

lek. Dominika Klimczak-Tomaniak

**MikroRNA i chemokina CXCL12 jako biomarkery
wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych
u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w zakresie medycyny

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Kuch

Promotor pomocniczy: dr n. med. Tomasz Pilecki

Praca została wykonana w:

Klinice Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych,

I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Leszek Pączek

i

Zakładzie Niewydolności Serca i Rehabilitacji Kardiologicznej Katedry Kardiologii,

Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych,

II Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

p.o. Kierownika Zakładu: dr n. med. Maciej Janiszewski



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą II Wydziału Lekarskiego

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2018

Słowa kluczowe

mikroRNA-155-5p, chemokina CXCL12, izoforma SDF-1alfa, przewlekła choroba nerek, układ renina-angiotensyna-aldosteron, receptor typu 1 dla angiotensyny II, stan zapalny, nadciśnienie tętnicze, nadciśnienie tętnicze nocne, 24-godzinna automatyczna rejestracja ciśnienia tętniczego, brak nocnego spadku ciśnienia tętniczego, nocne nadciśnienie tętnicze, przerost lewej komory mięśnia sercowego, badanie echokardiograficzne

Key words

microRNA-155-5p, chemokine CXCL12, isoform SDF-1alpha, chronic kidney disease, renin-angiotensin-aldosterone system, angiotensin II receptor type 1, inflammation, arterial hypertension, nocturnal hypertension, 24-hour ambulatory blood pressure monitoring, non-dipping, nocturnal hypertension, left ventricular hypertrophy, echocardiography

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską

1. **Klimczak D**, Kuch M, Pilecki T, Żochowska D, Wirkowska A, Pączek L. „Plasma microRNA-155-5p is increased among patients with chronic kidney disease and nocturnal hypertension” J Am Soc Hypertens. 2017 Dec;11(12):831-841.e4. doi: 10.1016/j.jash.2017.10.008. Epub 2017 Oct 28. IF = 3,26, MNiSW 25 pkt
2. **Klimczak-Tomaniak D**, Pilecki T, Żochowska D, Sieńko D, Janiszewski M, Pączek L, Kuch M. „CXCL12 in Patients with Chronic Kidney Disease and Healthy Controls: Relationships to Ambulatory 24-Hour Blood Pressure and Echocardiographic Measures” Cardiorenal Med. 2018. (w druku) doi: 10.1159/000490396 IF = 1.84, MNiSW 25 pkt
3. **Klimczak D**, Jażdżewski K, Kuch M. „Regulatory mechanisms in arterial hypertension: role of microRNA in pathophysiology and therapy” Blood Press. 2017 Feb;26(1):2-8. doi: 10.3109/08037051.2016.1167355. Epub 2016 May 13. IF = 2.16, MNiSW 20 pkt

Łącznie: Impact Factor 7,26 Punktacja MNiSW 70 pkt

Publikacje będą cytowane w pracy jako Publikacje 1-3.

1. Streszczenie

Wprowadzenie

Pacjenci z przewlekłą chorobą nerek (ang. chronic kidney disease, CKD) stanowią grupę podwyższonego ryzyka sercowo-naczyniowego. Pomimo terapii ukierunkowanych na redukcję tradycyjnych czynników ryzyka, u pacjentów z CKD częściej niż w populacji ogólnej obserwuje się nadciśnienie tętnicze (ang. arterial hypertension, AH), przerost mięśnia sercowego (ang. left ventricular hypertrophy, LVH), czy chorobę niedokrwinną serca/chorobę wieńcową (ang. coronary artery disease, CAD), dlatego charakteryzują się oni wysoką śmiertelnością z przyczyn sercowo-naczyniowych. W części oryginalnej rozprawy doktorskiej ocenie poddano dwa, nieanalizowane wcześniej, biomarkery powikłań sercowo-naczyniowych CKD związane z układem renina-angiotensyna-aldosteron (RAA). Uwzględniają one związek układu RAA z układem immunologicznym oraz jego regulację na poziomie potranskrypcyjnej modyfikacji ekspresji genów. Wykładnikiem aktywacji układu immunologicznego, który został poddany analizie, jest chemokina CXCL12. Przyczynia się ona, pod wpływem mineralokortykoidów, do wzrostu ciśnienia tętniczego (ang. blood pressure, BP). Powoduje również napływ limfocytów T do miokardium, sprzyjając w ten sposób rozwojowi LVH. Regulatorem potranskrypcyjnym analizowanym w ramach dysertacji jest mikroRNA-155-5p, cząsteczka należąca do grupy niekodujących jednoniciowych fragmentów kwasu rybonukleinowego (RNA), tzw. mikroRNA (miRNA, miR). Wykazano, że miR-155-5p jest inhibitorem potranskrypcyjnym ekspresji genu dla receptora typu 1 (AT1R) dla angiotensyny II (AT II) - hormonu odgrywającego istotną rolę w patofizjologii AH. Ta zależność stanowi podstawę dla hipotezy, według której miR-155-5p może wywierać efekt antyhipertensyjny. Jednakże, poza wpływem na układ RAA, miR-155-5p wykazuje również szereg efektów plejotropowych, w tym m.in. zmniejsza ekspresję genu dla syntazy tlenku azotu oraz odgrywa rolę regulatora prozapalnego, co może z kolei nasilać AH. Biorąc pod uwagę powyższe mechanizmy, miR-155-5p może mieć zatem zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na wartości BP. W obecnej chwili, w zakresie badań nad nadciśnieniem tętniczym, nasza wiedza o działaniu miR-155-5p pochodzi jedynie z badań *in vitro* oraz obserwacji modeli zwierzęcych, a ostateczny efekt oddziaływania miR-155-5p w ludzkim organizmie do tej pory nie został zweryfikowany w badaniu klinicznym.

Cel pracy

Głównym celem prezentowanego badania jest ocena związku pomiędzy ekspresją miR-155-5p i stężeniem chemokiny CXCL12, oznaczanymi we krwi obwodowej, a występowaniem AH oraz dobową zmiennością wartości BP w grupie pacjentów z CKD. W niniejszej pracy oceniono także korelację pomiędzy stężeniem CXCL12 a LVH ocenianym w badaniu echokardiograficznym. Ponadto, na podstawie analizy danych literaturowych, podsumowano aktualną wiedzę dotyczącą roli mikroRNA w rozwoju AH oraz wstępne doniesienia o próbach terapii przeciwnadciśnieniowej z wykorzystaniem mikroRNA (Publikacja 3 – praca pogładowa).

Metodologia

Część oryginalną rozprawy doktorskiej (Publikacje 1-2) stanowi prospektywne, obserwacyjne badanie kliniczne, do którego włączono pacjentów z CKD (w kategorii G1-G5 wg *Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO*, z wyłączeniem pacjentów dializowanych).

U wszystkich chorych włączonych do badania (n = 105) oznaczono ekspresję miR-155-5p w osoczu, wykorzystując metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction, rt-PCR) oraz U6 snRNA (ang. small nuclear RNA, mały jądrowy RNA) jako gen referencyjny, a w grupie 90 pacjentów wykonano 24-godzinną rejestrację BP (ang. 24-hour ambulatory blood pressure monitoring, ABPM) (Publikacja 1). Ponadto u 90 pacjentów, u których wykonano ABPM, oznaczono stężenie chemokiny CXCL12 w surowicy z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego (ang. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA); u 27 chorych wyliczono wskaźnik przerostu mięśnia lewej komory serca (ang. left ventricular mass index, LVMI) na podstawie wykonanych przezklatkowych badań echokardiograficznych (Publikacja 2). Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy, dopasowani pod względem wieku i płci, z optymalną, prawidłową lub wysoką prawidłową wartością pomiaru gabinetowego BP, u których wykonano komplet badań, taki sam jak w grupie badanej. Pracę pogładową oparto natomiast na przeglądzie piśmiennictwa z zakresu medycyny, biologii komórki i genetyki w powszechnie dostępnych bazach publikacji naukowych (Publikacja 3).

Wyniki

W Publikacji 1 ocenie poddano związek pomiędzy osoczną ekspresją miR-155-5p a wartościami BP w badaniu ABPM wśród pacjentów z CKD, w porównaniu do grupy kontrolnej złożonej ze zdrowych ochotników.

Wśród włączonych do badania 105 pacjentów z CKD w stadium 1-5, w tym 33 pacjentów po przeszczepieniu nerki, wyłączając pacjentów dializowanych (średni wiek 59 ± 14 lat, mężczyźni - 47% badanej populacji) stwierdzono istotnie wyższą ekspresję względną miR-155-5p w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej [mediana (pierwszy kwartył - trzeci kwartył): 2,92 (1,34 – 5,58)]. Co ważne, wśród pacjentów z CKD, w grupie 41 pacjentów (45%) z nocnym nadciśnieniem tętniczym (ang. nocturnal hypertension, NHT) ekspresja miR-155-5p była znamienne wyższa w porównaniu do chorych bez NHT [4,04 (2,92-10,8) vs. 2,01 (1,21-3,07), $p < 0,001$], zachowując istotny związek ze średnim nocnym SBP w wieloczynnikowej liniowej analizie regresji.

W Publikacji 2 zaobserwowano wyższe stężenie CXCL12 w surowicy pacjentów z CKD względem zdrowych osób z grupy kontrolnej. Na podstawie przeprowadzonej wieloczynnikowej liniowej analizy regresji wykazano istotną korelację pomiędzy chemokina CXCL12 ($B = 0,33$, $p = 0,02$), wiekiem ($B = 0,30$, $p = 0,03$), płcią męską ($B = 0,41$, $p = 0,003$) a LVH wyrażonym LVMI. Ponadto stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem CXCL12 a średnimi wartościami skurczowego ciśnienia tętniczego (ang. systolic blood pressure, SBP) w ABPM: dobowymi ($\rho = 0,35$, $P=0,001$), dziennymi ($\rho = 0,35$, $p = 0,001$) i nocnymi ($\rho = 0,30$, $p = 0,002$). Zaobserwowano także odwrotną zależność pomiędzy CXCL12 a szacowanym wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej (ang. estimated glomerular filtration rate, eGFR), $\rho = -0,61$, $p = 0,001$.

W Publikacji 3, na podstawie przeglądu dostępnych danych literaturowych z badań przedklinicznych i klinicznych, podsumowano znaczenie mikroRNA w patogenezie AH. Przedstawiono biogenezę mikroRNA, ich mechanizm działania oraz rolę w regulacji BP, wraz ze wskazaniem możliwości potencjalnego wykorzystania miR-503 i miR-204 w leczeniu nadciśnienia płucnego.

Wnioski

1. W grupie badanej pacjentów z CKD, 45% charakteryzuje się NHT, pomimo stosowanej farmakoterapii. Ponad połowa z nich ma prawidłową kontrolę AH ocenianą na podstawie pomiarów BP wykonanych w trakcie wizyt ambulatoryjnych.

2. Ekspresja względna miR-155-5p jest zwiększona u pacjentów z CKD w porównaniu do grupy kontrolnej obejmującej zdrowe osoby z prawidłową funkcją nerek.
3. Wśród pacjentów z CKD, ekspresja względna miR-155-5p jest wyższa u chorych z NHT w porównaniu do pacjentów z adekwatną kontrolą AH w nocy, co wskazuje, że cząsteczka ta może brać udział w patogenezie AH w tej populacji pacjentów, a zwłaszcza w zaburzeniach rytmu dobowego BP.
4. Stężenie chemokiny CXCL12 w surowicy jest wyższe u pacjentów z CKD i istotnie wzrasta wraz z pogorszeniem funkcji nerek wyrażonym obniżeniem eGFR.
5. Stężenie CXCL12 wykazuje istotny związek z obecnością LVH. W analizie wieloczynnikowej CXCL12 jest istotnym predyktorem LVMI, podobnie jak: wiek i płeć męska.
6. Podwyższone stężenie CXCL12 w surowicy oraz związek CXCL12 z LVH, wskazują, że chemokina ta może odgrywać rolę toksyny mocznicowej w organizmie pacjentów z CKD.
7. W oparciu o analizę piśmiennictwa, stwierdzono, że mikroRNA biorą udział w wielu procesach regulujących wartości BP w organizmie i ich osoczowa ekspresja ulega zmianie w przypadku chorych z AH.
8. Na modelach zwierzęcych nadciśnienia płucnego zaobserwowano, że wybrane miRNA wykazują działanie obniżające ciśnienie w tętnicach płucnych. W piśmiennictwie nie opisywano do tej pory skutecznej terapii z wykorzystaniem miRNA w przypadku AH pierwotnego.

2. Abstract

Introduction

Patients with chronic kidney disease (CKD) represent a group of increased cardiovascular risk. Despite being treated with therapies acting against traditional risk factors, CKD patients present with arterial hypertension (AH), left ventricular hypertrophy (LVH) or coronary artery disease (CAD) more frequently than general population. These patients are therefore characterized by high cardiovascular mortality.

In the original part of the dissertation, CXCL12 and microRNA-155-5p, two previously unverified biomarkers of CKD cardiovascular complications related to the renin-angiotensin-aldosterone system (RAA) were evaluated. CXCL12 constitutes a link between RAA and the immune system. Stimulated by mineralocorticoids, it triggers an increase in blood pressure (BP). Moreover, CXCL12 induces the infiltration of myocardium by lymphocytes T. As a result, it contributes to the development of LVH. It was shown that microRNA-155-5p is a post-transcriptional inhibitor of the type 1 receptor (AT1R) for angiotensin II (AT II) – a hormone of vital importance for AH pathophysiology. The inhibitory action exerted by miR-155-5p over AT1R provided the basis for our hypothesis that microRNA-155-5p may exert anti-hypertensive effects. In addition to its action within the RAA system, microRNA-155-5p reduces the expression of nitric oxide synthase and plays the role of a pro-inflammatory regulator. The latter two ways of miR-155-5p action may in turn increase BP. Therefore, microRNA-155-5p may influence both positively and negatively BP control. Up until now, the knowledge on miR-155-5p actions involved in BP regulation is derived only from *in vitro* studies and animal models. The final effect of its altered expression on BP within the human body has not been verified in clinical trial so far.

Aim of the study

The main objective of the presented study was to evaluate the relationship between: 1) the expression of microRNA-155-5p; 2) the concentration of CXCL12 chemokine in peripheral blood and the occurrence of AH assessed by ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) in the group of patients presenting with CKD. This study also evaluated the correlation between CXCL12 and LVH assessed by echocardiography. In addition, based on the analysis of literature data, the current knowledge on the role of microRNA in AH development and preliminary reports on antihypertensive therapy with the application of microRNAs have been summarized (Publication 3 - review article).

Patients and methods

The original part of the thesis (Publications 1-2) is a prospective, observational clinical trial, which included patients with CKD (G1-G5 categories according to *Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO*, excluding patients on dialysis). In all subjects enrolled in the study (n = 105), miR-155-5p expression in plasma was determined using real-time polymerase chain reaction (rt-PCR) and U6 snRNA (small nuclear RNA) as a reference gene. The 24-hour ABPM was performed in 90 patients (Publication 1). In addition to ABPM, chemokine CXCL12 serum concentration was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 90 patients; left ventricular mass index (LVMI) was calculated in 27 patients based on echocardiography (Publication 2). The control group consisted of age- and gender-matched healthy volunteers, presenting with optimal, normal or high normal office BP measurement values. The members of the control group underwent the same set of examinations as the study group. Publication 3 was based on the review of the literature in the field of medicine, cell biology and genetics via available scientific databases.

Results

In Publication 1, the relationship between plasma miR-155-5p expression and 24-hour BP values was evaluated. The study group consisted of 105 patients with stage 1-5 CKD aged 59 ± 14 years, including 33 renal transplant recipients, 47% men. A higher miR-155-5p expression was found in plasma of CKD patients [median (lower quartile – upper quartile): 2.92 (1.34-5.58)] as compared to the control group. Importantly, among patients with CKD, in a group of 41 patients (45%) with nocturnal hypertension (NHT), the expression of miR-155-5p was significantly higher compared to patients without NHT [4.04 (2.92-10.8) vs. 2.01 (1.21-3.07), $p < 0.001$] and maintained a significant relationship with the average night-time systolic blood pressure (SBP) by multiple linear regression model.

In Publication 2, higher serum concentration of CXCL12 in CKD patients was observed, as compared to healthy control subjects. By multiple linear regression analysis, a significant correlation was found between CXCL12 chemokine (B = 0.33, $p = 0.02$), age (B = 0.30, $p = 0.03$), male sex (B = 0.41, $p = 0.003$) and LVH quantified by LVMI. In addition, there was a significant positive correlation between serum CXCL12 and average SBP values: 24-hour ($\rho = 0.35$, $p = 0.001$), daytime ($\rho = 0.35$, $p = 0.001$) and night-time SBP ($\rho = 0.30$, $p = 0.002$). Also, the inverse relationship between CXCL12 and estimated glomerular filtration rate (eGFR) was found ($\rho = -0.61$, $p = 0.001$).

In Publication 3, the importance of microRNA in the pathogenesis of AH was summarized on the basis of a review of available literature data, both from preclinical and clinical studies.

The characteristics of microRNAs, their biogenesis and role in BP regulation have been presented, along with the results of in-human studies and an indication of the potential use of microRNA in the treatment of pulmonary hypertension.

Conclusions

1. Within the studied CKD population, 45% of patients present with NHT despite being on antihypertensive pharmacotherapy. More than half of patients with NHT have proper BP control according to the office BP measurement.
2. The expression of miR-155-5p is increased among patients with CKD, compared to the control group of healthy people with normal renal function.
3. Among patients with CKD, miR-155-5p expression is higher in patients with NHT, compared to patients with adequate night-time control of AH, which indicates that miR-155-5p may play a role in the pathogenesis of AH and especially NHT in patients with CKD.
4. Increased serum CXCL12 concentration is observed in patients with CKD. Serum CXCL12 rises significantly together with the decline in renal function expressed as reduced eGFR.
5. Serum CXCL12 concentration correlates significantly with the presence of LVH. By multivariate regression analysis, CXCL12 is a significant predictor of LVH, together with age and male gender.
6. The elevated serum concentration of CXCL12 and the correlation between CXCL12 and LVH observed in the presented study indicate, that this chemokine may play the role of uremic toxin within the CKD patients.
7. Based on the analysis of the literature, it was found that microRNAs are involved in many processes regulating BP and their expression is altered in plasma of patients with AH.
8. MicroRNAs present therapeutic potential, as it was demonstrated in animal models of pulmonary hypertension. Up until now, no studies report on effective treatment with miRNA in case of primary hypertension.