo u skupini dječaka. Međutim, ova kombinacija u dječaka nema bolju dijagnostičku točnost naspram kombinacije u skupini dječaka i djevojčica zajedno, a tek neznatno je bolja od same koncentracije RNA u dječaka (AUC = 0,79, p = 0,0006, osjetljivost 57,14 %, specifičnost 84,62 %).

Zbog detektiranih gotovo nikakvih razlika u razini miRNA let-7b između skupina (p = 0,9760), kombiniranje ove varijable s koncentracijom ukupne RNA ili miRNA-146a nije imalo smisla.

Ocjenski primjerak u tijeku

5. RASPRAVA

Dijagnoza CP-a postavlja se relativno kasno. Unatoč poznatim čimbenicima rizika čak se 80% slučajeva CP-a smatra idiopatskima, a definiranje faktora rizika u novorođenčadi nije pouzdan pokazatelj razvoja bolesti.

Djeca s CP-om imaju brojne pridružene teškoće, između ostalog teškoće ponašanja, intelektualne teškoće i senzoričke teškoće, koje mogu otežati izvođenje dijagnostičkih pretraga. Također, djeca s CP-om su izložena nizu pregleda, pretraga i terapijskih postupaka te svakako u dijagnostici treba dati prednost neinvazivnom, sigurnom i lako ponovljivom postupku.

Postavljanje dijagnoze CP-a prvenstveno se temelji na anamnezi i prepoznavanju trajnog neprogresivnog motoričkog poremećaja od strane kliničara kroz niz kliničkih procjena neuromotornog statusa djeteta. Brojni su rizični čimbenici za nastanak CP-a i uključuju štetne događaje u perinatalnom razdoblju. Najčešći rizični čimbenici povezani s nastankom CP-a su vaskularni poremećaji, hipoksija, infekcije i razvojni poremećaji u nezrelom mozgu i/ili mozgu u razvoju. Navedeni čimbenici u interakciji s genetskim čimbenicima dovode do oštećenja različitih dijelova mozga i, posljedično, varijabilnog kliničkog očitovanja bolesti. U postavljanju dijagnoze CP-a važno je detaljno ispititati sve anamnestičke podatke i prepoznati rizične čimbenike. Novorođenčad s prepoznatim faktorima rizika za nastanak CP-a potrebno je pojačano nadzirati u smislu učestalih procjena neuromotornog statusa. Oko 10 % živorođene djece godišnje u Hrvatskoj smatra se neurorizičnom (*96*). No, rizični čimbenici ne vode nužno u bolest te navedenim pristupom izlažemo učestalim pregledima veći broj novorođenčadi urednog motoričkog razvoja što predstavlja opterećenje i stresnu situaciju za cijelu obitelj.

U postavljanju dijagnoze bolesti koriste se neuroslikovne metode prije svega UZV mozga i MR mozga. UZV mozga može prikazati intrakranijska krvarenja, vaskularne poremećaje, moždani inzult te hipoksično-ishemička oštećenja mozga (*97, 98*).

MR mozga može prikazati oštećenje bijele moždane tvari (PVL ili posljedice intraventrikularnog krvarenja ili kombinacija jednog i drugog), kortikalna oštećenja, oštećenja duboke sive tvari, različite razvojne anomalije mozga (shizencefalija, lizencefalija polimikrogirija) (*24*). MR mozga učinjen u očekivanom terminu poroda za prijevremeno rođenu novorođenčad ima bolju prediktivnu vrijednost za CP u odnosu na ponavljajuće UZV mozga učinjene u prva dva tjedna života, a kombinacija ponavljajućih UZV pregleda i MR-a mozga u očekivanom terminu poroda djeteta rezultira boljom predikcijom neurorazvojnih

Ocjena rada u tijeku

ishoda nego predikcija ishoda temeljena isključivo na pregledu MR-a mozga učinjenom u očekivanom terminu poroda djeteta (*99–101*).

Neuroslikovne metode važni su prognostički čimbenici za CP. UZV mozga ima specifičnost 82-86 %, no osjetljivost 29-43 %. MR mozga ima specifičnost 71-86 %, dok je osjetljivost oko 90 % što dovodi do zaključka da značajan dio djece s CP-om nema abnormalne nalaze neuroslikovnih pretraga. Treba uzeti u obzir i različitu dostupnost neuroslikovnih pretraga, vrijeme potrebno za očitanje i činjenicu da se MR mozga u većini slučajeva izvodi u općoj anesteziji (*29*).

S obzirom na još uvijek insuficijentne metode postavljanja dijagnoze nameće se potreba za poboljšanjem dijagnostike u smislu razvijanja testova koji nisu invazivni, lako se ponavljaju, dostupni su i jednostavni, a mogu dodatno olakšati postavljanje dijagnoze.

5.1 Slina kao dijagnostički medij

Zadnjih nekoliko desetljeća povećan je broj istraživanja sline kao mogućeg dijagnostičkog alata. Vodeći razlozi tomu su uzorkovanje, dostupnost uzorka te široki spektar molekula prisutnih u slini. Uzorkovanje sline je jednostavan neinvazivan postupak prihvaljive cijene. Uzimanje uzorka sline sigurnije je u odnosu na uzimanje uzorka seruma. Nije potrebno korištenje igli, a također nema potrebe za posebno educiranim i treniranim osobljem. Sakupljanje uzorka sline može se učiniti i u kućnim uvjetima jer uzorkovanje ne zahtijeva sofisticiranu opremu. U dječjoj dobi roditelj na vrlo jednostavan način može uzeti veći broj uzoraka sline kod kuće i time poštedjeti dijete odlaska u zdravstvenu ustanovu. Samo uzorkovanje, transport i čuvanje uzoraka jednostavnije je i ekonomičnije u odnosu na serum. Iz seruma u slinu dospijevaju različite molekule kao što su hormoni, antitijela, faktori rasta, enzimi, mikroorganizmi i njihovi metaboliti te je zbog toga slina odraz brojnih patofizioloških zbivanja u organizmu (*102*).

Potencijalni dijagnostički biljeg treba biti lako dostupan s obzirom na uzorkovanje biološkog materijala, imati mogućnost ponavljanja u različitim vremenima, lokacijama i populacijama, visoku specifičnost, visoku osjetljivost, treba dati brz rezultat i imati mogućnost primjene na velikim populacijskim skupinama (*66*).

Uzorkovanje sline je neinvazivno, ponovljivo i primjenjivo na velikim skupina te je stoga u ovom istraživanju biljega CP-a ispitan dijagnostički potencijal tri parametra u slini: količina ukupne RNA te izraženost miRNA 146a i let-7b.

Ocjena rada u tijeku

Većina istraživanja biljega u slini usmjerena je na identificiranje biljega bolesti usne šupljine (karijes, peridontalne bolesti, Sjögrenov sindrom i rak usne šupljine), dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, raka (pluća, gušterače, dojke i prostate) i virusnih infekcija (*103*). Međutim, rađena su i istraživanja salivarnih markera neurorazvojnih bolesti, većinom za ASD, poremećaj hiperaktivnosti i deficit pažnje (*66*).

U slini djece s CP-om do sada su provedena istraživanja u koncentraciji interleukina (IL-1β, IL-6, Il-8).

Prema dosadašnjim spoznajama do sada nije provedeno niti jedno istraživanje izraženosti ukupne RNA i miRNA u slini djece s CP-om te je ovo istraživanje prvo takve vrste (*104*).

5.2 Koncentracija ukupne RNA u slini

U ovom istraživanju prikupljen je uzorak nestimulirane sline 27 djece s CP-om i 27 zdrave djece te je iz 400 µl sline pomiješane s 400 µl tekućine za stabilizaciju izolirana ukupna RNA. Utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji ukupne RNA u slini djece s CP-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Ispitanici iz kontrolne skupine imali su statistički značajno višu koncentraciju RNA u slini naspram ispitanika s CP-om ($p = 0,0018$). Nisu nađene statistički značajne razlike u ukupnoj koncentraciji RNA u slini ispitanika s CP-om s obzirom na stupanj bolesti, pridruženost epilepsije, teškoću govora i teškoću vida, a također nije bilo statistički značajne razlike u ukupnoj koncentraciji RNA s obzirom na oblik bolesti (unilateralni u odnosu na bilateralni tip CP-a).

Uspoređujući koncentraciju ukupne RNA u slini djece po spolu, razlika je veća između dječaka nego djevojčica. Koncentracija ukupne RNA statistički je značajno niža kod dječaka s CP-om u odnosu na dječake iz kontrolne skupine ($p = 0,0125$) dok kod djevojčica ta razlika gotovo nije statistički značajna ($p = 0,0482$).

Razlika u koncentraciji RNA je odraz razlike u masi RNA i/ili volumenu proizvedene sline. Sastav sline i brzina proizvodnje sline pod utjecajem su brojnih faktora kao što su demografske osobine (rasa, spol, godine), cirkadijalni ritam, prehrambene navike, pušenje, krvarenje u ustima te bolesti usne šupljine (*62*, *63*). Kako bi se minimizirao utjecaj tih faktora na koncentraciju RNA u slini ispitanika, uzorkovanje je provedeno između 8 i 11 sati ujutro, a grupe ispitanika su ujednačene po spolu te, koliko je to bilo moguće, po dobi. Svi ispitanici su

Ocjena rada u tijeku

bijelci, a u studiju nisu uključena djeca s infekcijama usne šupljine i/ili s drugim bolestima usne šupljine.

Quritum i sur. usporedili su fizikalno-kemijska i biološka svojstva sline 80 djece s CP-om i 80 zdrave djece. Djeca s CP-om imala su statistički značajno više karijesa te manje ispuna i ekstrakcija liječenih zubi od zdrave djece dok kod trajnih zuba nije bilo značajne razlike. Nestimulirana brzina protoka sline, pH sline, puferska sposobnost i ukupni antioksidacijski kapacitet sline su statistički značajno manji u osoba s CP-om u odnosu na zdrave osobe. U gotovo polovini djece s CP-om istjecala je slina iz usta, dok navedeno nije uočeno kod niti jednog zdravog djeteta.

Zbog pojačanog slinjenja bilo bi za očekivati da djeca s CP-om imaju nižu koncentraciju RNA u slini, međutim, važno je naglasiti da pojačano slinjenje nije posljedica povećane proizvodnje sline već zahvaćenosti mišića koji sudjeluju u žvakanju i gutanju te poremećenom držanju glave i vrata (*105*). Osim toga, poznato je da neki lijekovi utječu na protok sline. Primjerice, GABA antiepileptici smanjuju brzinu protoka sline (*106*).

Nadalje, istraživanja su pokazala da više djece s CP-om ima gustu ili ljepljivu slinu u odnosu na zdravu djecu (35 % naspram 21,3 %), ali ta razlika nije bila statistički značajna. Također, detektirana je statistički značajna viša razina bakterije *S. mutans* u djece s CP-om naspram zdrave djece, što je vjerojatno posljedica slabe higijene, loših prehrambenih navika i slabijeg samočišćenja uslijed smanjenih oromotoričkih sposobnosti (*107*).

Vodeći problem u analizi ukupne RNA u slini je podrijetlo RNA. Većina RNA u slini potječe od bakterija u usnoj šupljini te ona pokazuje velike interindividualne razlike (*63*). Iako djeca s CP-om imaju statistički značajno više razine bakterije *S. mutans*, kvantifikacija 16S rRNA pomoću qPCR-a u slini ispitanika s CP-om i zdravih ispitanika pokazala je da između skupina nema razlike u količini 16S rRNA bakterija (*106, 107*).

Dakle, vjerojatno se koncentracija ukupne RNA u slini ispitanika s CP-om i zdravih ispitanika ne razlikuju zbog mase RNA ni volumena sline već zbog stabilnosti RNA. RNA molekule su jako labilne i osjetljive na brzu degradaciju prvenstveno zbog endonukleaza (*108*). Poznato je da je aktivnost RNaza povećana u slini onkoloških pacijenata i pacijenata oboljelih od cistične fibroze (*109, 110*).

Razina aktivnosti RNaza u slini pacijenata s CP-om nije poznata te bi se trebala ispitati, ali iz prije spomenute studije poznato je da je puferska sposobnost sline CP pacijenata smanjena (*107*).

Ocjena rada u tijeku

Ako je doista koncentracija RNA u slini pacijenata s CP-om smanjena uslijed povećane aktivnosti RNaza, vjerojatno bi onda sama aktivnost RNaza imala potencijala biti biljeg za CP. Nažalost, u ovom istraživanju aktivnost RNaza nije analizirana niti je moguća naknadna analiza zbog malog volumena prikupljene sline koja je kod većine ispitanika sva iskorištena za izolaciju RNA, a slina koja je i preostala pomiješana je sa stabilizatorom RNA.

Kod kvantifikacije RNA bitno je spomenuti i predanalitičke faktore koji na nju utječu. U istraživanju provedenom na 922 zdrave osobe analizirano je 1225 uzoraka sline kako bi se kvantificirala varijabilnost izraženosti miRNA ovisno o načinu uzimanja uzoraka (obrisak naspram ispljunutog uzorka), korištenje RNA stabilizatora te niza bioloških čimbenika (spol, dob, indeks tjelesne mase, vježba, kalorijski unos). Uočeno je da biološki čimbenici općenito utječu na manji broj miRNA. Analize razlika u izraženosti utvrdile su da najveću varijabilnost izraženosti miRNA u slini uzrokuje nedostatak RNA stabilizatora (*64*).

Sullivan i sur. ispitali su faktore koji prilikom uzorkovanja i obrade utječu na koncentraciju RNA u slini. Korištenje stabilizatora RNA*later* povećava prinos RNA prilikom izolacije duplo više nego dodavanje stabilizatora DNA/RNA *Shield*-a te tri puta više nego u uvjetima izolacije RNA bez stabilizatora, a također povećava i integritet RNA (*108*). U ovoj studiji za stabilizaciju RNA je korišten DNA/RNA *Shield* jer, za razliku od RNA*later*, djelotvornije inaktivira mikroorganizme (*111*).

Osim toga, u fokusu ovog istraživanja su bile samo miRNA, stabilne molekule koje se još k tome u slini većinom nalaze u egzosomima, a analiziranje koncentracije ukupne RNA nije prvotno bilo zamišljeno (*52*, *63*).

Na koncentraciju RNA u slini utječe i vrijeme posta prije uzorkovanja pa je tako koncentracija RNA nakon prekonoćnog posta čak četiri puta veća nego nakon hranjenja (*108*).

Iako za djecu nije ugodno dolaziti u zdravstvene ustanove i to još natašte radi uzorkovanja za ispitivanje biljega CP-a, slina kao dijagnostički medij u kombinaciji s DNA/RNA *Shield*-om omogućava jednostavno uzorkovanje sline nakon prekonoćnog posta kod kuće.

5.3 MiRNA kao potencijalni biomarkeri CP-a

miRNA se izlučuju u različitim biološkim tekućinama, a upravo se u slini (uz mlijeko i sjemensku tekućinu) nalazi najveći broj miRNA (*48*). Sve je veći broj istraživanja miRNA u

slini pacijenata s različitim bolestima prije svega onkološkim bolestima, autoimunim bolestima i upalnim stanjima. Neke miRNA postale su etablirani biomarkeri za određenu bolest (miRNA-940 i miRNA-3679-5p za karcinom gušterače), a miRNA-301a iz sline je obećavajuća molekula za dijagnozu karcinoma želuca (*112*). Brojna istraživanja su proučavala miRNA u slini i plazmi djece s ASD-om, poremećajem koji se javlja u ranom djetinjstvu i ima neka zajednička obilježja s CP-om (*69*). Kao i kod CP-a, i kod ASD-a se često javlja epilepsija s učestalošću od oko 20 % (*113*).

Dosadašnja istraživanja ukazala su potencijal nekih miRNA, između ostalih i miRNA let-7b i miRNA-146a, kao mogućih biomarkera ASD-a (*33, 72, 94*). Ova istraživanja su ograničena veličinom uzoraka i nekonzistentnim rezultatima, a do sada su proučavane miRNA samo u slini i plazmi, ne i u drugim tjelesnim tekućinama.

miRNA-146a i miRNA let-7b spadaju u 119 najčešćih miRNA u serumu i plazmi (*114*). Od izuzetne su važnosti za neurorazvoj, a izraženost im se mijenja u različitim ozljedama i bolestima središnjeg živčanog sustava. Obje miRNA visoko su zastupljene u slini. Istraživanja miRNA u djece s CP-om u bilo kojoj tjelesnoj tekućini su rijetka, a do sada, unatoč visokoj prisutnosti miRNA u ljudskoj slini ne postoje istraživanja koja su proučavala izraženost miRNA u slini djece s CP-om.

5.4 MiRNA -146a

Za ovo istraživanje odabrana je miRNA-146a zbog svoje središnje uloge u neuroinflamaciji (*83*). Nekoliko je istraživanja proučavalo izraženost miRNA u plazmi kod djece s faktorima rizika za nastanak CP-a.

Izraženost miRNA se razlikuje u plazmi novorođenčadi s moždanim krvarenjem evidentiranim UZV-om mozga u odnosu na novorođenčad bez krvarenja te u novorođenčadi s poremećajem mišićnog tonusa evidentiranim od strane neonatologa u odnosu na novorođenčad normalnog mišićnog tonusa. U istraživanju provedenom na novorođenčadi rođenoj prije 32. tjedna gestacije i porodne mase ispod 1500 g metodom qRT-PCR analizirana je izraženost 752 različite miRNA u 31 uzorku plazme. Promjene u izraženosti 23 različite miRNA uočene su u novorođenčadi s moždanim krvarenjem u odnosu na novorođenčad bez moždanog krvarenja. Kod novorođenčadi s abnormalnim mišićnim tonusom utvrđena je promjena u izraženosti 70 različititih miRNA u odnosu na novorođenčad normalnog tonusa. U novorođenčadi s abnormalnim tonusom i moždanim krvarenjem promjena se očitovala u izraženosti 30 miRNA u odnosu na novorođenčad bez moždanog krvarenja i normalnog

Ocjena rada u tijeku

mišićnog tonusa. U navedenom istraživanju niti jedno novorođenče s moždanim krvarenjem nije imalo znakove motoričkog poremećaja u korigiranoj dobi od 18 mjeseci što je dodatan pokazatelj da moždano krvarenje evidentirano UZV-om mozga nije siguran prognostički pokazatelj CP-a. 15 % novorođenčadi abnormalnog mišićnog tonusa imalo je u korigiranoj dobi od 18 mjeseci kliničke znakove CP-a što sugerira da je poremećaj mišićnog tonusa, iako slab, ipak nešto bolji prognostički čimbenik CP-a u odnosu na moždano krvarenje. Istraživanje je također pokazalo veće razlike u izraženosti miRNA kod novorođenčadi abnormalnog mišićnog tonusa u odnosu na novorođenčad s moždanim krvarenjem povezujući tako ulogu miRNA u nastanku CP. Izraženost miR-146a nije se razlikovala između novorođenčadi s obzirom na prisutnost moždanog krvarenja ili prisutnost moždanog krvarenja i abnormalnog mišićnog tonusa. Iako podaci o izraženost i miR-146a s obzirom na mišićni tonus nedostaju, s obzirom da nema razlike u prije navedenim skupinama za očekivati je da nema ni razlike s obzirom na mišićni tonus (*115*).

U ovom istraživanju, iako je izraženost miRNA-146a u slini djece s CP-om bila veća nego u slini djece koja ne boluju od CP-a, razlika nije statistički značajna. Također, nije pronađena statistički značajna razlika u izraženosti miRNA-146a s obzirom na spol, stupanj motoričke disfunkcije, oblik zahvaćenosti tijela, sposobnost govora i vida.

S obzirom na povezanost izraženosti miRNA-146a s upalom, mogući razlog je prisutnost upale u usnoj šupljivi djece iz kontrolne skupine i, posljedično, veće razine miRNA-146a. Naime, razina miRNA-146a značajno je viša u upaljenom periodontalnom tkivu gingive nego u zdravom (*116*). Iako je jedan od isključnih kriterija za istraživanje bio postojanje infekcija usne šupljine i/ili druge bolesti usne šupljine, moguće je da kod neke djece navedena stanja nisu neprimjećena te su stoga ipak bili uključeni u istraživanje. Međutim, teško je pretpostaviti da djeca s CP-om nisu imala upale usne šupljine te da su zbog toga imali niže razine ove miRNA.

Dosadašnja saznanja o miRNA-146a vezana za neurološke poremećaje uglavnom su proizašla iz istraživanja ove miRNA u epilepsiji.

U našem istraživanju epilepsiju je imalo 9 (33 %) ispitanika s CP-om što je u skladu s dosadašnjim podatcima o učestalosti epilepsije u bolesnika s CP-om (*117*). Svi ispitanici s epilepsijom ujedno imaju teškoće govora i teškoće vida što se podudara s dosadašnjim povezivanjem epilepsije s težim oblicima bolesti. MiRNA-146a regulira izraženost nuklearnog faktora κB (NF-κB), IL-1 i INF- α na postranskripcijskoj razini i djeluje na upalnu reakciju nakon epileptičkog napadaja. Povišene razine miRNA 146a u mozgu prilikom

Ocjena rada u tijeku

epilepsije mogu umanjiti upalnu reakciju nakon napadaja. U bazalnim uvjetima razina miRNA-146a nemjerljiva je u astrocitima, a vrlo niska u neuronima. U obje vrste stanica razina miRNA-146a je povišena tjedan dana nakon epileptičkog statusa u modelu štakora i u hipokampusu čovjeka s kroničnom epilepsijom (*118*).

Istraživanje izraženost i miRNA-146a u krvnoj plazmi provedeno u 30 djece s epilepsijom pokazalo je statistički značajno višu izraženost miRNA-146 u djece s epilepsijom u odnosu na kontrolnu skupinu te se miRNA-146a pokazala dobrim mogućim dijagnostičkim i prognostičkim biomarkerom za epilepsiju u djece (AUC = 0,763). Također, pokazana je umjerena pozitivna korelacija između razine miRNA 146a u krvnoj plazmi i starosti djece s epilepsijom (r = 0,554) dok povezanost razine miRNA 146a u krvnoj plazmi i starosti djece iz kontrolne skupine nije ispitana (*119*).

Na 12 pacijenata dobi od 13 do 57 godina pokazano je da izraženost miRNA-146a u neokorteksu pacijenata s epilepsijom medijalnog temporalnog režnja pozitivno korelira s brojem epileptičkih napada (r = 0,803) i brojem korištenih antiepileptičkih lijekova (r = 0,611) (*120*).

U našem istraživanju izraženost miRNA-146a u slini nije se razlikovala između ispitanika s CP-om i epilepsijom i ispitanika s CP-om bez epilepsije (p = 0,9295) što nije očekivano s obzirom na prije spomenuta istraživanja. Jedan od mogućih razloga je mlađa dob ispitanika, a time i manji broj epileptičkih napada te manje razlike u razini miRNA 146a koje su se potencijalno mogle izgubiti u slini, kao filtratu plazme. Nadalje, moguće je i da su se tijekom vremena proteklog od epileptičkog napada do uzorkovanja, miRNA u krvi degradirale.

Istraživanje koje su proveli Giedd i Rapoport je pokazalo da izraženost miRNA-146a korelira s dobi u tkivu neokorteksa djece bez epilepsije (r = 0,733) dok korelacija nije pokazana u djece s epilepsijom. Navedena istraživanja upućuje na važnost dobne uniformiranosti unutar skupine. U našem istraživanju skupine su bile međusobno izjednačene po dobi (interkvartilni raspon kontrolne skupine 5,5 – 12, CP skupine 6-13 godina) i po spolu (13 djevojčica i 14 dječaka u svakoj skupini). Istraživanje je pokazalo da mozak djevojčica i dječaka do 6. godine života dosegne 95 % svoje veličine, međutim po mnogočemu se razlikuju. Analizirajući MR snimke mozga djevojčica i dječaka između 6. i 20. godine života pokazano je da je u šetogodišnjaka volumen mozga dječaka 10 % veći nego u djevojčica, očituje se u svim promatranim dijelovima mozga (sivoj tvari, bijeloj tvari, lateralnim ventrikulima, mediosagitalnom dijelu korpus kalozuma i kaudatusu,) i ta se razlika nije smanjila kroz promatrani period. Nadalje, djevojčice ranije dosežu maksimalni volumen mozga, s 10,5

Ocjena rada u tijeku

godina, a dječaci kasnije, s 14,5 godina (*121*). S obzirom na razlike u volumenu mozga, a posljedično tome i volumenu izvora potencijalnog markera, jako je važno postaviti buduća istraživanja tako da se izbjegnu varijacije u razini miRNA zbog samih varijacija u volumenu mozga zbog spola i dobi. To bi značilo da bi trebalo uključiti dovoljno velik broj dječaka i djevojčica iste dobi i uspoređivati međusobno dječake s dječacima unutar iste dobi i isto tako za djevojčice.

5.5 MiRNA let-7b

Ovo istraživanje nije utvrdilo statistički značajnu razliku u izraženost i miRNA let-7b u slini djece s CP-om u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,9760$).

U ranije spomenutom istraživanju o izraženosti miRNA u plazmi novorođenčadi ovisno o prisutnosti moždanog krvarenja i/ili poremećaju mišićnog tonus, izraženost miRNA let-7b nije se razlikovala između novorođenčadi s obzirom na prisutnost moždanog krvarenja, ali je bila povećana u novorođenčadi s abnormalnim mišićnim tonusom ($p = 0,0419$). Novorođenčad s moždanim krvarenjem i abnormalnim mišićnim tonusom nije se razlikovala po izraženosti let-7b od novorođenčadi bez moždanog krvarenja s normalnim mišićnim tonusom (*115*).

U ovom istraživanju ispitana je izraženost miRNA let-7b u slini kontrole i djece s CP-om različitog GMFC stupnja. Najveća izraženost bila je u slini djece s GMCF stupnjem IV, a najmanja u djece s GMFC stupnjem I. Međutim, statistički značajne razlike u izraženosti miRNA let-7b između pojedinih GMFC stupnjeva nisu nađene. Tome svakako pridonosi mali broj djece s CP-om u istraživanju koji je još manji kada se djeca razvrstaju u 5 GMFC stupnjeva. Nadalje, niti jedno dijete uključeno u istraživanje nije bilo GMFC stupnja III. U spomenutom istraživanju razlika u izraženosti miRNA let-7b u plazmi novorođenčadi s normalnim i abnormalnim mišićnim tonusom je bila statistički značajna, ali tek malo ispod granice od $p = 0,05$ što ukazuje na relativno slabi statistički dokaz.

Također, u ovom istraživanju nije nađena razlika u izraženosti miRNA let-7b u ispitanika s bilateralnim oblikom CP-a u odnosu na unilateralni oblik bolesti. Izraženost miRNA let-7b ne razlikuje se s obzirom na spol.

Johnson i sur. su prikupili uzorke sline 52 pacijenta s blagim traumatskim ozljedama mozga unutar 14 dana od ozljede. U studiju su bili uključeni pacijenti starosti između 7 i 21 godine (tipična dob pacijenata u Penn State Hershey Medical Centre, SAD u kojem je provedeno ispitivanje). Prema simptomima prisutnima 4 tjedna nakon ozljede pacijenti su svrstani u dvije

Ocjena rada u tijeku

skupine, akutni simptomi traume mozga i traumatske ozljede mozga s produženim simptomima te je sekvenciranjem određen miRNA profil u slini. Dvije skupine pacijenata razlikovale su se po koncentraciji 15 miRNA, među kojima je i miRNA let-7b-5p čija izraženost je bila manja u grupi s akutnim simptomima traume mozga. Izraženost miRNA let-7b-5p nije korelirala s dobi, spolom, rasom ili upotrebom različitih lijekova. MiRNA let-7b pokazala je jaku pozitivnu korelaciju s razinom miRNA let-7a (r = 0,78), umjerenu pozitivnu korelaciju s mi RNA-200-3p te umjerenu negativnu korelaciju s miRNA-140-3p i miRNA-30e. Od 15 diferencijalnih miRNA, kombinacija njih 5 (miRNA-320c-1, miRNA-133a-5p, miRNA-769-5p, miRNA let-7a-3p i miRNA-1307-3p) uspješno je razlikovala traumatske ozljede mozga s produženim simptomima od onih akutnih (AUC = 0,856). Četiri tjedna nakon ozljede izraženost tri miRNA bile su povezane sa specifičnim simptomima: miRNA-320c s teškoćama pamćenja, miRNA-629 s glavoboljom i miRNA let-7b s umorom. U slini pacijenata detektirana je i miRNA-146a-5p, ali nije bilo nikakve razlike među skupinama (*122*).

Ragusa i sur. ispitali su izraženost 800 miRNA u slini 76 djece s autizmom i 39 zdrave djece koristeći protočnu nCounter NanoString tehnologiju. MiRNA let-7b bila je značajno manje izražena u slini djece s autizmom, a ta razlika je potvrđena i qPCR metodom (p = 0,0002). Osim toga, otkrivena je negativna korelacija izraženosti miRNA let-7b s anomalijama u komunikaciji i socijalnoj interakciji. U slini djece s autizmom jedna od 10 diferencijalno izraženih miRNA bila je miRNA-146a te je ona bila više izražena u djece s autizmom (*94*).

U našem istraživanju nije bilo razlike u izraženost i miRNA let-7b u skupini djece s CP-om s obzirom na prisutnost epilepsije, teškoća vida i teškoća govora.

5.6 RNA i miRNA kao biomarkeri CP-a

Od ispitivanih molekula u slini, koncentracija ukupne RNA je pokazala najveću sposobnost razlikovanja djece s CP-om od kontrole (AUC = 0,74), miRNA-146a slabiju sposobnost (AUC = 0,63) i dok miRNA let-7b nema nikakvog potencijala biti biomarker CP-a (AUC = 0,50). Kombiniranjem ukupne koncentracije RNA s razinom miRNA let-7b povećala se diskriminatorna sposobnost na AUC = 0,79 (p = <0,0001) pa tako osjetljivost iznosi 74,07 %, a specifičnost 70,37 %. S obzirom na to da za sada ne postoji biomarker za CP, ova kombinacija ima potencijal postati biomarker za CP, ali bi je svakako trebalo poboljšati. Npr., moglo bi se ispitati je li korekcija po dobi ili izraženost drugih miRNA, kao što su snoRNA ili lincRNA, poboljšava diskriminaciju kombinacije ukupne RNA i miRNA-146a.

Ocjena rada u tijeku

Istraživanja su pokazala da je miRNA let-7b dobar biomarker nekih drugih stanja. Iako razine miRNA let-7b ne koreliraju s razinom triglicerida, ukupnim kolesterolom, lipoproteinima visoke gustoće, lipoproteinima niske gustoće ni glukozom u krvi, razine miRNA let-7b značajno su bile niže u krvnoj plazmi žena između 50 i 65 godina, koje su kasnije razvile veliki depresivni poremećaj u odnosu na kontrolnu skupinu (*123*). Također, razine miRNA let-7b značajno su niže u krvnoj plazmi ovisnika o heroinu. Stoga možemo zaključiti, da bi značaj eventualno detektirane razlike u izraženosti miRNA let-7b u ovom istraživanju mogao biti upitan, jer vjerojatno nije pokazatelj samo jednog stanja (*124*).

5.7 Nedostatci ovog istraživanja i preporuke za buduća istraživanja

Ovo istraživanje ima nekoliko nedostataka:

1. Zbog niske incidencije CP-a te uključenosti samo jednog centra, istraživanje je provedeno na relativno malom broju ispitanika zbog čega je bila otežana obrada podataka i statistička analiza. Prema podacima ljetopisa Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) za 2022. godinu od CP-a i ostalih paralitičnih sindroma (G80 – G83) u Republici Hrvatskoj broj oboljelih bio je 222 u dobi do 6 godina te 1527 u dobi od 7 do 19 godina starosti (*125*).
2. S obzirom da ne postoji studija koja je ispitivala miRNA u slini djece s CP-om, nije bila moguća adekvatna usporedba s prethodnim rezultatima i praktičnim saznanjima.
3. U neurorazvoju sudjeluje cijeli niz miRNA, a u ovom istraživanju analizirana je izraženost samo dvije miRNA metodom qPCR. Svakako bi buduća istraživanja trebala obuhvatiti veći broj različitih miRNA jer se time povećava vjerojatnost otkrivanja bar jedne miRNA bitne za dijagnostiku i prognostiku CP-a ili odgovor na terapiju, nadilaze se razlike u izraženosti miRNA uzrokovane individualnim razlikama, okolišnim faktorima i biološkim fluktuacijama. Kombiniranjem više miRNA može se povećati dijagnostička precizost. Nadalje, analiziranjem više miRNA dobiva se šira slika o samoj bolesti te doprinosi razumijevanju različitih aspekata bolesti kao što su patologija, patofiziološki mehanizmi bolesti, upala, oksidativni stres, itd.. Potencijalno, miRNA profiliranje bi u budućnosti moglo omogućiti individualizirani pristup pacijentima s mogućnošću identificiranja pacijenata koji bi bili kandidati za terapijskim djelovanjem u smislu reguliranja promijenjenih razina miRNA (*40*).

Ocjena rada u tijeku

4. Za kvantifikaciju miRNA postoji nekoliko metoda te svaka ima svoje prednosti i nedostatke. qPCR je najraširenija metoda za kvantifikaciju miRNA jer je jednostavna, relativno jeftina, vrlo osjetljiva i detektira niske razine miRNA, ali omogućava detekciju ograničenog broja odabranih miRNA (*42*). Međutim, problematična je normalizacija qPCR podataka jer ne postoji univerzalno prihvaćen gen za normalizaciju miRNA, a to otežava i usporedbu rezultata različitih studija. U ovom istraživanju odabrane miRNA su kvanificiranje qPCR-om i normalizirane samo na miRNA-21-5p što je jedan od nedostataka. Problem normalizacije miRNA mogao bi biti minimiziran analiziranjem više potencijalnih referentnih miRNA i odabirom najstabilije, korištenjem krivulje standarda ili apsolutnom kvantifikacijom miRNA ddPCR-om (*126*). Ova miRNA je odabrana za normalizaciju jer su Ragusa i sur. u istraživanju miRNA u slini djece s autizmom ispitali izraženost 800 miRNA i od njih se upravo miR-21-5p pokazala kao najbolja endogena kontrola (*94*).
5. Za simultanu analizu većeg broja miRNA primjerenija je naprednija tehnologija od qPCR-a, primjerice mikročipovi ili sekvenciranje sljedeće generacije. Mikročipovi omogućavaju analizu oko 2 000 odabranih miRNA, a sekvenciranje sljedeće generacije omogućava detekciju novih miRNA i miRNA koje su prisutne u niskim količinama (*42*). Međutim za obe metode je potrebna velika količina RNA, mikročipovi su niže reproducibilnosti i postoji opasnost od križne hibridizacije, a sekvenciranje sljedeće generacije je znatno skuplje nego ostale metode (*42*).
6. U ovo istraživanje bila su uključena djeca s već jasnom kliničkom slikom i postavljenom dijagnozom CP-a. Idealno bi bilo prikupiti slinu djece ranije dobi dok im još nije postavljena dijagnoza CP-a te još nekoliko puta tijekom odrastanja radi periodičke analize većeg broja miRNA specifičnih za neurorazvoj. Na taj način pratile bi se eventualne promjene izraženosti miRNA u slini djece dok još nemaju postavljenu dijagnozu CP-a što bi bilo korisno za jasnije povezivanje određenih miRNA s CP-om i identificiranje miRNA koje se razlikuju između djece s CP-om i djece bez CP-a. Nedostatci ovakvog istraživanja bi bili dugotrajnost, financijska zahtjevnost i, s obzirom na nisku incidenciju, trebalo bi uključiti veliki broj djece. Međutim, na ovaj način bi se mogli istraživati markeri ne samo za CP već i za ostale rijetke i česte bolesti.

Na temelju svega navedenoga zaključujemo da bi buduća istraživanja markera za CP trebala: uključiti veći broj dobno i spolno uniformnih ispitanika, napraviti opsežnu analizu velikog

Ocjena rada u tijeku

broja različitih miRNA i, naposljetku, miRNA od značaja precizno kvantifIcirati u velikom broju ispitanika i po mogućnosti longitudinalno, tj. od vremena prije postavljanja dijagnoze CP-a pa tijekom odrastanja i neurorazvoja. Kako bi se istraživanje provelo na većem broju djece, potrebno je u studiju uključiti veći broj centara bilo na razini države ili čak regije. S obzirom na dobne i spolne razlike u razvoju mozga, najbolje bi bilo uspoređivati i po dobi unutar iste spolne skupine. Koristeći napredne tehnologije visoke protočnosti analiza većeg broja miRNA bi bila efikasnija, a rezultirala bi identifikacijom značajnih miRNA. Za te metode potrebna je veća količina RNA stoga bi trebalo slinu prikupiti u više navrata. Identificirane miRNA bi se onda mogle analizirati u većem broju ispitanika, ali jeftinijom tehnologijom, primjerice ddPCR-om ili qPCR pazeći na odabir načina normalizacije.

5.8 Prednosti istraživanja

Ovo istraživanje prvo je istraživanje koje je proučavalo izraženost miRNA-146a i miRNA let-7b u slini djece s CP-om. Obje miRNA imaju ključne uloge u neurorazvoju i procesima uključenim u patofiziološke mehanizme nastanka CP-a i bolesti pridruženih CP-u, a također su obje miRNA visoko prisutne u slini. Navedeno ih čini zanimljivim kandidatima za biomarkere bolesti.

Ovo istraživanje potvrdilo je praktičnost sline kao uzorka koji se u dječjoj populaciji jednostavno uzima uz dobru suradnju djeteta i roditelja. Ipak, jedan dio djece zbog uznapredovalog motoričkog deficita i poremećene funkcije orofacijalne i žvačne muskulature nije mogao dati uzorak te zbog toga nije bio uključen u istraživanje.

U ovom istraživanju utvrđeno je da djeca s CP-om imaju statistički značajno nižu koncentraciju ukupne RNA u slini od djece iz kontrolne skupine. Ovaj parametar pokazao se potencijalnim biomarkerom za identifikaciju CP-a (AUC = 0,74), posebice za detekciju muške djece s CP-om (AUC = 0,78). Iako se razine miRNA-146a i let-7b nisu statistički značajno razlikovale između skupina, kombiniranje koncentracije ukupne RNA i razine miRNA-146a pokazalo je veću diskriminatornu moć od same koncentracije ukupne RNA (AUC = 0,79) te osjetljivost od 74,07 %, a specifičnost od 70,37 %. Navedeno ukazuje na potrebu dodatnih istraživanja na većim kohortnim skupinama uz procjenu izraženosti većeg broja različitih miRNA uključenih u neurorazvoj, ali također i procjenu ostalih nekodirajućih RNA molekula.

Ocjena rada u tijeku

6. ZAKLJUČCI

1. miRNA-146a izražena je u slini djece s CP-om i u slini djece urednog motoričkog razvoja. Medijan relativne promjene u slini djece s CP-om iznosi 12,56, a u slini djece urednog motoričkog razvoja 0,53.

2. Let-7b izražen je u slini djece s CP-om i u slini djece urednog motoričkog razvoja. Medijan relativne promjene u slini djece s CP-om iznosi 0,84, a u slini djece urednog motoričkog razvoja 0,82.

3. Izraženost miRNA-146a u slini djece s CP-om je veća od izraženosti u slini djece urednog motoričkog razvoja, ali ta razlika nije statistički značajna ($p = 0,1032$).

4. Izraženost miRNA let-7b u slini djece s CP ne razlikuje se statistički značajno od izraženosti u slini djece urednog motoričkog razvoja ($p = 0,9760$).

5. Nema statistički značajne razlike u izraženosti miRNA-146a i let-7b u slini djece s CP-om od izraženosti u slini djece urednog motoričkog razvoja s obzirom na spol.

Nema statistički značajne razlike u izraženosti miRNA-146a i let-7b u slini djece s CP-om s obzirom na stupanj motoričke disfunkcije, zahvaćenost tijela, pridruženost epilepsije, sposobnost govora i sposobnost vida

6. Djeca urednog motoričkog razvoja imala su statistički značajno višu koncentraciju RNA u slini naspram djece s CP-om ($p = 0,0018$)

Ocjena rada u tijeku

7. LITERATURA

1. M. Sadowska, B. Sarecka-Hujar, I. Kopyta, Cerebral Palsy: Current Opinions on Definition, Epidemiology, Risk Factors, Classification and Treatment Options. *Neuropsychiatr Dis Treat* **16**, 1505–1518 (2020).

2. P. Rosenbaum, N. Paneth, A. Leviton, M. Goldstein, M. Bax, D. Damiano, B. Dan, B. Jacobsson, A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl* **109**, 8–14 (2007).

3. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE), Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Dev Med Child Neurol* **42**, 816 (2001).

4. S. Martinec, G. Cesarec, AM. Tomečak Krilić, T. Radošević, Ž. Bakran, V. Mejaški Bošnjak, Functional Classification of Children with Cerebral Palsy in Krapina-Zagorje County. *Acta Clin Croat*, 60, 282-289 (2021).

5. S. Paul, A. Nahar, M. Bhagawati, A. J. Kunwar, A Review on Recent Advances of Cerebral Palsy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2022**, 1–20 (2022).

6. N. Badawi, S. Mcintyre, R. W. Hunt, Perinatal care with a view to preventing cerebral palsy. *Develop Med Child Neuro* **63**, 156–161 (2021).

7. S. McIntyre, S. Goldsmith, A. Webb, V. Ehlinger, S. J. Hollung, K. McConnell, C. Arnaud, H. Smithers-Sheedy, M. Oskoui, G. Khandaker, K. Himmelmann, the Global CP Prevalence Group*, Global prevalence of cerebral palsy: A systematic analysis. *Develop Med Child Neuro* **64**, 1494–1506 (2022).

8. S. Winter, A. Autry, C. Boyle, M. Yeargin-Allsopp, Trends in the Prevalence of Cerebral Palsy in a Population-Based Study. *Pediatrics* **110**, 1220–1225 (2002).

9. D. R. Patel, M. Neelakantan, K. Pandher, J. Merrick, Cerebral palsy in children: a clinical overview. *Transl Pediatr* **9**, S125–S135 (2020).

10. S. Marret, C. Vanhulle, A. Laquerriere, Pathophysiology of cerebral palsy. *Handb Clin Neurol* **111**, 169-76 (2013).

11. C. Cans, H. Dolk, M. Platt, A. Colver, A. Prasauskene, I. K. Rägeloh-Mann, Recommendations from the SCPE collaborative group for defining and classifying cerebral palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology* **49**, 35–38 (2007).

12. E. Himpens, C. Van Den Broeck, A. Oostra, P. Calders, P. Vanhaesebrouck, Prevalence, type, distribution, and severity of cerebral palsy in relation to gestational age: a meta-analytic review. *Develop Med Child Neuro* **50**, 334–340 (2008).

13. O. Dammann, A. Leviton, Brain Damage in Preterm Newborns: Might Enhancement of Developmentally Regulated Endogenous Protection Open a Door for Prevention? *Pediatrics* **104**, 541–550 (1999).

14. Prevalence and characteristics of children with cerebral palsy in Europe. *Dev Med Child Neurol* **44**, 633–640 (2002).

Ocjena rada u tijeku

15. K. Vitrikas, H. Dalton, D. Breish, Cerebral Palsy: An Overview. *Am Fam Physician* **101**, 213–220 (2020).

16. M. Rouse, *Neuroanatomy for Speech-Language Pathology and Audiology. 2. Izd* (Jones & Bartlett Learning, La Mirada, 2019).

17. Spastic cerebral palsy [slika s interneta] [pristupljeno 30.04.2024]. Dostupno na: https://mobilephysiotherapyclinic.in/cerebral-palsy-physiotherapy-management/.

18. I. Krägetoh-Mann, G. Hagberg, C. Meisner, B. Schelp, G. Haas, K. E. Eeg-Olofsson, H. K. Selbmann, B. Hagberg, R. Michaelis, Bilateral spastic cerebral palsy--a comparative study between southwest Germany and western Sweden. II: Epidemiology. *Develop Med Child Neuro* **36**, 473–483 (1994).

19. R. Palisano, P. Rosenbaum, S. Walter, D. Russell, E. Wood, B. Galuppi, Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy. *Develop Med Child Neuro* **39**, 214–223 (1997).

20. E. Beckung, G. Hagberg, Neuroimpairments, activity limitations, and participation restrictions in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* **44** (2002).

21. A.-C. Eliasson, L. Krumlinde-Sundholm, B. Rösblad, E. Beckung, M. Arner, A.-M. Öhrvall, P. Rosenbaum, The Manual Ability Classification System (MACS) for children with cerebral palsy: scale development and evidence of validity and reliability. *Dev Med Child Neurol* **48**, 549 (2006).

22. I. Novak, M. Hines, S. Goldsmith, R. Barclay, Clinical Prognostic Messages From a Systematic Review on Cerebral Palsy. *Pediatrics* **130**, e1285–e1312 (2012).

23. E. J. Donner, P. Camfield, L. Brooks, J. Buchhalter, C. Camfield, T. Loddenkemper, E. Wirrell, Understanding Death in Children With Epilepsy. *Pediatric Neurology* **70**, 7–15 (2017).

24. S. Ashwal, B. S. Russman, P. A. Blasco, G. Miller, A. Sandler, M. Shevell, R. Stevenson, Practice Parameter: Diagnostic assessment of the child with cerebral palsy [RETIRED]: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* **62**, 851–863 (2004).

25. Y. W. Wu, L. A. Croen, S. J. Shah, T. B. Newman, D. V. Najjar, Cerebral Palsy in a Term Population: Risk Factors and Neuroimaging Findings. *Pediatrics* **118**, 690–697 (2006).

26. I. Krägeloh-Mann, C. Cans, Cerebral palsy update. *Brain and Development* **31**, 537–544 (2009).

27. I. Novak, C. Morgan, L. Adde, J. Blackman, R. N. Boyd, J. Brunstrom-Hernandez, G. Cioni, D. Damiano, J. Darrah, A.-C. Eliasson, L. S. De Vries, C. Einspieler, M. Fahey, D. Fehlings, D. M. Ferriero, L. Fetters, S. Fiori, H. Forssberg, A. M. Gordon, S. Greaves, A. Guzzetta, M. Hadders-Algra, R. Harbourne, A. Kakooza-Mwesige, P. Karlsson, L. Krumlinde-Sundholm, B. Latal, A. Loughran-Fowlds, N. Maitre, S. McIntyre, G. Noritz, L. Pennington, D. M. Romeo, R. Shepherd, A. J. Spittle, M.

Ocjena rada u tijeku

Thornton, J. Valentine, K. Walker, R. White, N. Badawi, Early, Accurate Diagnosis and Early Intervention in Cerebral Palsy: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA Pediatr* **171**, 897-907 (2017).

28. A. Bashiri, E. Burstein, M. Mazor, Cerebral palsy and fetal inflammatory response syndrome: a review. *Journal of Perinatal Medicine* **34,** 5-12 (2006).

29. M. Mirmiran, P. D. Barnes, K. Keller, J. C. Constantinou, B. E. Fleisher, S. R. Hintz, R. L. Ariagno, Neonatal Brain Magnetic Resonance Imaging Before Discharge Is Better Than Serial Cranial Ultrasound in Predicting Cerebral Palsy in Very Low Birth Weight Preterm Infants. *Pediatrics* **114**, 992–998 (2004).

30. CDC, About Cerebral Palsy. https://www.cdc.gov/ncbddd/cp/facts.html.

31. Y. Zhao, S. Bhattacharjee, B. M. Jones, J. Hill, P. Dua, W. J. Lukiw, Regulation of Neurotropic Signaling by the Inducible, NF-kB-Sensitive miRNA-125b in Alzheimer's Disease (AD) and in Primary Human Neuronal-Glial (HNG) Cells. *Mol Neurobiol* **50**, 97–106 (2014).

32. L. S. Nguyen, J. Fregeac, C. Bole-Feysot, N. Cagnard, A. Iyer, J. Anink, E. Aronica, O. Alibeu, P. Nitschke, L. Colleaux, Role of miR-146a in neural stem cell differentiation and neural lineage determination: relevance for neurodevelopmental disorders. *Molecular Autism* **9**, 38 (2018).

33. L. S. Nguyen, M. Lepleux, M. Makhlouf, C. Martin, J. Fregeac, K. Siquier-Pernet, A. Philippe, F. Feron, B. Gepner, C. Rougeulle, Y. Humeau, L. Colleaux, Profiling olfactory stem cells from living patients identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. *Molecular Autism* **7**, 1 (2016).

34. C. Catalanotto, C. Cogoni, G. Zardo, MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *IJMS* **17**, 1712 (2016).

35. A. M. Denli, B. B. J. Tops, R. H. A. Plasterk, R. F. Ketting, G. J. Hannon, Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231–235 (2004).

36. D.-D. Cao, L. Li, W.-Y. Chan, MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases. *IJMS* **17**, 842 (2016).

37. S. Salloum-Asfar, N. J. Satheesh, S. A. Abdulla, Circulating miRNAs, Small but Promising Biomarkers for Autism Spectrum Disorder. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 253 (2019).

38. X. Zhao, X. He, X. Han, Y. Yu, F. Ye, Y. Chen, T. Hoang, X. Xu, Q.-S. Mi, M. Xin, F. Wang, B. Appel, Q. R. Lu, MicroRNA-Mediated Control of Oligodendrocyte Differentiation. *Neuron* **65**, 612–626 (2010).

39. A. Shenoy, M. Danial, R. H. Blelloch, Let-7 and miR-125 cooperate to prime progenitors for astrogliogenesis. *The EMBO Journal* **34**, 1180–1194 (2015).

40. W. Chen, C. Qin, General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development. *RNA Biology* **12**, 701–708 (2015).

Ocjena rada u tijeku

41. M. N. Ziats, O. M. Rennert, Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Mol Psychiatry* **19**, 848–852 (2014).

42. M. M. J. Van Den Berg, J. Krauskopf, J. G. Ramaekers, J. C. S. Kleinjans, J. Prickaerts, J. J. Briedé, Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology* **185**, 101732 (2020).

43. S. D. Hicks, F. A. Middleton, A Comparative Review of microRNA Expression Patterns in Autism Spectrum Disorder. *Front. Psychiatry* **7,** 176 (2016).

44. O. Barca-Mayo, Q. R. Lu, Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Front. Neurosci.* **6,** 13 (2012).

45. W. Su, M. S. Aloi, G. A. Garden, MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. *Brain, Behavior, and Immunity* **52**, 1–8 (2016).

46. Q. Duan, X. Mao, Y. Xiao, Z. Liu, Y. Wang, H. Zhou, Z. Zhou, J. Cai, K. Xia, Q. Zhu, J. Qi, H. Huang, J. Plutzky, T. Yang, Super enhancers at the miR-146a and miR-155 genes contribute to self-regulation of inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1859**, 564–571 (2016).

47. H. C. Kinney, J. J. Volpe, "Hypoxic-Ischemic Injury in the Term Infant" U ur J. J. Volpe *Neurology of the Newborn* (Elsevier, 2018; https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323428767000181), pp. 484–499.

48. J. A. Weber, D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. How Huang, M. Jen Lee, D. J. Galas, K. Wang, The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry* **56**, 1733–1741 (2010).

49. H. Iftikhar, G. E. Carney, Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. *BioEssays* **38**, 367–378 (2016).

50. X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang, C.-Y. Zhang, Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* **18**, 997–1006 (2008).

51. P. S. Mitchell, R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, M. Tewari, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 10513–10518 (2008).

52. A. Gallo, M. Tandon, I. Alevizos, G. G. Illei, The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *PLoS ONE* **7**, e30679 (2012).

53. J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, C. Peng, Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **9**, 402 (2018).

Ocjena rada u tijeku

54. A. W. S. Chan, J. Kocerha, The Path to microRNA Therapeutics in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders. *Front. Gene.* **3,** 82 (2012).

55. C. Cava, I. Manna, A. Gambardella, G. Bertoli, I. Castiglioni, Potential Role of miRNAs as Theranostic Biomarkers of Epilepsy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **13**, 275–290 (2018).

56. K. S. Sheinerman, V. G. Tsivinsky, L. Abdullah, F. Crawford, S. R. Umansky, Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment: Biomarker Validation Study. *Aging* **5**, 925–938 (2013).

57. Q. Zeng, L. Zou, L. Qian, F. Zhou, H. Nie, S. Yu, J. Jiang, A. Zhuang, C. Wang, H. Zhang, Expression of microRNA-222 in serum of patients with Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports* **16**, 5575–5579 (2017).

58. P. Takousis, J. Schulz, C. M. Lill, R. Perneczky, L. Bertram, [P3–196]: MICRORNA EXPRESSION IN ALZHEIMER DISEASE: A SYSTEMATIC REVIEW OF THE LITERATURE AND META-ANALYSIS. *Alzheimer's & Dementia* **13** (2017).

59. L. Chen, J. Yang, J. Lü, S. Cao, Q. Zhao, Z. Yu, Identification of aberrant circulating miRNAs in Parkinson's disease plasma samples. *Brain and Behavior* **8**, e00941 (2018).

60. S. R. Siegel, J. Mackenzie, G. Chaplin, N. G. Jablonski, L. Griffiths, Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Mol Biol Rep* **39**, 6219–6225 (2012).

61. S. Kumari, M. Samara, R. Ampadi Ramachandran, S. Gosh, H. George, R. Wang, R. P. Pesavento, M. T. Mathew, A Review on Saliva-Based Health Diagnostics: Biomarker Selection and Future Directions. *Biomedical Materials & Devices* **2**, 121–138 (2024).

62. E. Pernot, E. Cardis, C. Badie, Usefulness of Saliva Samples for Biomarker Studies in Radiation Research. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **23**, 2673–2680 (2014).

63. P. Ostheim, A. Tichý, I. Sirak, M. Davidkova, M. M. Stastna, G. Kultova, T. Paunesku, G. Woloschak, M. Majewski, M. Port, M. Abend, Overcoming challenges in human saliva gene expression measurements. *Sci Rep* **10**, 11147 (2020).

64. R. Sullivan, A. Montgomery, A. Scipioni, P. Jhaveri, A. T. Schmidt, S. D. Hicks, Confounding Factors Impacting microRNA Expression in Human Saliva: Methodological and Biological Considerations. *Genes* **13**, 1874 (2022).

65. K. E. Wagner, J. B. McCormick, S. Barns, M. Carney, F. A. Middleton, S. D. Hicks, Parent Perspectives Towards Genetic and Epigenetic Testing for Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* **50**, 3114–3125 (2020).

66. H. Min, S. Zhu, L. Safi, M. Alkourdi, B. H. Nguyen, A. Upadhyay, S. D. Tran, Salivary Diagnostics in Pediatrics and the Status of Saliva-Based Biosensors. *Biosensors* **13**, 206 (2023).

67. A. R. Zamunér, A. B. Cunha, E. Da Silva, A. P. Negri, E. Tudella, M. A. Moreno, The influence of motor impairment on autonomic heart rate modulation among children with cerebral palsy. *Research in Developmental Disabilities* **32**, 217–221 (2011).

Ocjena rada u tijeku

68. M. Song, H. Bai, P. Zhang, X. Zhou, B. Ying, Promising applications of human-derived saliva biomarker testing in clinical diagnostics. *Int J Oral Sci* **15**, 2 (2023).

69. S. R. Sharma, X. Gonda, F. I. Tarazi, Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **190**, 91–104 (2018).

70. S. D. Hicks, C. Ignacio, K. Gentile, F. A. Middleton, Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. *BMC Pediatr* **16**, 52 (2016).

71. S. D. Hicks, A. T. Rajan, K. E. Wagner, S. Barns, R. L. Carpenter, F. A. Middleton, Validation of a Salivary RNA Test for Childhood Autism Spectrum Disorder. *Front. Genet.* **9**, 534 (2018).

72. E. Sehovic, L. Spahic, L. Smajlovic-Skenderagic, N. Pistoljevic, E. Dzanko, A. Hajdarpasic, Identification of developmental disorders including autism spectrum disorder using salivary miRNAs in children from Bosnia and Herzegovina. *PLoS ONE* **15**, e0232351 (2020).

73. S. D. Hicks, J. Johnson, M. C. Carney, H. Bramley, R. P. Olympia, A. C. Loeffert, N. J. Thomas, Overlapping MicroRNA Expression in Saliva and Cerebrospinal Fluid Accurately Identifies Pediatric Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* **35**, 64–72 (2018).

74. Z. Liao, R. Zheng, G. Shao, Mechanisms and application strategies of miRNA‐146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review). *Int J Mol Med* **51**, 7 (2022).

75. M. R. Paterson, A. J. Kriegel, MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiological Genomics* **49**, 243–252 (2017).

76. I. Gilyazova, D. Asadullina, E. Kagirova, R. Sikka, A. Mustafin, E. Ivanova, K. Bakhtiyarova, G. Gilyazova, S. Gupta, E. Khusnutdinova, H. Gupta, V. Pavlov, MiRNA-146a—A Key Player in Immunity and Diseases. *IJMS* **24**, 12767 (2023).

77. A. Kivihall, A. Aab, J. Soja, K. Sładek, M. Sanak, A. Altraja, B. Jakiela, G. Bochenek, A. Rebane, Reduced expression of miR-146a in human bronchial epithelial cells alters neutrophil migration. *Clin Transl Allergy* **9**, 62 (2019).

78. A. Iyer, E. Zurolo, A. Prabowo, K. Fluiter, W. G. M. Spliet, P. C. Van Rijen, J. A. Gorter, E. Aronica, MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. *PLoS ONE* **7**, e44789 (2012).

79. A. D. Gaudet, L. K. Fonken, L. R. Watkins, R. J. Nelson, P. G. Popovich, MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. *Neuroscientist* **24**, 221–245 (2018).

80. D. A. Galloway, C. S. Moore, miRNAs As Emerging Regulators of Oligodendrocyte Development and Differentiation. *Front. Cell Dev. Biol.* **4** (2016).

81. X. S. Liu, M. Chopp, W. L. Pan, X. L. Wang, B. Y. Fan, Y. Zhang, H. Kassis, R. L. Zhang, X. M. Zhang, Z. G. Zhang, MicroRNA-146a Promotes Oligodendrogenesis in Stroke. *Mol Neurobiol* **54**, 227–237 (2017).

Odjela rada u Rijeku

82. A. Jovičić, R. Roshan, N. Moisoi, S. Pradervand, R. Moser, B. Pillai, R. Luthi-Carter, Comprehensive Expression Analyses of Neural Cell-Type-Specific miRNAs Identify New Determinants of the Specification and Maintenance of Neuronal Phenotypes. *J. Neurosci.* **33**, 5127–5137 (2013).

83. S. Mao, J. Wu, J. Yan, W. Zhang, F. Zhu, Dysregulation of miR-146a: a causative factor in epilepsy pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Front. Neurol.* **14**, 1094709 (2023).

84. A. Omran, J. Peng, C. Zhang, Q. Xiang, J. Xue, N. Gan, H. Kong, F. Yin, Interleukin-1β and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **53**, 1215–1224 (2012).

85. W.-X. Wang, N. P. Visavadiya, J. D. Pandya, P. T. Nelson, P. G. Sullivan, J. E. Springer, Mitochondria-associated microRNAs in rat hippocampus following traumatic brain injury. *Experimental Neurology* **265**, 84–93 (2015).

86. O. Dammann, T. M. O'Shea, Cytokines and Perinatal Brain Damage. *Clinics in Perinatology* **35**, 643–663 (2008).

87. X. Ming, M. Brimacombe, G. C. Wagner, Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. *Brain and Development* **29**, 565–570 (2007).

88. C. Zhao, G. Sun, S. Li, M.-F. Lang, S. Yang, W. Li, Y. Shi, MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 1876–1881 (2010).

89. D. L. Bernstein, X. Jiang, S. Rom, let-7 microRNAs: Their Role in Cerebral and Cardiovascular Diseases, Inflammation, Cancer, and Their Regulation. *Biomedicines* **9**, 606 (2021).

90. A. Ali, G. J. Bouma, R. V. Anthony, Q. A. Winger, The Role of LIN28-let-7-ARID3B Pathway in Placental Development. *IJMS* **21**, 3637 (2020).

91. M. Hennchen, J. Stubbusch, I. Abarchan-El Makhfi, M. Kramer, T. Deller, C. Pierre-Eugene, I. Janoueix-Lerosey, O. Delattre, U. Ernsberger, J. B. Schulte, H. Rohrer, Lin28B and Let-7 in the Control of Sympathetic Neurogenesis and Neuroblastoma Development. *J. Neurosci.* **35**, 16531–16544 (2015).

92. J. F. De Vasconcellos, C. Byrnes, Y. T. Lee, J. M. Allwardt, M. Kaushal, A. Rabel, J. L. Miller, Tough decoy targeting of predominant let-7 miRNA species in adult human hematopoietic cells. *J Transl Med* **15**, 169 (2017).

93. S. M. Lehmann, C. Krüger, B. Park, K. Derkow, K. Rosenberger, J. Baumgart, T. Trimbuch, G. Eom, M. Hinz, D. Kaul, P. Habbel, R. Kälin, E. Franzoni, A. Rybak, D. Nguyen, R. Veh, O. Ninnemann, O. Peters, R. Nitsch, F. L. Heppner, D. Golenbock, E. Schott, H. L. Ploegh, F. G. Wulczyn, S. Lehnardt, An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* **15**, 827–835 (2012).

94. M. Ragusa, M. Santagati, F. Mirabella, G. Lauretta, M. Cirnigliaro, D. Brex, C. Barbagallo, C. N. Domini, M. Gulisano, R. Barone, L. Trovato, S. Oliveri, G. Mongelli,

Ocjena rada u tijeku

A. Spitale, D. Barbagallo, C. Di Pietro, S. Stefani, R. Rizzo, M. Purrello, Potential Associations Among Alteration of Salivary miRNAs, Saliva Microbiome Structure, and Cognitive Impairments in Autistic Children. *IJMS* **21**, 6203 (2020).

95. K. H. T. Cho, B. Xu, C. Blenkiron, M. Fraser, Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury. *Front. Physiol.* **10**, 227 (2019).

96. Bošnjak-Nađ K, Mejaški-Bošnjak V, Popović-Miočinović Lj, Gverić Ahmetašević S, Đaković I, Čikara Mladin M, Rano otkrivanje neurorizične djece i uključivanje u rane habilitacijske programe. *Paediatr Croat.* **55,** 75-81 (2011).

97. Mejaški-Bošnjak V, Dijagnostički pristup ranom otkrivanju neurorazvojnih odstupanja. *Paediatr Croat* **51:** 105-110 (2007).

98. *Volpe's Neurology of the Newborn* (Elsevier, Amsterdam, 6. izd., 2018; https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20100688250).

99. M. Hadders-Algra, Early Diagnostics and Early Intervention in Neurodevelopmental Disorders—Age-Dependent Challenges and Opportunities. *JCM* **10**, 861 (2021).

100. M. Martinez-Biarge, F. Groenendaal, K. J. Kersbergen, M. J. N. L. Benders, F. Foti, F. M. Cowan, L. S. De Vries, MRI Based Preterm White Matter Injury Classification: The Importance of Sequential Imaging in Determining Severity of Injury. *PLoS ONE* **11**, e0156245 (2016).

101. S. Thayyil, M. Chandrasekaran, A. Taylor, A. Bainbridge, E. B. Cady, W. K. K. Chong, S. Murad, R. Z. Omar, N. J. Robertson, Cerebral Magnetic Resonance Biomarkers in Neonatal Encephalopathy: A Meta-analysis. *Pediatrics* **125**, e382–e395 (2010).

102. M. A. Javaid, A. S. Ahmed, R. Durand, S. D. Tran, Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **6**, 67–76 (2016).

103. C.-Z. Zhang, X.-Q. Cheng, J.-Y. Li, P. Zhang, P. Yi, X. Xu, X.-D. Zhou, Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci* **8**, 133–137 (2016).

104. A. C. F. M. Ferreira, R. J. Eveloff, M. Freire, M. T. B. R. Santos, The Impact of Oral-Gut Inflammation in Cerebral Palsy. *Front. Immunol.* **12**, 619262 (2021).

105. P. H. Van De Heyning, J. F. Marquet, W. L. Creten, Drooling in children with cerebral palsy. *Acta Otorhinolaryngol Belg* **34**, 691–705 (1980).

106. R. A. Yoshida, T. B. Lobato, R. Gorjão, L. S. França, L. A. Alves, M. T. B. R. Santos, Detection and quantification of pathogens in saliva of adolescents with cerebral palsy: a cross-sectional study. *Front. Dent. Med* **4**, 1208243 (2023).

107. S. M. Quritum, A. M. Ali, M. M. Raouf, T. E. I. Omar, K. M. L. Dowidar, Evaluation of salivary parameters and Streptococcus' Mutans count in children with cerebral palsy in Egypt: a case control study. *BMC Oral Health* **22**, 411 (2022).

Ocjena rada u tijeku

108. R. Sullivan, S. Heavey, D. G. Graham, R. Wellman, S. Khan, S. Thrumurthy, B. S. Simpson, T. Baker, S. Jevons, J. Ariza, V. Eneh, H. Pye, H. Luxton, R. Hamoudi, H. Whitaker, L. B. Lovat, An optimised saliva collection method to produce high-yield, high-quality RNA for translational research. *PLoS ONE* **15**, e0229791 (2020).

109. S. V. Kharchenko, A. A. Shpakov, [Regulation of the RNAse activity of the saliva in healthy subjects and in stomach cancer]. *Izv Akad Nauk SSSR Biol*, 58–63 (1989).

110. O. Ceder, J. V. Dijken, T. Ericson, H. Kollberg, Ribonuclease in Different Types of Saliva from Cystic Fibrosis Patients. *Acta Paediatrica* **74**, 102–106 (1985).

111. L. Krausser, S. M. Braet, Z. Benaamar, M. Van Dyck-Lippens, B. C. De Jong, L. Rigouts, Mycobacterium tuberculosis retains viability in RNAlater buffer but not in GTC-TCEP and DNA/RNA Shield. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **106**, 115905 (2023).

112. G. Setti, M. E. Pezzi, M. V. Viani, T. A. Pertinhez, D. Cassi, C. Magnoni, P. Bellini, A. Musolino, P. Vescovi, M. Meleti, Salivary MicroRNA for Diagnosis of Cancer and Systemic Diseases: A Systematic Review. *IJMS* **21**, 907 (2020).

113. F. Besag, Epilepsy in patients with autism: links, risks and treatment challenges. *Neuropsychiatr Dis Treat* **14**, 1–10 (2017).

114. T. Blondal, S. Jensby Nielsen, A. Baker, D. Andreasen, P. Mouritzen, M. Wrang Teilum, I. K. Dahlsveen, Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* **59**, S1–S6 (2013).

115. S. D. Chapman, L. Farina, K. Kronforst, M. Dizon, MicroRNA Profile Differences in Neonates at Risk for Cerebral Palsy. *Phys Med Rehabil Int* **5**, 1148 (2018).

116. H. Motedayyen, S. Ghotloo, M. Saffari, M. Sattari, R. Amid, Evaluation of MicroRNA-146a and Its Targets in Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology* **86**, 1380–1385 (2015).

117. M. Carlsson, G. Hagberg, I. Olsson, Clinical and aetiological aspects of epilepsy in children with cerebral palsy. *Develop Med Child Neuro* **45**, 371–376 (2003).

118. E. Aronica, K. Fluiter, A. Iyer, E. Zurolo, J. Vreijling, E. A. Van Vliet, J. C. Baayen, J. A. Gorter, Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J of Neuroscience* **31**, 1100–1107 (2010).

119. H. G. Elnady, N. Abdelmoneam, E. Eissa, E. R. A. Hamid, D. A. Zeid, A. M. Abo-Shanab, H. Atta, N. M. Kholoussi, MicroRNAs as Potential Biomarkers for Childhood Epilepsy. *Open Access Maced J Med Sci* **7**, 3965–3969 (2019).

120. D. Organista-Juárez, A. Jiménez, L. Rocha, M. Alonso-Vanegas, R. Guevara-Guzmán, Differential expression of miR-34a, 451, 1260, 1275 and 1298 in the neocortex of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* **157**, 106188 (2019).

121. J. N. Giedd, J. L. Rapoport, Structural MRI of Pediatric Brain Development: What Have We Learned and Where Are We Going? *Neuron* **67**, 728–734 (2010).

Ocjena rada u tijeku

122. J. J. Johnson, A. C. Loeffert, J. Stokes, R. P. Olympia, H. Bramley, S. D. Hicks, Association of Salivary MicroRNA Changes With Prolonged Concussion Symptoms. *JAMA Pediatr* **172**, 65 (2018).

123. S. Roumans, K. Sundquist, A. A. Memon, A. Hedelius, J. Sundquist, X. Wang, Association of circulating let-7b-5p with major depressive disorder: a nested case-control study. *BMC Psychiatry* **21**, 616 (2021).

124. H. Liu, W. Xu, J. Feng, H. Ma, J. Zhang, X. Xie, D. Zhuang, W. Shen, H. Liu, W. Zhou, Increased Expression of Plasma miRNA-320a and let-7b-5p in Heroin-Dependent Patients and Its Clinical Significance. *Front. Psychiatry* **12**, 679206 (2021).

125. Hrvatski zavod za javno zdravstvo., Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2022. godinu, *Stevanović R, Capak K, Benjak T, ur* (2023).

126. H. Schwarzenbach, A. M. Da Silva, G. Calin, K. Pantel, Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clinical Chemistry* **61**, 1333–1342 (2015).

Ocjena rada u tijeku

8. SAŽETAK

Cerebralna paraliza (CP) je grupa neprogresivnih, promjenjivih motoričkih poremećaja uzrokovanih razvojnim poremećajem ili oštećenjem mozga u ranom razvoju. Iako su najvažniji čimbenici rizika CP poznati, 1/3 djece s CP-om nema jasne faktore rizika te je pretpostavka da se kod njih radi o genetskoj etiologiji. MicroRNA (miRNA) su nekodirajuće RNA i važni su modulatori neurorazvoja. Izraženost miRNA se mijenja kod oštećenja mozga uključujući i perinatalna oštećenja mozga. MiRNA-146a ima važnu ulogu u neuroinflamaciji i značajna je u različitim neurološkim bolestima i traumama. MiRNA let-7b inducira neurodegeneraciju i sudjeluje u proliferaciji i diferencijaciji matičnih neuralnih stanica. Obje miRNA izlučuju se u slini te je stoga analizirana izraženost i ovih miRNA u slini djece s CP-om i slini djece urednog motoričkog razvoja. Ovo istraživanje je pokazalo da se izraženost miRNA-146a i let-7b u slini ne razlikuje značajno između ispitivanih skupina, međutim, u slini ispitanika s CP-om statistički je značajno manje ukupne RNA od sline ispitanika urednog motoričkog razvoja te ovaj parametar ima dijagnostički potencijal (AUC = 0,74). Nadalje, kombiniranje ukupne RNA s razinom miRNA-146a pojačava sposobnost razlikovanja ispitanika s CP-om od ispitanika urednog motoričkog razvoja (AUC = 0,79).

Ocjena u tijeku

9. SUMMARY

Cerebral palsy (CP) is a group of non-progressive but variable motor disorders caused by developmental defects or early brain damage. Although the most important CP risk factors are identified, the 1/3 of children with CP do not have clear risk factors suggesting a genetic etiology. MiRNAs are noncoding RNAs that play important roles in regulating gene expression and are important modulators of neurodevelopment. The expression of miRNA changes upon brain damage including perinatal brain damage. MiRNA-146a plays an important role in neuroinflammation and in variety of neurological diseases and traumas. MiRNA let-7b induces neurodegeneration and participates in neural cell proliferation and differentiation. Both miRNAs are secreted in saliva, therefore, expression of these miRNAs in saliva of children with CP and children with normal motor development was analysed. This research showed that the expression of miRNA-146a and let-7b in saliva does not differ significantly between the examined groups. However, in the saliva of children with CP there is statistically significantly less total RNA than in the saliva of children with normal motor development, and this parameter has diagnostic potential (AUC = 0.74). Furthermore, combining total RNA with miRNA-146a level enhances the ability to distinguish children with CP from subjects with normal motor development (AUC = 0.79).

Ocjena rada u tijeku

10. PRILOZI

10.1 Popis kratica

AGO – argonaut

ASD - poremećaj autističkog spektra (engl. *Autism Spectrum Disorder*)

AUC - površina ispod krivulje (engl. A*rea Under Curve*)

BFMF - (engl. *Bimanual Fine Motor Function classification*)

CP - cerebralna paraliza

DGCR8 - (engl. *RNA binding protein DiGeorge Syndome Critical Region 8*)

GMFCS - (engl. *Gross Motor Function Classification System*)

HDL - lipoprotein visoke gustoće (engl. *High Density Lipoprotein*)

IL-1 - interleukin 1 (engl. *Interleukin-1*)

IRAK - interleukin 1 kinaza pridružena receptoru (engl. *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*)

JNK1/2 - (engl. *c-Jun N-terminal Kinase*)

lincRNA - duge intergenske nekodirajuće RNA (engl. *Long intergenic non-coding RNA*)

MACS - (engl. *Manual Ability Classification System*)

MEK-1/2 - mitogenom aktivirane protein-kinaze kinaze 1 i 2 (engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*)

mi-RISC kompleks - kompleks za utišavanje induciran molekulom miRNA (engl. *Minimal miRNA-Induced Silencing Complex*)

miRNA - mikroRNA (engl. *microRNA*)

MR - magnetska rezonanca

MRE - komplementarna sekvenca na ciljnoj mRNA (engl. *miRNA Response Element*)

MTLE - epilepsija medijalnog temporalnog režnja (engl. *Mesial Temporal Lobe Epilepsy*)

NFκB - nuklearni čimbenik kappa B (engl. *Nuclear Factor κappa B*)

PVL - periventrikularna leukomalacija

SCPE - europska mreža registara djece s cerebralnom paralizom (engl. *Surveillance of Cerebral Palsy in Europe*)

Ocjena rada u tijeku

snoRNA - male nukleolarne RNA (engl. *small nucleolar RNA*)

TLR - receptori slični toll-u (engl. *Toll-Like Receptors*)

TNFα - čimbenik tumorske nekroze α (engl. *Tumor Necrosis Factor α*)

TRAF6 - čimbenik povezan s receptorom za TNF-6 (engl. *Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6*)

UZV - ultrasonografija

Ocjena rada u tijeku

11. ŽIVOTOPIS

Mirna Tomašković rođena je 30. rujna 1974. godine u Sisku. Završila je osnovnoškolsko obrazovanje i matematičko-informatičku gimnaziju s odličnim uspjehom. Godine 1992. započela je studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te diplomirala 1998. godine s vrlo dobrim uspjehom. Nakon diplome stažirala je u Domu zdravlja Sisak te 1999. godine položila stručni državni ispit i stekla licencu za samostalan rad. Od 1999. Do 2001. godine radi u Domu zdravlja Vinkovci u Ambulanti obiteljske medicine Jarmina kao ugovorni liječnik primarne zdravstvene zaštite. 2001. godine započela je specijalističko usavršavanje iz fizikalne medicine i rehabilitacije u OB Sisak. 2006. godine položila je specijalistički ispit i stekla naziv specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije. Od 2006. do 2008.godine radi u OB Sisak kao specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije. Od 2008. do 2013. godine radi u Poliklinici Medikol u Zagrebu kao specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije (Pročelnica odjela fizikalne medicine i rehabilitacije od 2011 do 2013 godine). Od 2013. do 2015 godine radi u GlaxoSmithKline d.d. kao medicinski savjetnik te zamjenik osobe odgovorne za farmakovigilanciju. Od 2015. godine do sada radi u Specijalnoj bolnici za zaštitu djece s neurorazvojnim i motoričkim smetnjama Goljak, Zagreb kao specijalist fizikalne medicine i rehabilitacije, a od 2017. godine radi na mjestu voditeljice Polikliničko-konzilijarne fizijatrijske ambulante specijalne bolnice Goljak. 2018.godine upisala je doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u suradnji s Institutom „Ruđer Bošković" i Sveučilištem u Dubrovniku. Od 2018. do 2019 godine završila je tečaj razvojne kineziologije za novorođenčad, djecu i adolescente s motoričkim smetnjama po Vojti i stekla međunarodni certifikat za provođenje Vojta terapije na djeci i odraslima.

Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog društva fizikalne medicine i rehabilitacije i Hrvatskog Vojta udruženja. Aktivno sudjeluje na domaćim i inozemnim znanstvenim i stručnim skupovima te tečajevima trajnog usavršavanja za doktore medicine i specijaliste fizikalne medicine i rehabilitacije. Udana je i majka je dvoje djece.

Sudjelovala je u izradi znanstvenih radova :

1.Jurković M, Tomašković I, Tomašković M, Zore BS, Pavić I, Roić AC. Refugee status as a possible risk factor for childhood enuresis Int J Environ Res Public Health. 2019; 16 (22): 4415.

2.Bošnjak-Nađ K, Vidak HK, Petrović D, Tomašković M, Nađ I. Early detection of children at high neurorisk and enrolment in early intervention programmes.Paediatria Croatica, 2019; 63: 107-111.

Ocjena rada u tijeku

3.Bošnjak-Nađ K, Nađ I, Petrović D, Tomašković M. Neurorazvojne smetnje nedonoščadi. Gynaecol Perinatol, 2018; 2: 34-40.

Popis sažetaka na Kongresima:

1.Bošnjak-Nađ K., Popović LjM., Čorlukić M, Tomašković M. Preliminarni rezultati Pilot projekta „Zdravstvena tranzicija iz dječje u odraslu zdravstvenu skrb djece s cerebralnom paralizom“, Pedijatrijska škola. Split. 2019.

2.Tomašković M. Habilitacija neurorizične djece i terapijski pristup kod djece s cerebralnom paralizom. Tematsko savjetovanje „Za osmijeh djeteta u bolnici“, Klinika za dječje bolesti, Zagreb, 2017.

3.Tomašković M, Petrović D, Bošnjak-Nađ K. Vojta princip u svakodnevnoj praksi. Hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem. Med. Vjesn. 2018; 50:1.

4.Tomašković I, Tomašković M., Petrović D, Bošnjak-Nađ K. Neurorehabilitacija i kirurško liječenje bolesnika s postprostatektomijskom inkontinecijom. Hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem, Med. Vjesn. 2018; 50:1.

5.Petrović D, Bošnjak-Nađ K, Tomašković M. Cerebralna paraliza i registar djece s cerebralnom paralizom 6.Hrvatski kongres iz neurorehabilitacije i restauracijske neurologije s međunarodnim sudjelovanjem, Med. Vjesn. 2018; 50:1.

Ocjena rada u tijeku