Značenje mikroRNA u razvoju kronične bubrežne bolesti

Ivošević, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:534496

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Anja Ivošević

Značenje mikroRNA u razvoju kronične bubrežne bolesti

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za internu medicinu Kliničke bolnice Merkur, u Kliničkoj jedinici za hitnu i internu medicinu pod vodstvom prof. dr. sc. Ingrid Prkačin, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

ACE	Angiotenzin konvertirajući enzim
Adam12 i Adam19	Disintegrin I metaloproteinaza, engl. ***a d****isintegrin* ***a****nd* ***m****etalloproteinase*
ADAR	Adenozin deaminaza koja djeluje na RNA
ADMA	Asimetrični dimetilarginin
AGO	engl. *argonaute*
ApppN kapa	Adenozin trifosfatna kapa
Azin1	engl. *Antizynme inhibitor 1*
BMP	Koštani morfogeni faktor, engl. *bone morphogenic factor*
C1GALT1	β1,3-galaktoziltransferaza
DAI	Indeks aktivnosti bolesti, engl. *disease activity indeks*
DDAH1	Dimetilarginin dimetlaminohidrolaza
DGCR8	engl. *DiGeorge critical region 8*
EBV	Epstein Barr virus
eIF	Eukariotski translacijski inicijacijski faktor
ERK/MAPK	Ekstracelularnim signalom regulirane kinaze/mitogenom aktivirana protein kinaza
GALNT2	N-acetilgalaktozamintransferaza 2
GFR	engl. *glomerular filtration rate*
HDAC4	Histon deacetilaza 4
Hnf-1β	engl. *hepatocyte nuclear factor 1β*
hnRNP A1	engl. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1*
IAA	Indol-3-acetična kiselina
ICAM-1	Intracelularna adhezijska molekula 1
IFN-1	Interferon-1
IgA	Imunoglobulin A
IL-1, IL-6	Interleukin-1, interleukin-6
IRES	engl. *internal ribosomal entry site*
IS	Indoksil sulfat
KBB	Kronična bubrežna bolest
KLK4	Kalikrein povezana peptidaza 4
LN	Lupusni nefritis
m7GpppN kapa	7 metil gvanozin trifosfatna kapa
MET	Mezenhimalno-epitelna tranzicija
miRNA	Mikro RNA
miRNP	Mikro-ribonukleoproteini
MMP	Matriks metaloproteinaza
NF-κB	Nuklearni faktor κB
NSAID	Nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi

PACT	engl. *protein activator of PKR*
PBMC	mononuklearne stanice iz periferne krvi, engl. *peripheral blood mononuclear cells*
PCS	p-krezil sulfat
PDCD4	engl. *Proinflammatory programmed cell death 4*
PDGF	Čimbenik rasta podrijetla iz trombocita
PI3K	Fosfoinozitin-3-kinaza
Pkd1, Pkd2	engl. *polycystic kidney disease 1 gene*, *polycystic kidney disease 2 gene*
Pkhd1	engl. *polycystic kidney and hepatic disease 1 gene*
PPAR-α	Peroksisomnim proliferatorom aktiviran receptor alfa, engl. *peroxisome proliferator-activated receptor-alpha*
PTEN	Fosfatazni i tenzinski homolog, engl. *phosphatase and tensin homolog*
PTH	Paratireoidni hormon
Ran-GTP	engl. ***RA****s-related* ***N****uclear protein guanosine triphosphate*
RISC	engl. *RNA-induced silencing complex*
RLC	engl. *RISC loading complex*
SBE	engl. *Smad-binding site*
SLE	Sistemski eritematozni lupus
SMAD	SMA (engl. *small worm phenotype*) + MAD (engl. *Mothers Against Decapentaplegic*)
TGF-β	Transformirajući čimbenik rasta beta
TLR7 i TLR8	Toll-like receptori
TRBP	engl. *TAR RNA binding protein*
Vnp-1	Vakuloni membranski protein 1
ZEB1 i ZEB2	engl. *zinc finger E-box-binding homeobox*
α-SMA	Alfa glatkomišićni aktin, engl. *alpha-smooth muscle actin*

SADRŽAJ

SAŽETAK i

SUMMARY ii

1. **KRONIČNA BUBREŽNA BOLEST** 1

1.1. DEFINICIJA 1
1.2. KLASIFIKACIJA 1
1.3. EPIDEMIOLOGIJA 1
1.4. ETIOLOGIJA 1
1.5. PATOGENEZA 2
1.6. PATOFIZIOLOGIJA 2
1.7. KLINIČKA SLIKA 3
1.8. KOMPLIKACIJE 4
1.9. DIJAGNOSTIČKI POSTUPAK 7
1.10. LIJEČENJE 7

2. **MIKRO RNA I NJIHOV KLINIČKI ZNAČAJ** 9

2.1. SINTEZA miRNA 9
2.2. MEHANIZMI INTERAKCIJE miRNA i mRNA 10
2.3. NOMENKLATURA miRNA 11

3. **MIKRO RNA I BUBREG** 12

3.1. ULOGA MIKRO RNA U RAZVOJU I FIZIOLOGIJI BUBREGA 12
3.2. MIKRO RNA I BUBREŽNA FIBROZA 13
3.2.1 ULOGA POJEDINIH miRNA U BUBRŽNOJ FIBROZI 15
3.3. KLINIČKI ZNAČAJ MIKRO RNA 16
3.4. MIKRO RNA KAO POTENCIJALNI BIOMARKER 17
3.5. TERAPIJSKA ULOGA MIKRO RNA 19

4. **MIKRO RNA U POJEDINIM BUBREŽNIM BOLESTIMA** 22

4.1. LUPUSNI NEFRITIS 22
4.2. IgA NEFROPATIJA 23
4.3. POLICISTIČNA BUBREŽNA BOLEST 27

5. **MIKRO RNA U KARDIOVASKULARNIM KOMPLIKACIJAMA KBB** 30

6. **ZAKLJUČAK** 32

ZAHVALE 33

LITERATURA 34

ŽIVOTOPIS 40

SAŽETAK

Značenje mikroRNA u razvoju kronične bubrežne bolesti

Anja Ivošević

Kronična bubrežna bolest jedan je od najčešćih uzroka morbiditeta i mortaliteta danas u svijetu. Postoji čitav spektar etioloških faktora koji mogu biti povezani s kroničnom bubrežnom bolesti, od kojih većina predstavlja značajan javnozdravstveni problem, primjerice dijabetes mellitus i hipertenzija. Drugi, manje značajni uzroci su lupusni nefritis i drugi glomerulonefritisi te policistična bolest bubrega. Neovisno o uzroku, neliječena kronična bubrežna bolest dovodi do terminalne bubrežne bolesti i potrebe za dijalizom ili transplantacijom. MikroRNA (miRNA) su jednolančane nekodirajuće RNA molekule građene od 21-25 nukleotida koje posreduju posttranslacijsku regulaciju gena. Preko tisuću različitih miRNA kodirano je ljudskim genomom. Može ih se pronaći u raznovrsnim tkivima, a u različitim tkivima različito su eksprimirane. Posljednjih godina za miRNA se pokazalo da su uključene u različite biološke procese poput diferencijacije, proliferacije i apoptoze stanica. Prikazana je uloga miRNA kao ključnih igrača u patogenezi brojnih bolesti u čovjeka, primjerice neoplazmi, zatajenja srca, dijabetesa, debljine, zaraznih bolesti te genetskih poremećaja. Brojni dokazi govore u prilog značaju miRNA u razvoju bubrega i uredne bubrežne funkcije. Stoga nije nimalo iznenađujuće da se poremećaj regulacije miRNA može uočiti u različitim bubrežnim bolestima. Otkriće da cirkulirajuće miRNA mogu biti detektirane u serumu i plazmi te da je njihova ekspresija može varirati zbog bolesti predstavlja značajan potencijal njihove uporabe kao biomarkera prevencije i dijagnoze bubrežnih bolesti. Pored toga, terapija temeljena na miRNA može djelovati ili obnavljanjem njihove funkcije ili blokiranjem njihove ekspresije i aktivnosti vrlo je atraktivna, ali nije još u potpunosti razvijena. Unatoč brzoj progresiji u otkrivanju miRNA i njihove uloge u raznovrsnim bubrežnim bolestima, patofiziologija i klinički značaj miRNA molekula je još uvijek nedostatno razjašnjen.

Ključne riječi: miRNA, kronična bubrežna bolest, epigenetika, biomarker

SUMMARY

Significance of microRNA in development of chronic kidney disease

Anja Ivošević

Chronic kidney disease is one of the main causes of morbidity and mortality in the world today. There is a whole spectrum of etiological factors that can be linked with chronic kidney disease, most of which are important public health problems, for example diabetes mellitus and hypertension. Other, less significant causes are lupus nephritis and other glomerulonephritis, as well as polycystic kidney disease. Regardless of the cause, chronic kidney disease, if untreated, leads to end-stage renal disease, requiring either dialysis or transplantation. MicroRNAs (miRNA) are short non-coding single-stranded 21-25 nucleotide RNA molecules that mediate posttranscriptional gene regulation. Over a thousand different miRNAs are known to be encoded by the human genome. They are found in various tissues with variable expression. In recent years miRNAs have been shown to be involved in a variety of biological processes, including cell differentiation, proliferation and apoptosis. MiRNAs have emerged as key players in the pathogenesis of numerous human diseases, such as cancer, heart failure, diabetes, obesity, infectious diseases and even genetic disorders. There is evidence suggesting that miRNAs are important in kidney development and essential for normal kidney function. Thus, it is not surprising that miRNA dysregulation has been observed in kidney disease. The discovery that circulating miRNAs are detectable in serum and plasma and that their expression varies as a result of the disease, presents great potential to be used as biomarkers in kidney disease prevention and diagnosis. Moreover, a miRNA-based therapy that either restores or blocks miRNA expression and activity is very attractive but not yet fully developed. Despite rapid progress in discovering miRNAs and their roles in various kidney diseases, we still have a long way to go in our understanding of miRNA pathophysiology and clinical significance.

Keywords: miRNA, chronic kidney disease, epigenetics, biomarkers

1. KRONIČNA BUBREŽNA BOLEST

1.1. DEFINICIJA

Kronična bubrežna bolest (KBB) zamijenila je raniji naziv kronično bubrežno zatajenje. Riječ je o kliničkom sindromu obilježenom progresivnim i trajnim oštećenjem svih funkcija bubrega – ekskrecijske, endokrine i metaboličke. (1,2)

Prema Američkoj udruzi nefrologa kronična bubrežna bolest definirana je ili oštećenjem bubrega koje se očituje proteinurijom, hematurijom ili abnormalnostima parenhima ili smanjenom bubrežnom funkcijom koja se očituje glomerularnom filtracijom < 60 mL/min/1.73 m^2 u trajanju duljem od 3 mjeseca. (1–3)

Terminalna bubrežna bolest (engl. *end-stage renal disease*) je završni stadij KBB u kojem je neophodno nadomjesno liječenje. (2,4)

1.2. KLASIFIKACIJA

Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) izdala je, a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) potvrdila klasifikaciju KBB. Navedena klasifikacija trebala bi reflektirati prognozu i ishode KBB. Klasifikacija je prikazana u tablici 1. (5)

Tablica 1. Klasifikacija kronične bubrežne bolesti. Oznaka: GFR = engl. *glomerular filtration rate*. Modificirano prema KDIGO (5)

stadij	**GFR** (mL/min/1.73 m^2)	**opis**
1	> 90	normalna ili povišena glomerularna filtracija uz nalaz drugih znakova oštećenja bubrega
2	60-89	blago snižena glomerularna filtracija uz nalaz drugih znakova oštećenja bubrega
3 **3A** **3B**	 45-59 30-44	umjereno snižena glomerularna filtracija s ili bez nalaza drugih znakova oštećenja bubrega
4	15-29	značajno snižena glomerularna filtracija s ili bez nalaza drugih znakova oštećenja bubrega
5	< 15	utvrđeno zatajenje bubrega

1.3. EPIDEMIOLOGIJA

Incidencija bolesnika sa završnom fazom KBB je u porastu. U većini zemalja procijenjena prevalencija KKB iznosi 5-14%, a raste i do nekoliko puta u starijoj životnoj dobi. Prema podacima CEZIH-a i baze hospitalizacija, u RH je u 2016. godini zabilježeno 1 736 osoba koje su zbog KBB koristile zdravstvenu zaštitu. Prema Registru nadomještanja bubrežne funkcije na kraju 2012. godine u Hrvatskoj je 4406 osoba živjelo uz pomoć nadomještanja bubrežne funkcije, odnosno 1028 na milijun stanovnika. KBB je dosegla pandemijske razine sa značajnim socijalnim i ekonomskim posljedicama. (6–8)

1.4. ETIOLOGIJA

Uzroci KBB su brojni, a udio pojedinih kliničkih entiteta ovisi o geografskom području i životnoj dobi. U razvijenim zemljama više od 70% uzroka čine dijabetička nefropatija, hipertenzivna i aterosklerotska nefroskleroza, a relativno čest uzrok su i glomerulopatije. U nerazvijenim zemljama značajni su uzroci infekcije (bakterijske, parazitske, tuberkuloza) i opstruktivna uropatija. U dječjoj dobi značajan etiološki faktor KBB čine i različite nasljedne bolesti. Etiologija KBB prikazana je u tablici 2. (1–3)

Tablica 2. Najčešći uzroci kronične bubrežne bolesti. Prema Current Medical Treatment and Diagnosis i Kumar & Clark's Clinical Medicine (2,3)

<table>
<tr><th>glomerularne bolesti</th><th>vaskularne bolesti</th></tr>
<tr><td>primarni glomerulonefritisi
bolest minimalnih glomerularnih promjena
fokalna segmentalna glomeruloskleroza
membranska nefropatija
membranoproliferativni glomerulonefritis
IgA nefropatija
Alportov sindrom
sekundarni glomerulonefritisi
dijabetička nefropatija
postinfektivni glomerulonefritis
amiloidoza
lupusni nefritis
Wegenerova granulomatoza
sistemska skleroza
hemolitičko-uremijski sindrom
trombocitopenična purpura</td><td>hipertenzivna nefroskleroza
renovaskularne bolesti
vaskulitisi srednjih i malih krvnih žila
opstrukcije urinarnog trakta
nefrolitijaza
retroperitonealna fibroza
tumori zdjelice
bolesti prostate
nasljedne bolesti
policistična bubrežna bolest – infantilni adultni tip
medularna cistična bolest
tuberozna skleroza
oksaloza
cistinoza
kongenitalna opstruktivna uropatija</td></tr>
<tr><th>tubulointersticijske bolesti</th><td></td></tr>
<tr><td>tubulointersticijski nefritis – idiopatski, uzrokovan lijekovima i teškim metalima i imunoposredovan
kronični pijelonefritis
refluksna nefropatija
nefrokalcinoza
endemska nefropatija
renalna papilarna nekroza
multipli mijelom (bubrežni mijelom)
tuberkuloza
shistosomijaza</td><td></td></tr>
</table>

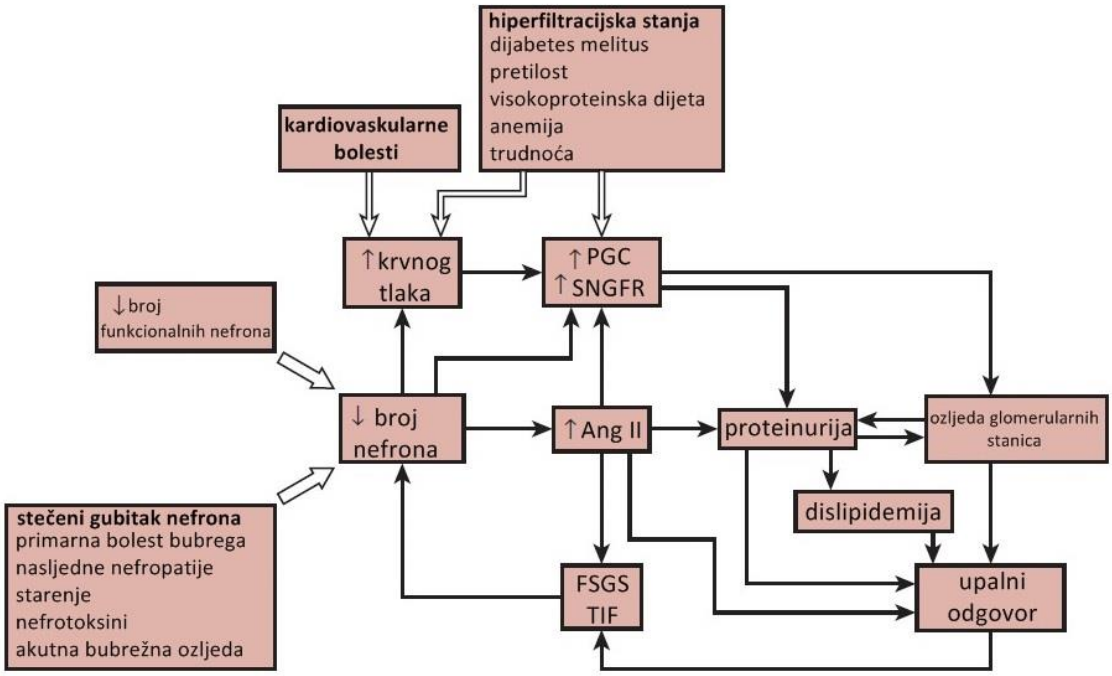
1.5. PATOGENEZA

Prema **hipotezi o intaktnom nefronu**, relativno normalni, neoštećeni nefroni funkcionalno i anatomski hipertrofiraju i preuzimaju funkciju propalih nefrona. Na taj način se homeostaza održava relativno drugo, razine kreatinina ostaju dugo vremena u normalnim granicama, a ravnoteža tjelesnih tekućina i elektrolita je održana. Koncentracije natrija i kalija održane su sve dok je glomerularna filtracija veća od 5 mL/min. Mehanizmi prilagodbe manje su uspješni za kalcij, fosfate i urate te je njihova koncentracija u plazmi povišena uz glomerularnu filtraciju 5-10 mL/min. Metabolička adicoza pojavljuje se kad je glomerularna filtracija smanjena na 20 mL/min dok se sposobnost dilucije i koncentracije urina gubi ranije. Vremenom hipertrofirani nefroni bivaju preopterećeni što dovodi do njihove skleroze i fibroze i kraha svih dotad održavanih bubrežnih funkcija. (1,3)

1.6. PATOFIZIOLOGIJA

Zatajivanje bubrežne funkcije remeti funkcije gotovo svih organa i organskih sustava. Poremećaj ekskrecijske funkcije dovodi do nakupljanja uremičkih toksina (mokraćna kiselina, kreatinin, karbamid, guanidin, metil-

guanidin). Navedeni spojevi mijenjaju funkciju brojnih enzima i proteina u organizmu. Jedna od najznačajnijih posljedica zatajivanja bubrežne funkcije jest poremećaj ravnoteže vode i elektrolita. Očituje se poliurijom i izostenurijom, smanjenom glomerularnom filtracijom natrija te nedovoljnim izlučivanjem kalija. Uslijed nedovoljne sinteze amonijaka, smanjene regeneracije bikarbonata u tubulima, ali i zbog zadržavanja različitih aniona (fosfati, sulfati, anioni organskih kiselina) razvija se metabolička acidoza. Zbog hiperfosfatemije i oštećenja bubrežnog parenhima smanji se sinteza vitamina D3 što snizi koncentraciju kalcija. Posljedično, zbog hiperfosfatemije, hipokalcijemije i manjka vitamina D, dolazi do pojačanog lučenja paratireoidnog hormona (PTH). Smanjena sinteza eritropoetina glavni je uzrok anemije. Metabolička insuficijencija očituje se u poremećaju metabolizma proteina, ugljikohidrata i lipida. Nedovoljno izlučivanje metaboličkih produkata proteina odgovorno je za nepodnošenje proteina. Smanjeno metaboliziranje inzulina u proksimalnom kanaliću dovodi do hiperinzulinizma, a kao posljedica nastaje hipertrigliceridemija i intolerancija glukoze. Pored toga, uremijski toksini mogu uzrokovati neosjetljivost perifernih tkiva na inzulin. Stoga su u KBB moguće hiper- i hipoglikemija. (1,9)



Slika 1. Interakcija rizičnih čimbenika i patofizioloških mehanizama KBB. Prikazan je čitav niz faktora koji u konačnici dovode do progresivnog gubitka nefrona. Oznake: Ang II = angiotenzin II, FSGS = fokalna segmentalna glomeruloskleroza, PGC = glomerularni kapilarni hidraulički tlak, SNGFR = engl. *single-nephron glomerular filtration rate*, TIF = tubulointersticijska fibroza. Modificirano prema Maarten W. Taal (10)

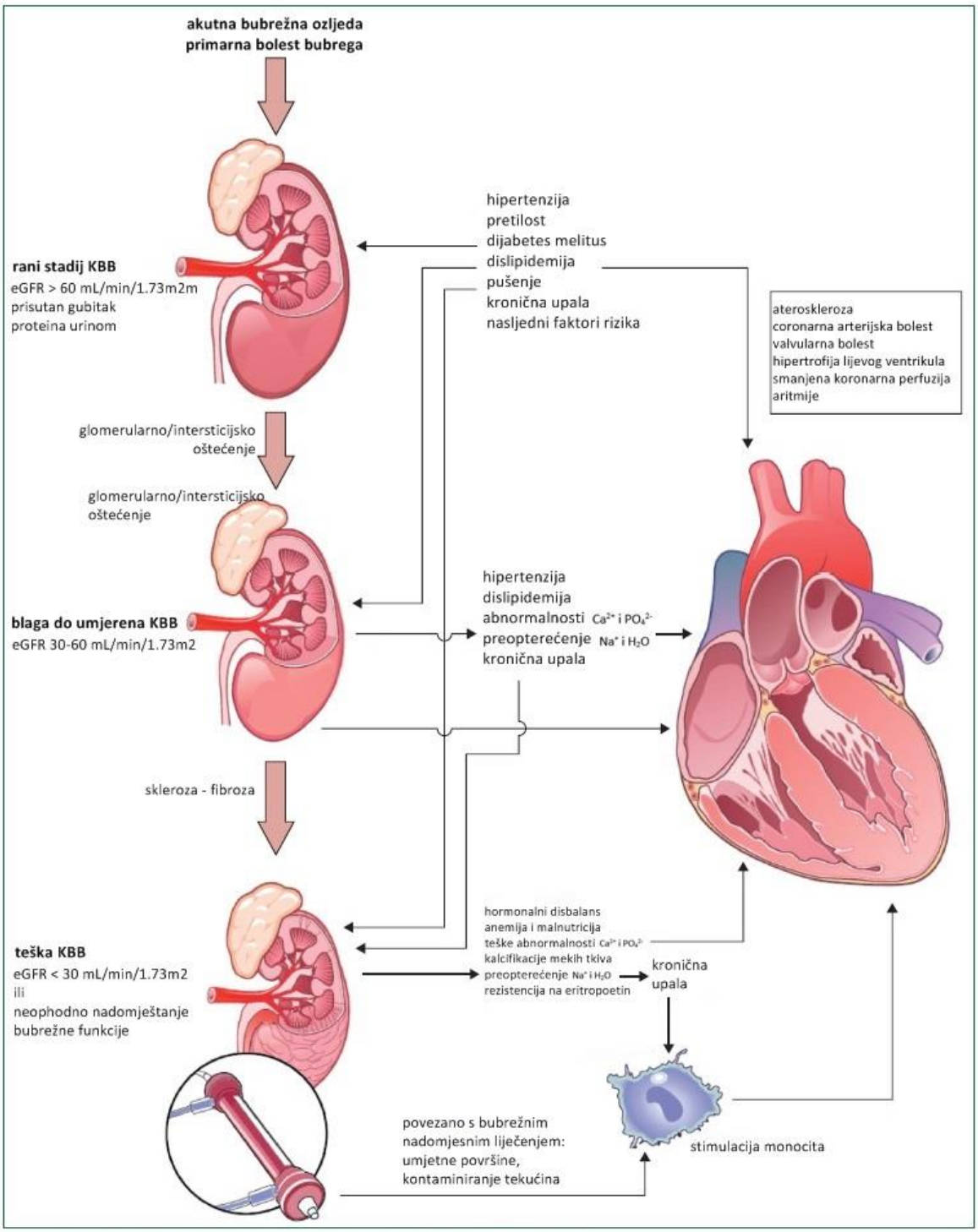
1.7. KLINIČKA SLIKA

Dugo vremena bolest je u potpunosti asimptomatska. Klinički simptomi bolesti pojavljuju se tek kada glomerularna filtracija padne ispod 30 mL/min/1.73m^2, a mnogi bolesnici nemaju simptome i pri puno nižoj glomerularnoj filtraciji. U 1. i 2. stadiju bolesnici obično nemaju simptome, odnosno ako oni postoje, vezani su uz inicijalnu bolest koja je dovela do kronične bolesti bubrega. U 3. i 4. stadiju KBB se očituje kliničkom slikom i laboratorijskim poremećajima. U 3. stadiju dolazi do zadržavanja dušičnih tvari u krvi. To stanje nazivamo **azotemija**. Najvažniji klinički znakovi u tom stadiju su opća slabost, malaksalost, iritabilnost, anoreksija, mučnina, anemija, nikturija, hipertenzija, pruritus i poremećaji menstruacijskog ciklusa i smanjen

libido, a mogu se pronaći i poremećaj metabolizma kalcija i fosfata, elektrolitski i acidobazni disbalans. Daljnjim gubitkom bubrežne funkcije (4. stadij) nastaje pogoršanje u sastavu tjelesnih tekućina, elektrolita, acidobaznog statusa te pogoršanje anemije i hipertenzije. Nastaju i komplikacije na pojedinim organskim sustavima – kardiovaskularne, gastrointestinalne, hematološke, endokrinološke i lokomotorne. To je terminalna bubrežna bolest (5. stadij). 4. i 5. stadij obilježava uznapredovala insuficijencija bubrega koja se naziva **uremija**. (1,4)

1.8. KOMPLIKACIJE

Poremećaji kardiovaskularnog sustava. Bolesnici s KBB imaju značajniji morbiditet i mortalitet od kardiovaskularnih bolesti u usporedbi s općom populacijom. 80-90% bolesnika s KBB umire prvenstveno od kardiovaskularnih posljedica. Hipertenzija je najčešća komplikacija KBB. Prisutna je od najranijih stadija, a pokazuje tendenciju pogoršavanja. Prema nastanku svrstavamo je u volumnu i vazokonstriktornu, a u njezinoj patogenezi sudjeluje više čimbenika: retencija natrija i vode, povećanje koncentracije renina i aktivacija renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava. Važnu ulogu ima i deficit vazodilatacijskih prostaglandina. Akcelerirana ateroskleroza nastaje kao posljedica dugotrajne hipertenzije, hiperlipidemije i intolerancije glukoze. Uslijed ateroskleroze nastaju okluzivne bolesti koronarnih, cerebralnih i perifernih krvnih žila. Kongestivna kardiomiopatija razvija se zbog ateroskleroze, hipertenzije i anemije. Uremički perikarditis nastaje rijetko, zbog retencije metaboličkih toksina. Klinička slika tog perikarditisa ne razlikuje se od kliničke slike perikarditisa druge etiologije, a pojava perikarditisa indikacija je za početak dijalize. Kao posljedica hiperkalijemije mogu se uočiti i promjene u EKG-u. Utjecaj KBB na funkcioniranje srca prikazan je na slici 2. (1–4,11)



Slika 2. Patofiziološke interakcije između srca i bubrega u KBB. Oznake: eGFR = engl. *estimated glomerular filtration rate*. Modificirano prema Gansevoort (11)

Međuovisnost oštećenja organskih sustava srca i bubrega definirana je kao **kardiorenalni sindrom**, složeni patofiziološki poremećaj i srca i bubrega u kojem akutna ili kronična disfunkcija jednog organa može dovesti do akutnog ili kroničnog oštećenja drugog organa. Aktualna je klasifikacija kardiorenalnog sindroma prema AQDI. Prema navedenoj klasifikaciji postoje 4 tipa kardiorenalnog sindroma, ali podjela nije stroga jer postoje velika preklapanja između pojedinih tipova. Klasifikacija je prikazana u tablici 3. (12)

Tablica 3. Klasifikacija kardiorenalnog sindroma. Prema Bergman Marković (12)

vrsta kardiorenalnog sindroma	obilježja
kardiorenalni sindrom tip 1 (akutni kardiorenalni sindrom)	akutno renalno oštećenje koje nastaje kao posljedica naglog novonastalog zatajenja srca ili naglog pogoršanja postojećeg zatajenja srca
kardiorenalni sindrom tip 2 (kronični kardiorenalni sindrom)	počinje s kroničnim zatajenjem srca koje uzrokuje hipoperfuziju i kronično zatajivanje bubrega
kardiorenalni sindrom tip 3 (akutni renokardijalni sindrom)	akutna bubrežna ozljeda dovodi do akutnog zatajenja srca, ishemije miokarda ili artimija
kardiorenalni sindrom tip 4 (kronični renokardijalni sindrom)	karakteriziran je kroničnim slabljenjem srčane funkcije, hipertroijom lijeve klijetke i/ili povećanjem rizika za neželjeni kardiovaskularni događaj, a nastaje kao posljedica KBB
kardiorenalni sindrom tip 5 (sekundarni kardiorenalni sindrom)	nastaje kao posljedica velikog broja akutnih ili kroničnih sustavnih bolesti (sepsa, dijabetes, SLE)

Poremećaji gastrointestinalnog sustava. Najčešći simptomi su mučnina, gubitak apetita i mršavljenje. Karakterističan je amonijakalni zadah koji nastaje zbog razgradnje ureje u usnoj šupljini pod utjecajem bakterijske ureaze. Krvarenja iz probavnog sustava su česta, a nastaju iz erozivnog gastritisa i ulkusne bolesti kao posljedica visoke koncentracije gastrina čija je razgradnja u KBB smanjena. Povećan je rizik za akutni pankreatitis, a često je i povišena razina amilaza u serumu bez znakova pankreatitisa jer je riječ o enzimu velike molekularne mase koji se u zdravih osoba izlučuje mokraćom. (1–4)

Poremećaji hematopoetskog sustava. U 3. stadiju KBB tipična je normocitna normokromna anemija čiji je primarni uzrok smanjena sinteza eritropoetina. Preostali uzroci su smanjena reapsorpcija i gubitak željeza putem probavnog sustava, deficit folata i vitamina B12, uremički toksini koji djeluju toksično i skraćuju životni vijek eritrocita te sekundarni hiperparatireoidizam. U kasnoj fazi KBB česta je i hemoragijska dijateza zbog djelovanja uremičkih toksina koji dovode do disfunkcije i smanjenja broja trombocita. Očituje se produljenim vremenom krvarenja, povećanom sklonošću nastanka modrica na koži, pojačanim krvarenjem iz kirurških rana te spontanim krvarenjima u gastrointestinalnom sustavu. (1–4)

Poremećaji imunološkog sustava. Kod uremičnih bolesnika smanjen je nespecifični imunitet i oslabljena je stanična imunost. Humoralna imunost uglavnom je neoštećena. Povećana je učestalost tuberkuloze i infekcije herpes zoster virusom, a često je promijenjen i odgovor na infekciju virusom hepatitisa B, to jest, obično postoji perzistencija. Infekcije su drugi najčešći urok smrti bolesnika na dijalizi. (1–4)

Poremećaji endokrinog sustava. Dolazi do sekundarnog hiperparatireoidizma. Može se pojaviti i hipotireoza. Ovulacija je suprimirana i često nastaje amenoreja. Muški bolesnici obično imaju smanjen libido i hipospermiju. Moguća je hiperprolaktinemija i povišena razina luteinizirajućeg hormona u oba spola. (1–4)

Poremećaji neurološkog sustava. Progresijom KBB bivaju zahvaćeni središnji i periferni živčani sustav te mišići. Zahvaćenost središnjeg živčanog sustava očituje se umorom, nesanicom, uznemirenošću, depresijom i razdražljivošću. Rjeđe se razvija uremijska encefalopatija koja se očituje letargijom, konvulzijama i komom. Periferna neuropatija je senzornog i motoričkog karaktera, a prezentira se parestezijama udova, gubitkom dubokog osjeta i mišićnom slabošću koja je izraženija na proksimalnim mišićima, katkad i senzornim deficitom. Često je prisutan i sindrom nemirnih nogu. (1–4)

Poremećaji mišićno-koštanog sustava. Povećana sinteza PTH (sekundarni hiperparatireoidizam), manjak vitamina D, snižena koncentracija kalcija i metabolička acidoza dovode do bolesti kostiju koje se nazivaju bubrežna osteodistrofija. U takvom stanju postoji mogućnost pojave patoloških fraktura i metastatskih kalcifikacija. Posebni oblici koštanih manifestacija KKB su osteitis cystica fibrosa, adinamička koštana bolest i osteomalacija. Unatoč hipokalcijemiji tetanija se rijetko razvija u KBB. (1–4)

Koža. Koža je blijeda zbog anemije, a primjese žućkaste boje posljedica su taloženja pigmenta kromogena u koži zbog njegovog nedostatnog izlučivanja mokraćom. Karakterističan je pruritus koji može biti prilično jak, a uzrokovan je retiniranim produktima katabolizmna proteina, sekundarnim hiperparatireoidizmom i visokim produktom kalcijeva fosfata što uzrokuje odlaganje kalcijevih soli u koži. Često se vide hematomi i ekhimoze zbog poremećaja hemostaze. (1)

1.9. DIJAGNOSTIČKI POSTUPAK

Ciljevi različitih pretraga su:

- identifikacija uzroka pojave KBB, osobito ako je riječ o reverzibilnom faktoru,
- utvrđivanje stadija KBB i
- skrining komplikacija KBB poput anemije i renalne osteodistrofije. (4)

Za dijagnozu su važni **anamnestički podaci** o bolestima koje dovode do KBB, bubrežnim bolestima u obitelji i uzimanju nefrotoksičnih lijekova. **Fizikalni pregled** uključuje mjerenje krvnog tlaka, pregled kardiovaskularnog sustava, perkusiju i auskultaciju pluća, palpaciju bubrega, pregled promjena na koži te pregled ekstremiteta zbog edema. (1)

Laboratorijske pretrage. Potrebno je odrediti koncentraciju ureje i kreatinina, natrija, kalija, kalcija i fosfata te acidobazni status. Kompletna krvna slika i koagulogram rade se s ciljem identificiranja anemije i hemoragijske dijateze. Određuje se i koncentracija glukoze u krvi te lipidogram. U nalazu urina može biti prisutna hematurija ili proteinurija. Od testova za procjenu funkcije bubrega najvažniju ulogu ima klirens kreatinina. Za procjenu glomerularne filtracije Američka udruga nefrologa preporučuje Cocroft-Gaultove jednadžbe. (1,4)

Ultrazvučni pregled koristan je za određivanje veličine bubrega. Ako su bubrezi smanjeni, to govori za dugotrajnost bolesti. Iznimke su policistična bubrežna bolest, amiloidoza i dijabetička nefropatija u kojima bubrezi nisu smanjeni, a mogu biti čak i povećani. (1)

Biopsija bubrega indicirana je u malog broja bolesnika kada KBB nije još uznapredovala, a uzrok je nejasan. (1,2)

1.10. LIJEČENJE

Liječenje uzroka. Kad god je to moguće, terapijski postupak treba usmjeriti na suzbijanje uzroka KBB. Tu prvenstveno govorimo o kontroli glikemije u dijabetesu i kontroli krvnog tlaka u hipertoničara. Na taj način moguće je značajno usporiti progresiju bolesti. (3)

Promjena prehrane. U bolesnika s KBB postoje posebne preporuke što se tiče unosa proteina, soli, kalija i fosfata. Tablica prikazuje preporučene restrikcije unosa navedenih nutrijenata. (3,4) Preporučene dnevne vrijednosti unosa najvažnijih prehrambenih tvari prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Preporučene dnevne vrijednosti unosa ključnih nutrijenata u bolesnika s KBB. Prema Current Medical Diagnosis and Treatment (3)

nutrijent	preporučeni dnevni unos	napomena
proteini	0.6-0.8 g/kg	osim u slučaju kaheksije i snižene razine albumina
voda	do 2 L	u slučaju prekomjerne hidriranosti i edema
sol	1-2 g	
kalij	< 2 g	pri glomerularnoj filtraciji 10–20 mL/min/1.73 m^2 ili manjoj, ranije u slučaju pojave hiperkalijemije
fosfati	800-1 000 mg	

Promjena doziranja dotadašnje terapije. S obzirom na činjenicu da se mnogi lijekovi izlučuju putem bubrega, potrebna je korekcija u doziranju takvih lijekova. Lijekovi koji sadrže magnezij ili fosfate trebali bi se izbjegavati kao i lijekovi koji potencijalno mogu djelovati nefrotoksično (NSAID, aminoglikozidi). (3)

Medikamentna terapija. Koriste se antihipertenzivi i antidijabetici s ciljem kontrole rizičnih čimbenika. Statini se propisuju s ciljem regulacije dislipidemije. ACE inhibitori ili blokatori angiotenzinskih receptora mogu bitno smanjiti proteinuriju i usporiti tijek bolesti. Pored toga, smanjuju i rizik od neželjenih kardiovaskularnih komplikacija. (3, 4)

Bubrežna nadomjesna terapija. Kad glomerularna filtracija dosegne razinu 5-10 mL/min/1.73 m^2 renalna nadomjesna terapija postaje neophodna. Nadomještanje funkcije bubrega što je moguće učiniti pomoću hemodijalize, peritonealne dijalize ili transplantacijom bubrega. (1,3)

2. MIKRO RNA I NJIHOV KLINIČKI ZNAČAJ

MikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće jednolančane RNA molekule građene od 21-25 nukleotida koje reguliraju ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini. MiRNA se vežu na mRNA različitih gena što dovodi do njihove degradacije. Na taj način miRNA imaju važnu ulogu u brojnim biološkim procesima uključujući diferencijaciju, sazrijevanje, staničnu signalizaciju, apoptozu i mnoge druge. (13) MiRNA molekule postale su jedan od najvažnijih fokusa istraživanja u molekularnoj biologiji. Predviđa se da u ljudskom organizmu postoji barem tisuću miRNA. Funkcionalne studije upućuju na ulogu miRNA u regulaciji gotovo svakog staničnog procesa, a promjena u njihovoj ekspresiji dovodi do određenih patoloških stanja. Gotovo da je u potpunosti razjašnjena posttranskripcijska uloga miRNA u regulaciji translacije mRNA ili njezine stabilnosti, ali pretpostavlja se da postoje i brojne druge funkcije miRNA. (14,15) MiRNA čestice prvi put je otkrio Victor Ambros u C. elegans 1993. godine, a njihova uloga u svakodnevnoj kliničkoj praksi prvenstveno je istraživana u onkoloških bolesnika. (16)

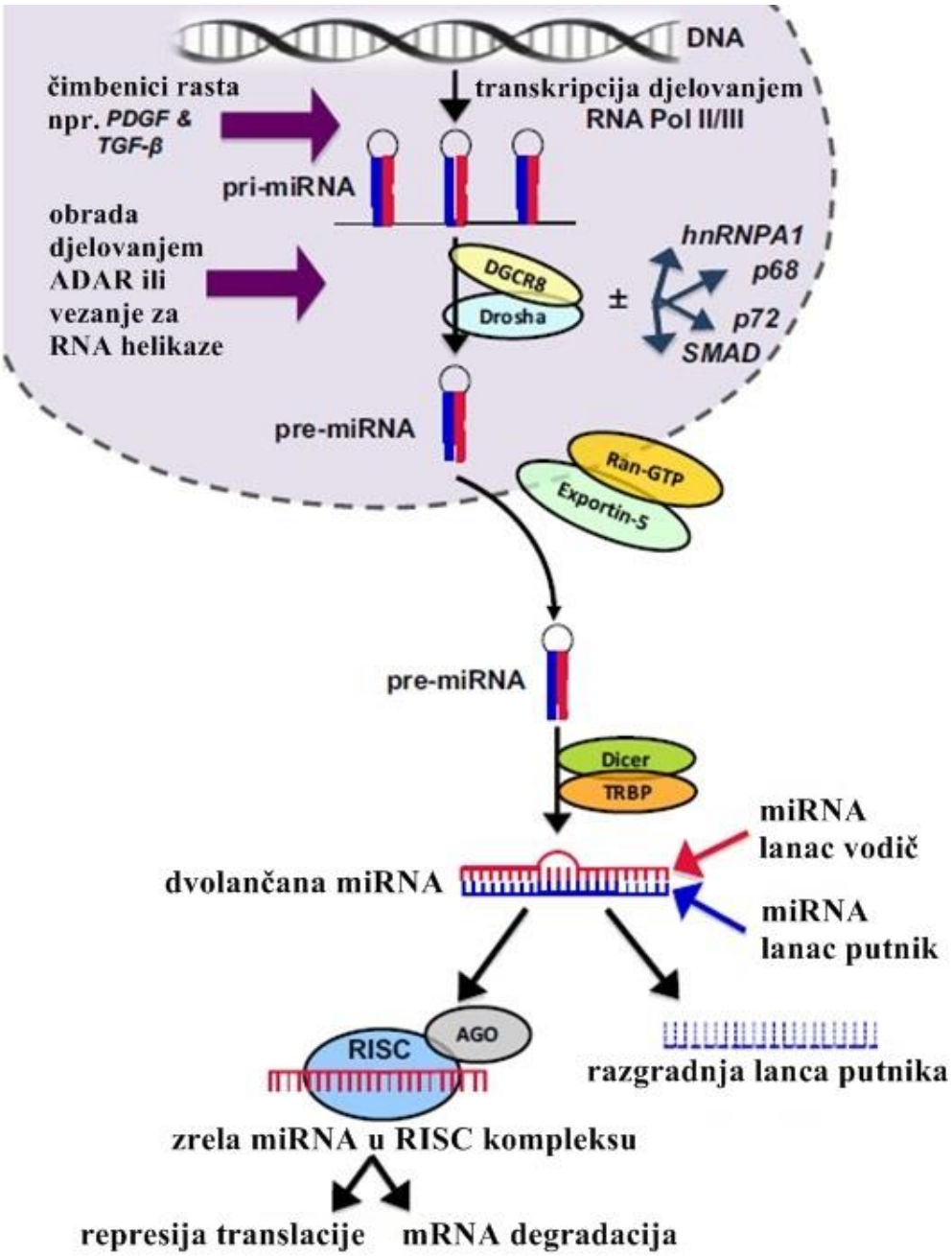
2.1. SINTEZA miRNA

Sinteza miRNA započinje transkripcijom primarne miRNA (**pri-miRNA**) uz djelovanje enzima RNA polimeraze II ili RNA polimeraze III. Ovaj korak reguliraju čimbenici rasta poput čimbenika rasta podrijetla iz trombocita (PDGF) ili transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF-β). Pri-miRNA su duge nekoliko tisuća nukleotida i sadrže *hairpin* strukture koje ih povezuju s nuklearnim mikroprocesorskim kompleksom. Ovaj kompleks se sastoji od dva proteina: *Drosha*, RNA nukleazi nalik protein i njezin kofaktor *Pasha* ili DGCR8 (engl. *DiGeorge critical region 8*). *Pasha* prepoznaje i ulazi u interakciju s pri-miRNA *hairpin* strukturama te služi kao vodič do mjesta cijepanja. *Drosha* tada cijepa pri-miRNA pri čemu nastaje sekundarni prekursor (pre-miRNA) dug oko 70 nukleotida. RNA helikaze p72 i p68 (DDX5) mogu biti dio većeg mikroprocesorskog kompleksa te u tom slučaju sudjeluju u regulaciji ovog procesa. Cijepanje pojedinih pri-miRNA također može biti regulirano specifičnim procesima. Tako, na primjer, cijepanje pri-miRNA-18a regulira i *RNA-binding protein* hnRNP A1 koji ulazi u interakciju s navedenim prekursorskim transkriptom i facilitira proces. TGF-β i BMP (engl. *bone morphogenic factor*) mogu potaknuti vezanje transkripcijskog faktora Smad (SMA od engl. small worm phenotype + MAD od engl. Mothers Against Decapentaplegic) za pri-miRNA-21 u kompleks s RNA helikazom p68 što pojačava proces cijepanja pri-miRNA-21. U nekim slučajevima primarni transkript miRNA može proći obradu uz pomoć ADAR (engl. *adenosin deaminase acting on RNA*) u kojoj dolazi do zamjene adenozina inozinom. Navedena promjena može utjecati na strukturalne karakteristike i komplementarno spajanje baza s ciljnim molekulama. Postoji i alternativni put sinteze pre-miRNA u kojem ona nastaje prekrajanjem (engl. *splicing*) iz introna nazvanih mirtroni potpuno nevezano uz *Drosha* mikroprocesorski kompleks. (14,15,17)

Pre-miRNA izlazi u citoplazmu uz pomoć kompleksa koji tvore eksportin 5 i Ran-GTP gdje se djelovanjem druge RNAze pod imenom *Dicer* cijepa do 21-25 nukleotida dugih dvolančanih miRNA. Ovaj proces ubrzavaju TRBP (engl. *TAR RNA binding protein*) i PACT (engl. *protein activator of PKR*). Dvolančana miRNA građena je od lanca vodiča koji sadrži sekvencu komplementarnu ciljnoj molekuli i lanca putnika koji će se razgraditi. U ovom procesu, osim *Dicera*, sudjeluju i različite vrste helikaza. (14,15,17)

Zrela miRNA se integrira u **RNA-inducirani utišavajući kompleks** (RISC, od engl. *RNA-induced silencing complex*) koji se tada naziva miRNA-inducirani utišavajući kompleks (miRISC) ili mikro-ribonukleoproteini (miRNP), a navedeni proces odvija se uz pomoć RLC (engl. *RISC loading complex*) koji se sastoji od *Dicera*, TRBP i PACT te Ago2. MiRISC vodi miRNA do njezina ciljnog mjesta na mRNA molekuli. Najvažnija i najbolje karakterizirana komponenta miRISC-a su proteini koji pripadaju obitelji *Argonaute* (Ago), a u sisavaca postoje četiri takva proteina koje označavamo s Ago1-Ago4. Dakle, u većini slučajeva miRNA i Ago zajednički tvore RISC. U tom kompleksu, uloga miRNA je komplementarno vezanje s ciljnim molekulama, a Ago destabilizira,

degradira ili inhibira translaciju ciljne nukleotidne sekvence. (14,15,17)



Slika 3. Biogeneza miRNA. Modificirano prema Khella i sur. (14)

2.2. MEHANIZMI INTERAKCIJE miRNA i mRNA

MiRNA dovode do represije translacije ili do destabilizacije mRNA bilo **tijekom procesa inicijacije** ili **u post-inicijacijskom procesu** (za vrijeme elongacije ili terminacije) translacije.

U biljnih vrsta spajanje komplementarnih parova baza miRNA i mRNA je savršeno što je rijetko slučaj u kralježnjaka. U većini slučajeva miRNA se s ciljnom mRNA veže nepotpuno. Vezno mjesto za miRNA nalazi se u 3' netranslacijskoj regiji mRNA. Iznimno se može nalaziti u 5' netranslacijskoj regiji ili u transkripcijskoj regiji. miRNA se mogu vezati samo za mjesto obilježeno 7 metil gvanozin trifosfatnom kapom (m^7GpppN kapom), ne i za mRNA s adenozin trifosfatnom kapom (ApppN kapom) ili mjesto koje sadrži IRES (engl. *internal ribosomal entry site*). Nakon vezanja, Ago protein RISC kompleksa interferira bilo sa

samom m^7GpppN kapom bilo s eIF4E-eIF4G (engl. *eukaryotic translation initation factor*). Navedena interakcija tada ometa eukariotske translacijske inicijacijske faktore da aktiviraju 40S ili 80S inicijacijski kompleks, odnosno sprječava vezanje mRNA za navedene ribosomske podjedinice. (15)

Mehanizmi represije na post-inicijacijskoj razini slabije su razjašnjeni. Ipak, studije na C. elegans su pokazale da lin-14 i lin-28 mRNA na koju se veže lin-4 miRNA ostaje vezana za poliribosome, ali uz značajnu redukciju sinteze proteina. Slične rezultate pokazale su i studije na sisavcima. Smatra se da u IRES posredovanoj translaciji miRNA dovode do modifikacije nizvodnog okvira čitanja što uzrokuje prijevremenu terminaciju translacije. (15)

Navedeni inicijacijski i post-inicijacijski mehanizmi represije translacije mRNA nisu međusobno isključivi, to jest, moguće je da se odvijaju istovremeno. (15,17)

2.3. NOMENKLATURA miRNA

Prefiksi mir i miR koriste se za prekursore i zrele miRNA molekule. Prefiks od 3 ili 4 slova koristi se da bi se označila pripadnost miRNA određenoj vrsti, npr. hsa (engl. hsa od Homo sapiens) prefiks označava da je riječ o humanoj miRNA. Identične miRNA koje potječu iz istog genskog lokusa imaju isti numerički sufiks, a razlikuju se po dodatnom slovu koje im se dodjeljuje, npr. miR-10a i miR-10b. (14)

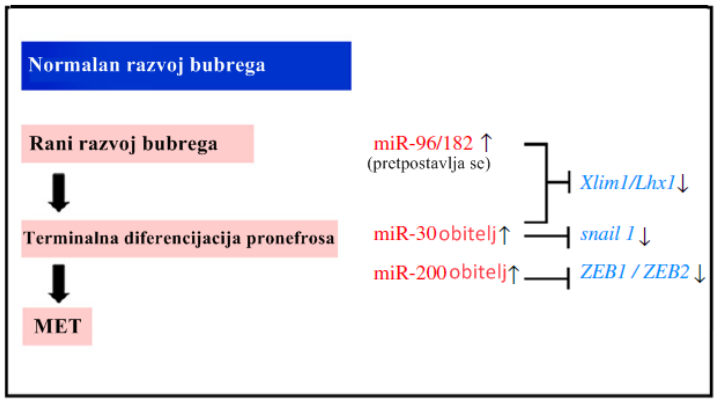
3. MIKRO RNA I BUBREG

3.1. ULOGA MIKRO RNA U RAZVOJU I FIZIOLOGIJI BUBREGA

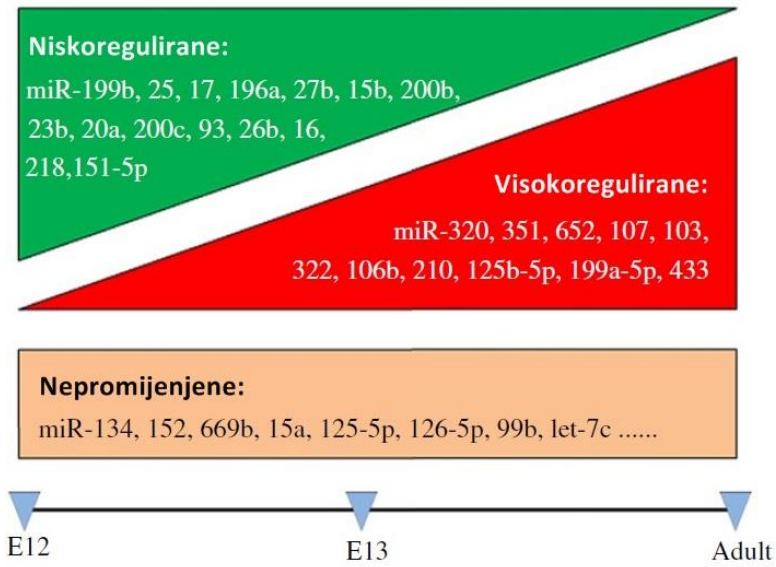
Mokraćni sustav razvija se skupa sa spolnim sustavom iz zajedničkog parnog mezodermalnog tračka (intermedijarni mezoderm) smještenog duž stražnje stijenke trbušne šupljine. Tijekom embrionalnog razvoja nastaju tri različite generacije bubrega koje se vremenski djelomično prekrivaju: **pronephros** (predbubreg), **mesonephros** (prabubreg) i **metanephros** (definitivni bubreg). Pronephros i mesonephros su privremeni stadiji i tijekom razvoja definitivnog bubrega isčezavaju. Metanefros se pojavljuje u petom tjednu embrionalnog razvoja. Njegovi sekretorni kanalići razvijaju se iz **metanefrogenog mezoderma**, a odvodni kanalići iz **mokraćovodnog pupoljka** koji izrasta iz donjeg dijela Wolffova kanala blizu njegova ušća u kloaku. Mokraćovodni pupoljak prodire u metanefrogeno tkivo koje poput kape prekriva njegov distalni kraj. Nakon toga se distalni kraj pupoljka proširi i čini primitivnu bubrežnu nakapnicu (pelvis renalis), a zatim se podijeli u velike bubrežne vrčeve (calyces renales majores) i kasnije u male bubrežne vrčeve (calyces renales minores). Prema tome od mokraćovodnog pupoljka nastaju mokraćovod, nakapnica, veliki i mali bubrežni vrčevi te sabirne cjevčice bubrega. Oko distalnog kraja svakog novonastalog odvodnog kanalića zgusne se metanefrogeno tkivo. To se zgusnuće naziva kapa metanefrogenog tkiva. Pod indukcijskim utjecajem kanalića stanice u kapi oblikuju se u male bubrežne mjehuriće koji se izdužuju tvoreći male kanaliće u obliku slova S. Slobodni kraj svakog kanalića obuhvati klupko kapilara (glomerul). Kanalić s glomerulom čini osnovu za nefron. Proksimalni kraj svakog nefrona čini Bowmanova čahura u koju se duboko utiskuje glomerul. Distalni se kraj spoji s jednim od odvodnih kanalića te se tako uspostavi put od Bowmanove čahure do sustava odvodnih kanala bubrega. Izduživanjem i savijanjem sekretnog kanalića oblikuju se proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja i distalni zavijeni kanalić. Nefroni se stvaraju do rođenja i tada ih je u svakom bubregu prisutno otprilike jedan milijun. (18,19)

Kompleksnost čitavog procesa upućuje na činjenicu da su u nefrogenezu uključeni brojni regulatorni geni i signalni putovi. (20)

Eksperimenti na miševima pokazali su da se ekspresija pojedinih miRNA razlikuje u različitim fazama razvoja bubrega. Primjerice, ekspresija **miR-30** povišena je tijekom razvoja bubrega, a manje je značajna u zrelom bubregu. **MiR-200** je povišena u pronefrosu, a pokazalo se da ima važnu ulogu u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji. Raznovrsnost ekspresije tijekom pojedinih stadija razvoja bubrega prikazana je na slikama 4 i 5. (14)



Slika 4. MiRNA uključene u razvoj normalnog bubrega. Slika predstavlja sažeti prikaz uloge miRNA u pojedinim stadijima razvoja bubrega u žabe. Oznake: MET = mezenhimalno-epitelna tranzicija. Modificirano prema Liming Ma i sur. (20)



Slika 5. MiRNA uključene u razvoj normalnog bubrega. Slika prikazuje različito eksprimirane miRNA u pojedinim fazama razvoja bubrega u miševa. Najizraženije eksprimirana miRNA bila je miR-199b. Međutim, razine miR-199b opadaju tijekom razvoja i minimalne su u tkivu zrelog bubrega. Isto je uočeno za miR-17, miR-25, miR-196a i ostale navedene na slici. Za razliku od toga miR-106b i miR-652 su jače eksprimirane u zrelom bubregu nego u pojedinim razvojnim stadijima. Oznake: E12 = 12. dan embrionalnog razvoja, E13 = 13. dan embrionalnog razvoja. Modificirano prema Liming Ma i sur. (20)

Eksperimenti na knockdown životinjama pokazali su da se zbog nedostatka pojedinih miRNA pojavljuju različiti razvojni problemi bubrega. U jednoj od studija u kojoj je učinjena delecija *Dicer* gena u bubrežnim progenitornim stanicama došlo je do njihove apoptoze, usporavanja diferencijacije pronefiričkog duktusa te do terminacije nefrogeneze. (14, 24)

Odstranjenje *Dicera* iz mokraćovodnog pupoljka dovelo je do neadekvatne proliferacije i apoptoze što je rezultiralo poremećajem u grananju mokraćovodnog pupoljka i razvojem bubrežnih cisti. Ukidanje *Dicera* u kasnijoj fazi razvoja bubrega također je dovelo do razvoja bubrežnih cista, vjerojatno mehanizmom koji je povezan s *Pkd1* genom. (21)

Specifični knockout *Dicera* u podocitima doveo je do disrupcije glomerularne filtracijske barijere što je uzrokovalo proteinuriju, strukturalne glomerularne defekte i glomerulosklerozu. Ekscesivna glomerularna i tubularna ozljeda rezultirala je smrću pokusnih životinja za 6 tjedana. Navedeni pokus bio je dokaz da je miRNA neophodna u homeostazi podocita. (21–23)

Miševi sa sniženom ekspresijom miR-17~92 klastera razvili su bubrežnu hipoplaziju, disfunkciju glomerularnog razvoja i proteinuriju. (21)

MiRNA visokospecifične za bubreg su: **miR-19a**, **miR-19b**, **miR-31**, **miR-146a**, **miR-192**, **miR-194**, **miR-204**, **miR-215**, **miR-216**, **miR-886**. Pored toga, ekspresija pojedinih miRNA se razlikuje u pojedinim dijelovima bubrega, prvenstveno korteksu i meduli što je sasvim logično s obzirom na činjenicu da različite regije bubrega obavljaju različite funkcije. Npr. miR-192 izraženije je eksprimirana u korteksu nego u meduli što je konzistentno s njezinom ulogom u transportu natrija. (14,20,24,21)

Pojedine miRNA nisu specifične za bubreg te su pojačano eksprimirane i u drugim organima. To su **miR-10a**, **miR-10b**, **miR-21**, **miR-30**, **miR-196a**, **miR-196b**, **miR-451 i miR-let 7a**. (19,20)

3.2. MIKRO RNA I BUBREŽNA FIBROZA

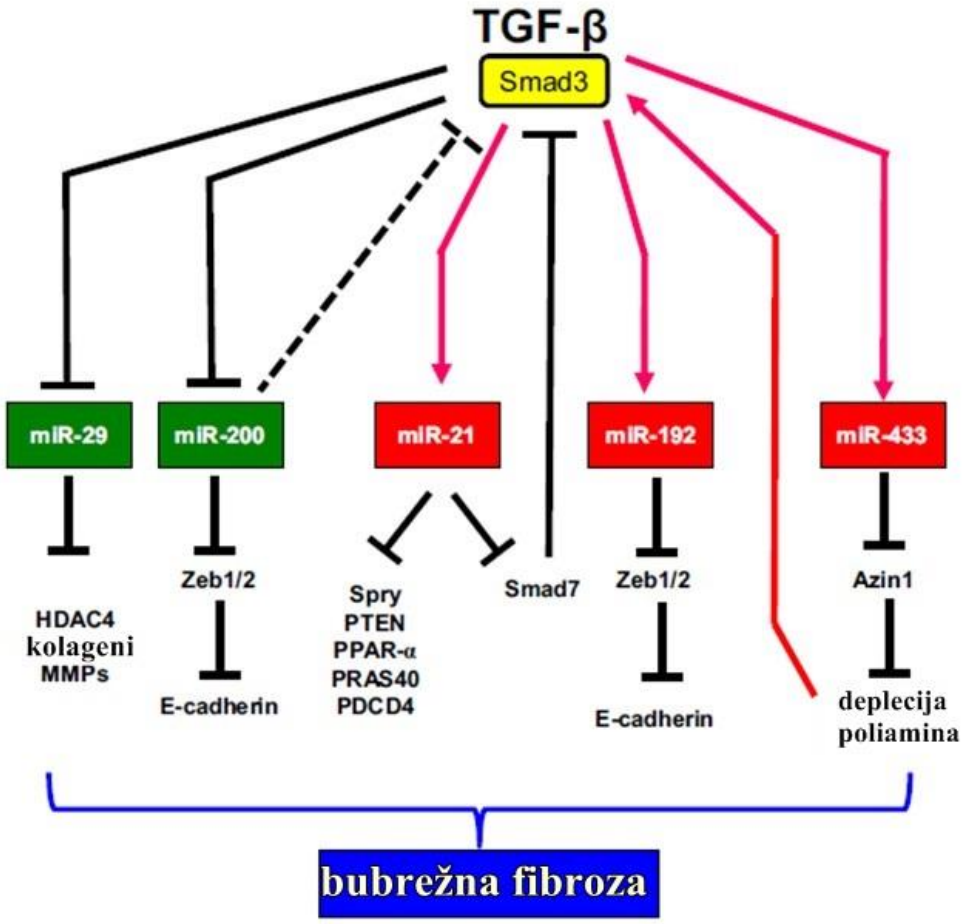
Bubrežna fibroza je značajna karakteristika gotovo svih kroničnih bubrežnih bolesti, a dovodi do terminalnog bubrežnog zatajenja. Karakterizirana je ili odlaganjem proteina u intersticijski ekstracelularni matriks ili akumulacijom miofibroblasta i destrukcijom

bubrežnih tubula. **Transformirajući čimbenik rasta (TGF-β)** je poznati citokin koji sudjeluje u navedenom procesu bubrežne fibroze. **Smad2** i **Smad3** djeluju kao posrednici TGF- β djelovanja. (13,25,26)

Tijekom fibroze TGF-β je sposobna inducirati brojne gene odgovorne za fibrozu poput proteina ektracelularnog matriksa ili mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK). Nedavne studije pokazale su da TGF-β također regulira pojedine miRNA tijekom bubrežne fibroze. TGF-β1 inducira miR-21, miR-192, miR-491-5p, miR-382, miR-377, miR-214 i miR-433, a suprimira miR-29 i miR-200. Sve navedene miRNA sudjeluju u procesu bubrežne fibroze. Nadalje, ekspresija većine navedenih miRNA promijenjena je u pojedinim bubrežnim bolestima. (13,25,26)

TGF-β signalizacija pojačava preradu primarnih transkripta pojedinih miRNA u njihove aktivne forme. Smad3 dolazi u interakciju s *Drosha* kompleksom i stimulira produkciju zrelih miRNA. Smad3 također dolazi u interakciju sa SBE (engl. *smad-binding site*) koji se nalazi u promotorskoj regiji i regulira ekspresiju navedenih miRNA molekula. Dakle TGF-β i Smad3 promoviraju ili transkripciju ili postranskripcijsku obradu miRNA. (13,25)

Važno je napomenuti da postoji povratna sprega između miRNA i TGF-β/Smad3 signalizacijskog puta. TGF-β inducira miR-21 ekspresiju, a miR-21 suprimira Smad7 što pojačava TGF-β signalizaciju. S druge strane, miR-29 i miR-200a suprimiraju TGF-β signalizacijski put. (13,25)



Slika 6. Uloga TGF-β u razvoju bubrežne fibroze te njihova povezanost s miRNA. Detaljnije opisano u tekstu. Modificirano prema Chung i sur. (25)

3.2.1 ULOGA POJEDINIH miRNA U BUBRŽNOJ FIBROZI

MiR-29. Pokazalo se da miR-29 inhibira odlaganje proteina ekstracelularnog matriksa, osobito kolagena i fibronektina. Molekule iz porodice miR-29 imaju ciljna mjesta na Adam12 i Adam19 disintegrinskim metaloproteinazama te ih u normalnim okolnostima suprimiraju. Prilikom razvoja bubrežne fibroze, razine miR-29 su snižene što dovodi do dezinhibicije navedenih metaloproteinaza. Također dokazano je da navedena miRNA molekula štiti od dijabetičke podocitopatije tako što suprimira HDAC4 (engl. *Histone Deacetylase 4*) signalizaciju, ubikvitaciju i urinarnu ekskreciju nefrina. (16,27)

MiR-200. Sudjeluje u inhibiciji ZEB1 i ZEB2 (engl. *Zinc finger E-box-binding homeobox*), transkripcijskih faktora E-kadherina koji imaju važnu ulogu u održavanju epitelne diferencijacije. ZEB1 je značajan u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji (EMT) što je prvi put otkriveno u stanicama karcinoma dojke, a potom i kod karcinoma pankreasa i kolorektalnog karcinoma. EMT je proces u kojem epitelne stanice gube polarnost i dobivaju mezenhimalna svojstva poput sposobnosti migracije. MiR-200 je važna u održavanju epitelnog integriteta i inhibiciji epitelno-mezenhimalne transformacije putem direktne inhibicije mezenhimalnih transkripcijskih faktora ZEB1 i ZEB2 te TGF-β. Bubrežni tubularni epitel ne prolazi proces epitelno-mezenhimalne transformacije u miševa koji imaju isključenu funkciju gena *Dicer* (*Dicer* knockout miševa), ali može proći parcijalnu epitelno-mezenhimalnu transformaciju pri čemu stanice istovremeno pokazuju značajke i epitela i mezenhima. Navedeni proces parcijalne epitelno-mezenhimalne transformacije ima važnu ulogu u bubrežnoj fibrozi. Dakle, miR-200 održavaju tubularnu homeostazu tako što sprječavaju stanice da uđu u proces parcijalne epitelno-mezenhimalne transformacije. Također postoji i povratna sprega pa ZEB1 inhibira ekspresiju miR-200. (28–30)

MiR-21. Dosad je najviše signalnih, metaboličkih i inflamatornih putova koji potencijalno imaju ulogu u razvoju bubrežne fibroze otkriveno upravo za miR-21. Istraživanja na knockout miševima pokazala su da navedena miRNA nije toliko značajna u homeostazi zdravih bubrega, ali ima izrazito velik značaj u razvoju bubrežne fibroze. Pozitivno regulira ekspresiju proteina ekstracelularnog matriksa i α-SMA (engl. *Alpha-smooth muscle actin*) u tubularnim epitelnim stanicama i mezangijskim stanicama. MiR-21 suprimira PPAR-α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor-alpha*) koji u normalnim okolnostima regulira oksidaciju masnih kiselina i lipida te na taj način smanjuje produkciju ekstracelularnog matriksa, broj miofibroblasta i tubulointersticijsku fibrozu. Inhibira Mpv17-nalik protein koji u zdravom bubregu inhibira slobodne radikale kisika i na taj način štiti od oksidativnog stresa i posljedične fibroze. Aktivira put P42/P44 MAP kinaze (mitogenom-aktivirane proteinske kinaze). Supresija MMP (matriks metaloproteinaze) inhibitora Reck od strane miR-21 dovodi pojačane aktivnosti MMP, osobito MMP-2 koja ima važnu ulogu u aktivaciji stanica, degradaciji membrana i disfunkcionalnoj angiogenezi. Važna uloga navedene miRNA je i supresija ekspresije gena za protein PTEN (engl. *Phosphatase and tensin homolog*). Uobičajeno PTEN djeluje na PI3K (fosfoinozitin-3-kinaza) i na taj način sprječava fibrozu. Taj put povezan je i s istovremenom inhibicijom Smad7 i povratnom spregom. Naime, PTEN i Smad7 djeluju kao inhibitori Smad3 i čitavog TGF-β signalizacijskog puta. Porastom količine miR-21 dolazi do supresije navedenog inhibitornog učinka. Dakle, djelovanjem miR-21 povratnom spregom na proces posredovan TGF-β dolazi do njegove amplifikacije i izraženije fibroze. Dokazana je i negativna korelacija između miR-21 i PDCD4 (engl. *proinflammatory programmed cell death 4*) u tubularnim epitelnim stanicama. Jedan od mehanizama djelovanja je i stimulacija ERK/MAPK (ekstracelularnim signalom regulirane kinaze/mitogenom aktivirana protein kinaza). Navedeni put ima značajnu ulogu u srčanoj patologiji, no smatra se da ima, zasada još nedovoljno istraženi značaj u bubrežnoj patologiji. Jedan od nedavno otkrivenih mehanizama djelovanja miR-21 jest inhibicija DDAH1 (dimetilarginin dimetlaminohidrolaza 1) koji je u uobičajenim

okolnostima odgovoran za razgradnju ADMA (asimetrični dimetilarginin), endogenog inhibitora sintetaze dušičnog oksida. Djelovanjem miR-21 dolazi do akumulacije ADMA i bubrežne fibroze. MiR-21 ima značajnu ulogu i u inflamatornim i imunološkim procesima. Naime, navedena molekula inhibira lipopolisaharidom-induciranu NF-κB aktivaciju IL-6 i IL-10. Pored toga djeluje i na TLR7 i TLR8 (Toll-like receptori) i time stimulira upalni proces. (31–33)

MiR-192 suprimira ZEB1 i ZEB2, sudjeluje u akumulaciji kolagena u tubularnim epitelnim stanicama. (25)

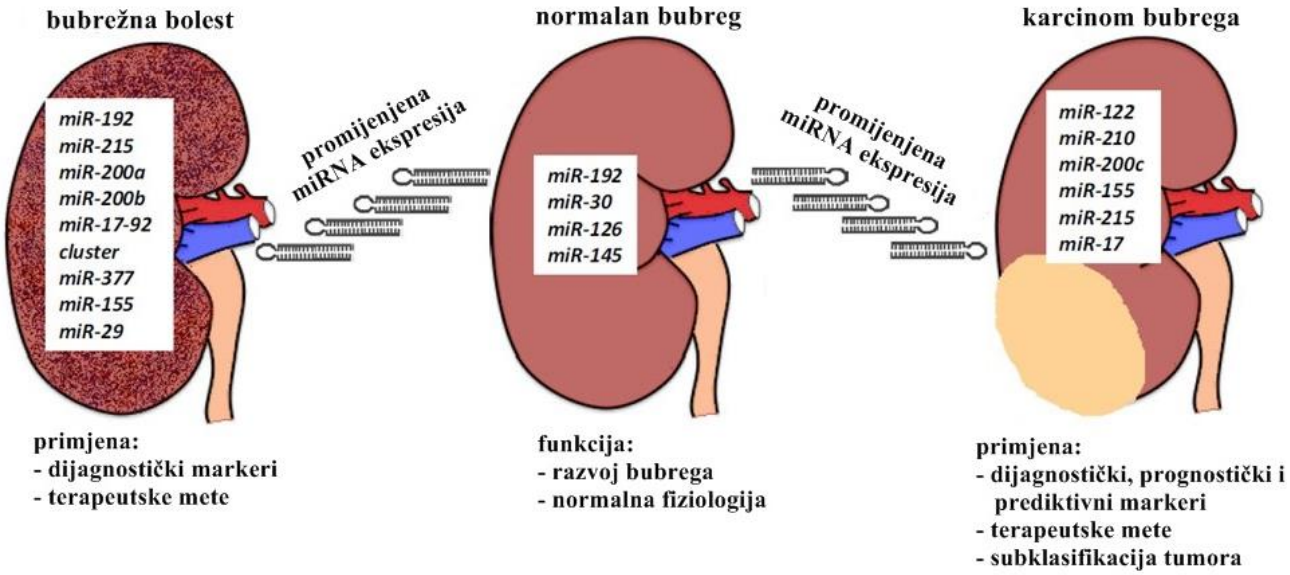
MiR-433 potiče TGF-β1 induciranu akumulaciju kolagena u tubularnim epitelnim stanicama. Djeluje na Azin 1 (engl. *Antizyme inhibitor 1*), protein koji djeluje protektivno na bubrežnu fibrozu. Supresija proteina važnih za proces fibroze u tubularnim epitelnim stanicama. (25)

3.3. KLINIČKI ZNAČAJ MIKRO RNA

Postoji širok spektar potencijalni kliničkih primjena miRNA molekula. MiRNA predstavljaju inovativne krvne biomarkere koji bi bili neinvazivni, pouzdani, visokoosjetljivi, visokospecifični, a služili bi za postavljanje dijagnoze i procjenu prognozne različitih patofizioloških procesa. U neoplastičnim i drugim bubrežnim bolestima, pokazalo se da miRNA može imati utjecaj na personalizirani pristup svakom pacijentu. Također potencijalna uloga miRNA je i u distinkciji pojedinih podtipova bolesti. Područje interesa je također prognostički značaj miRNA u pojedinim bubrežnim bolestima. MiRNA se pokazala kao koristan alat u predviđanju ishoda molekularne terapije te u odabiru adekvatne terapije za pojedine bolesnike na temelju molekularnih obilježja. MiRNA može biti korisna i u farmakogenomici, to jest u adaptaciji doze pojedinog lijeka na temelju metaboličkog statusa bolesnika. O brojnim terapijskim mogućnostima miRNA molekula bit će riječ u sljedećem ulomku. Potencijalna klinička primjena miRNA u bubregu (ali i drugim organima) prikazana je u tablici 5 i na slici 7. (13,14,24)

Tablica 5. Potencijalne mogućnosti primjene miRNA u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Modificirano prema Khella i sur. (14)

dijagnoza bolesti	prognostički marker	prediktivni marker	terapijska uloga
rana detekcija karcinoma rana detekcija glomerularnih bolesti i nefropatija subklasifikacija karcinoma potvrda karcinoma	(predviđanje prirodnog toka i ishoda bolesti kao i njezine težine i agresivnosti)	(predviđanje efikasnosti liječenja, posebice molekularne ciljne terapije)	povećanje nedostatno eksprimirane miRNA smanjenje prekomjerno eksprimirane miRNA modifikacija razine miRNA i sprječavanje progresije bolesti odabir bolesnika koji bi bili idealni kandidati za klinička istraživanja

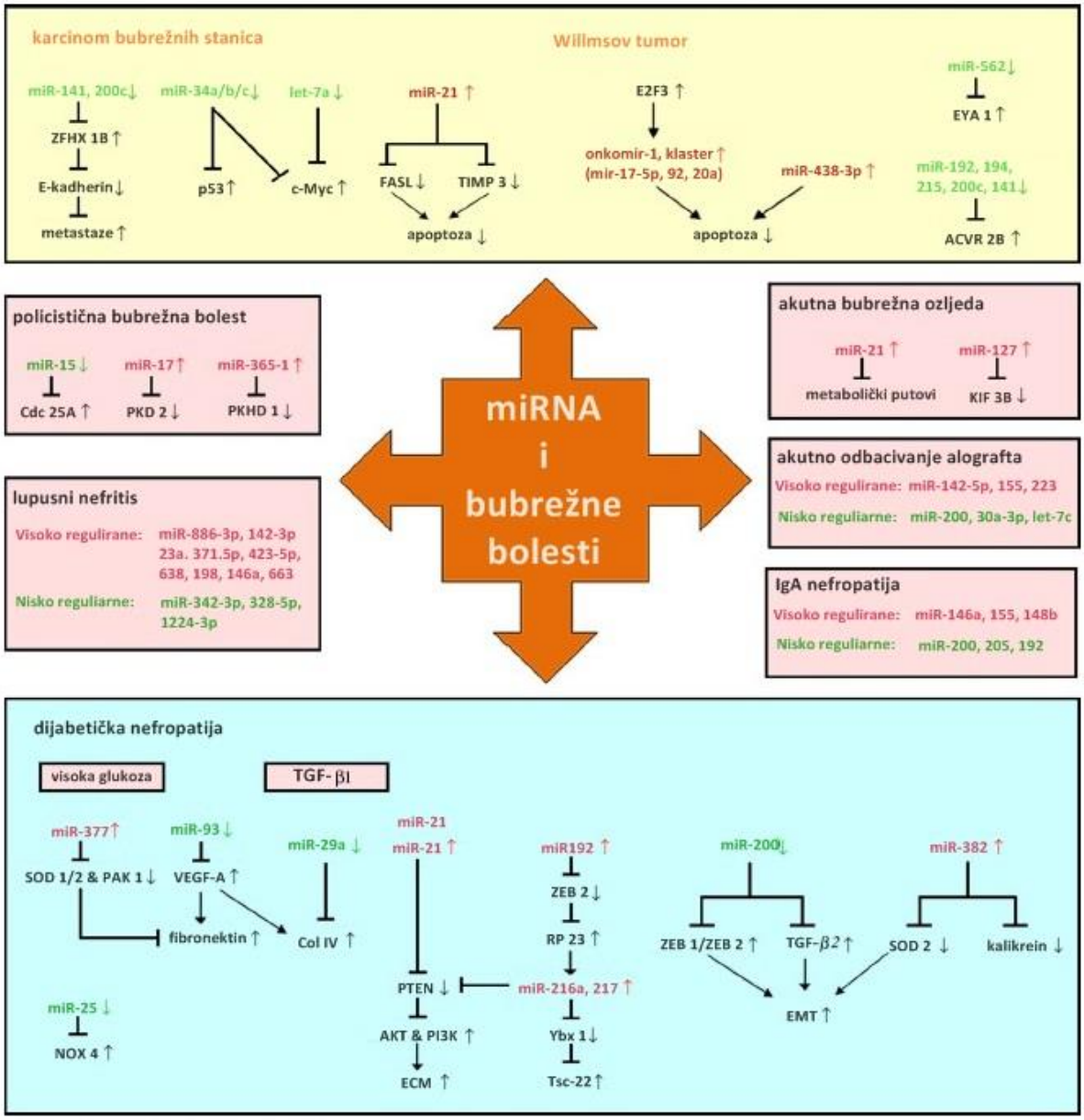


Slika 7. Slika prikazuje varijabilnost miRNA u fiziološkom bubregu, ali i u pojedinim bolestima. MiRNA imaju važnu ulogu u razvoju bubrega i njihovoj fiziološkoj funkciji. Ekspresija pojedinih miRNA je različita u različitim fazama razvoja bubrega. Isto tako, ekspresija miRNA se razlikuje u različitim regijama bubrega pa tako pojedine miRNA molekule imaju ulogu u glomerularnoj filtraciji ili sekreciji renina. Promjena u ekspresiji miRNA molekula može dovesti do bubrežnih bolesti kao što su dijabetička nefropatija, hipertenzivni glomerulonefritis ili neoplazma. Potencijalna klinička uloga miRNA je u dijagnostici ili terapiji. Modificirano prema Khella i sur (14).

Iako je u većini studija korišteno tkivo dobiveno **bubrežnom biopsijom**, kao potencijalni uzorci mogu poslužiti i **serum** i **urin**. U serumu miRNA cirkuliraju u stabilnoj formi, otporne na djelovanje RNAze. Prednost uporabe seruma i urina kao izvora biomarkera jest mogućnost njihova prikupljanja neinvazivnim metodama. (24)

3.4. MIKRO RNA KAO POTENCIJALNI BIOMARKER

MiRNA imaju ulogu u patogenezi i progresiji brojnih bolesti pa tako i bubrežnih. Njihov značaj u pojedinim bolesnima sažeto je prikazan na slici 8, a bit će razrađen za pojedine, značajnije bolesti kasnije u tekstu. (20)



Slika 8. Uloga pojedinih miRNA u patogenetskim i metaboličkim putovima razvoja različitih bubrežnih stanja.

Oznake: TGF-β = transformirajući čimbenik rasta beta, SOD 1/2 = superoksid dismutaza, PAK 1 = P21/Cdc42/Rac1 aktivirana kinaza 1, VEGF A = vaskularni endotelni čimbenik rasta A. Col IV = kolagen tipa 4, NOX 4 = NADPH oksidaza 4, PTEN = fosfatazni i tenzinski homolog, AKT = Akt kinaza, PI3K = fosfoinozitid kinaza 3, ECM = ekstracelularni matriks. ZEB1/2 = engl. *zinc finger E-box-binding homebox* 1/2, RP 23 = RP23-298H6.1-001, Ybx 1 = engl. *Y box binding protein* 1, Tsc-22 = TGF-β-stimulirani klon 22, EMT = epitelno-mezenhimalna tranzicija, CDC 25A = engl. *cell division cycle 25 homolog A*, PKD 2 = policistična bubrežna bolest 2, PKHD1 = engl. *polycystic kidney and hepatic disease gene 1*, KIF 3B = engl. *kinesinfamily member 3B*, IgA = imunoglobulin A, ZFHX 1B = engl. *zinc finger E-box-binding homeobox2* (ZEB 2) i *Smad-interacting protein 1* (SIP 1), FASL = fas ligand, TIMP 3 = inhibitor metaloproteinaze 3, E2F3, E2F transkripcijski faktor 3, EYA 1 = engl. *eyes absent homolog 1*, ACVR 2B = akitivnski receptor tipa 2B. Modificirano prema Liming Ma i sur. (20)

Brigant i suradnici istraživali su ulogu **miR-126**, **miR-143**, **miR-145**, **miR-155 i miR-223** kao potencijalnih biomarkera u cirkulaciji bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću s ciljem utvrđivanja dijagnoze i predviđanja prognoze. MiR-143, miR-145 i miR-223 bili su povišeni u bolesnika s KBB u usporedbi sa zdravim kontrolama. Razina navedenih miRNA molekula bila je dodatno povišena u bolesnika na hemodijalizi, a snižena u bolesnika s

transplantiranim bubregom. Razine miR-126 i miR-155 također su bile povišene u bolesnika s KBB, ali snižene u bolesnika na hemodijalizi te još značajnije snižene u bolesnika s transplantiranim bubregom. miRNA-126 je specifična za endotel, miR-143 i miRNA-145 specifične su za glatko mišićje krvnih žila, a miRNA-223 je biomarker upalnih procesa. U studiji su za usporedbu korištena tri uremijska toksina – indoksil sulfat (IS), indol-3-acetična kiselina (IAA) i p-krezil sulfat (PCS). Razine ovih toksina obično su povišene u bolesnika s KBB, značajnije povišene u bolesnika na hemodijalizi, a snižene u bolesnika s transplantiranim bubregom. miR-126 i miR-143 pokazale su pozitivnu korelaciju s PCS i IS. IAA nije bila u korelaciji niti s jednom miRNA, a miR-145 i miR-223 nisu bile u korelaciji s uremijskim toksinima. miR-126, miR-145 i miR-223 pokazale su pozitivnu korelaciju s glomerularnom filtracijom, miR-143 bila je u negativnoj korelaciji, a miRNA-155 nije bila u korelaciji s glomerularnom filtracijom. Na temelju navedenog miRNA molekule bile su podijeljene u dvije skupine: (i) **miRNA koje su povišene u bolesnika s KBB stadij III-V i u bolesnika na hemodijalizi, a snižene u bolesnika s transplantiranim bubregom**: miR-143, miR-145 i miR-223; (ii) **miRNA koje su povišene u bolesnika s KBB stadij III-V, a snižene u bolesnika na hemodijalizi i bolesnika s transplantiranim bubregom**: miR-126 i miR-155. Rezultati navedenog istraživanja sažeto su prikazani u tablici 6. (34)

Tablica 6. Tablica prikazuje ekspresiju 5 miRNA u tri karakteristične skupine bolesnika, KBB stadiji III-V, pacijenti na hemodijalizi i transplantirani pacijenti u usporedbi sa zdravim kontrolama. Oznake: ↔ uredna razina, ↑ povišena razina, ↓ snižena razina navedene miRNA. Prema Brigant i sur. (34)

	KBB stadij III-V	**pacijenti na hemodijalizi**	**transplantirani pacijenti**
miR-126	↔	↓	↓
miR-143	↑	↑	↓
miR-145	↑	↑	↓
miR-155	↑	↓	↓
miR-223	↑	↑	↓

Szeto i suradnici istraživali su nalaz miRNA molekula u sedimentu urina bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću. U urinu miRNA mogu biti kvantificirane u sedimentu, ali i u supernatantu koji preostane nakon centrifugiranja. Istraživanje je provedeno na 56 bolesnika s KBB, većinom s dijabetičkom nefropatijom, hipertenzivnom nefrosklerozom i IgA nefropatijom. U bolesnika s dijabetičkom nefropatijom pronađena je niska razina **miR-15** u urinu, u bolesnika s hipertenzivnom nefrosklerozom utvrđena je povišena razina **miR-21** i **miR-216a**, a bolesnici s IgA nefropatijom imali su povišenu razinu **miR-17**. Ekspresija miR-15, miR-192 i miR-216a pokazala je negativnu korelaciju s proteinurijom, temeljna bubrežna funkcija bila je u korelaciji s miR-15, miR-17 i miR-192, stupanj tubulointersticijske fibroze bio je u pozitivnoj korelaciji s miRNA-377, a u negativnoj korelaciji s miR-217. MiR-216a pokazala je pozitivnu korelaciju s glomerularnom filtracijom u bolesnika s hipertenzivnom nefrosklerozom i dijabetičkom glomerulosklerozom, ali ne i u bolesnika s IgA nefropatijom. (35)

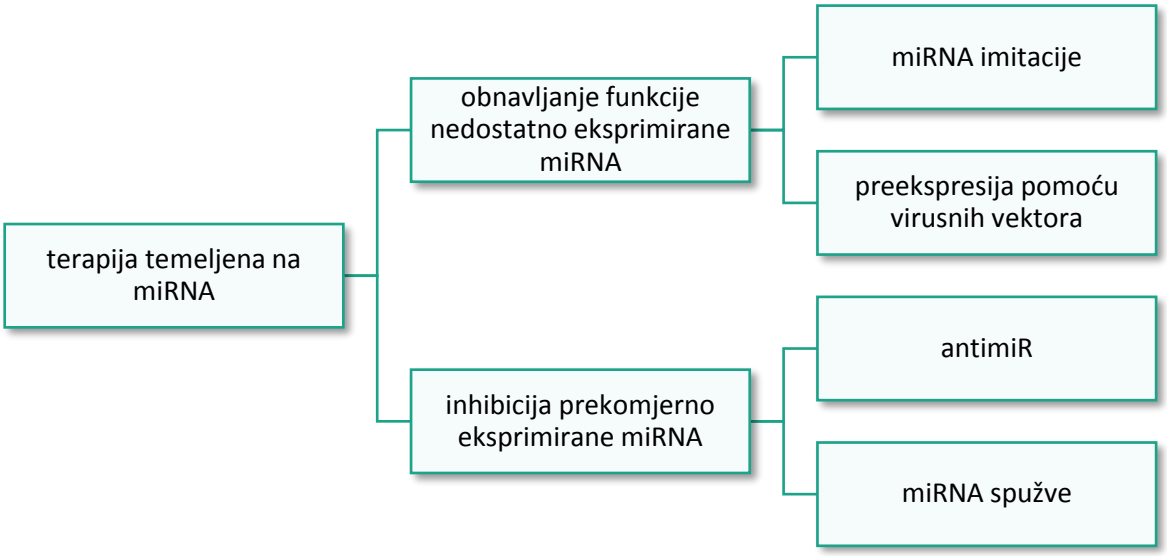
3.5. TERAPIJSKA ULOGA MIKRO RNA

Posebne karakteristike miRNA te njihova uloga u patogenezi bolesti upućuju na to da bi navedene molekule mogle imati značajnu ulogu u terapiji mnogih bolesti. (36,37) Terapeutski potencijal miRNA istraživan je u brojnim bolestima poput ishemije miokarda, raznovrsnih jetrenih bolesti, fibroza u brojnim tkivima, uključujući i bubreg, inflamatornih stanja poput reumatoidnog artritisa te malignih bolesti. (38)

Tri osnovna pitanja na koja se traži odgovor kada se govori o potencijalnoj terapeutskoj ulozi miRNA su: (a) Je li modulacija miRNA ispravan pristup u liječenju pojedinih bolesti u

ljudi? (b) Može li terapijski pristup baziran na miRNA biti dizajniran tako da ga bolesnici mogu dobro podnositi bez puno neželjenih nuspojava? (c) Mogu li miRNA lijekovi biti osmišljeni tako da u ciljna tkiva dolaze u onoj količini koja će osigurati njihovo efikasno djelovanje? (38)

Ovisno o tome kakva je ekspresija miRNA u određenoj bolesti, u terapijskom smislu moglo bi se djelovati ili obnavljanjem funkcije nedostatno eksprimirane miRNA ili inhibicijom prekomjerno eksprimirane miRNA. (36,39) Terapijske mogućnosti miRNA sažeto su prikazane na slici 9.



Slika 9. Terapijske mogućnosti miRNA. Detaljnije objašnjeno u tekstu.

Obnavljanje funkcije nedostatno eksprimirane miRNA može se izvršiti na dva načina, pomoću miRNA imitacija (engl. *miRNA mimics*) ili preekspresijom pomoću virusnih vektora. MiRNA imitacije su dvolančane molekule koje poput endogene miRNA sadrže dva lanca od kojih jedan služi kao lanac vodič, a drugi kao lanac putnik. Lanac vodič sadrži genetski kod identičan onome koji sadrži ciljna miRNA molekula. Podložan je djelovanju egzonukleaza i stoga treba biti modificiran, najčešće pomoću 2'-fluoro modifikacije. Lanac putnik se veže za različite molekule, npr. kolesterol što olakšava unos čitave miRNA imitacije u pojedine stanice. Lažna miRNA se tada veže u RISC kompleks i na taj način nastaje miRISC koji djeluje poput onog sintetiziranog uz endogenu miRNA. (36,39,40)

Potencijalni nedostaci miRNA imitacija su vezanje za TLR što izaziva interferonski odgovor, a sistemska primjena miRNA imitacija može uzrokovati njezin ulazak u ostala tkiva, ona koja uobičajeno ne eksprimiraju takvu miRNA funkciju. Izazov je i postizanje odgovarajuće koncentracije miRNA imitacije koja služi kao obnova nedostatnih količina endogene miRNA, a neće uzrokovati prekomjernu aktivaciju nepotrebnih metaboličkih putova. (40)

Inhibicija prekomjerno eksprimirane miRNA može se izvršiti pomoću miRNA spužve ili pomoću jednolančanih antisense oligonukleotida nazvanih antimiR. MiRNA spužve koriste transgenetsku prekomjerno eksprimiranu RNA koja sadrži konzervativna komplementarna vezna mjesta s tandemskim ponavljanjima za ciljne miRNA molekule koje želimo blokirati. Ipak, antimiRi su pokazali bolju terapeutsku perspektivu u studijama. Za razliku od miRNA imitacija antimiRi su jednolančane molekule komplementarne ciljnoj miRNA molekuli. AntimiR oligonukleotidi trebaju biti kemijski modificirani da bi pokazali bolji afinitet vezanja, biostabilnost i farmakokinetička svojstva. Dolaskom u stanicu antimiRi se vežu

na ciljnu miRNA i inhibiraju njezinu funkciju. Posebna skupina antimiRa koji su 3'-kolesterol konjugirani i 2'-O-metil-modificirani nazivaju se antagomiri, a to su ujedno i prvi pokušaji u inhibiciji funkcije miRNA. (36,40)

AntimiRi posjeduju određena obilježja koja ih čine idealnim terapeutskim sredstvom u kroničnim bolestima bubrega: (i) antimiRi najefikasnije blokiraju miRNA u jetri i bubrezima, (ii) bolesnici ih mogu samostalno aplicirati (slično inzulinu), (iii) sigurni su, bez puno popratnih nuspojava, (iv) imaju dugo vrijeme djelovanja (do 4 tjedna) zbog čega se mogu aplicirati jednom svakih nekoliko tjedana. Osnovni nedostatak antimiRa je njihova ograničena distribucija u oštećene, cistične i fibrozom promijenjene bubrege. (37)

Postoji nekoliko načina na koji lijekovi temeljeni na miRNA mogu biti dostavljeni u ciljne organe. Prvi način je priprema navedenih lijekova u fiziološkoj otopini i **parenteralna primjena** (intravenski ili supkutano). Na ovaj način mogu se primijeniti samo jednolančani antimiR lijekovi, ne i dvolančane miRNA imitacije. Potencijalno ograničenje ovakvog načina primjene jest nedostatna akumulacija lijeka u ciljnim organima, a smatra se da nastane kao posljedica patoloških procesa u samom bubregu, tj. zdrav bubreg bi bio u stanju dostatno akumulirati lijek, ali ne i bolestan. (38) Drugi način je **konjugacija s ligandom** koji se veže na specifične receptore na pojedinim ciljnim stanicama. (38) Ovaj način primjene pokazao se učinkovitim u liječenju hepatitisa C pri čemu se galaktozaminokonjugirana miR-122 (miravirsen) veže za asijaloglikoproteinske receptore na hepatocitima što dovodi do inhibicije intrinzične miR-122 i posljedičnog pada razine HCV u modelima glodavaca. (44, 45) Treći način je **formulacija miRNA u terapeutske nanočestice** (najčešće lipidne). Iako ovakav način primjene pojačava potentnost miRNA čestica, također postoji opasnost od smanjene podnošljivosti i sigurnosti zbog indukcije citokina i imunosnog odgovora. (38)

Kada govorimo o terapeutskom potencijalu miRNA u bubregu, dosad je najbolje proučen onaj vezan za **miR-21**. Miševi s reduciranom količinom miR-21 razvijaju intersticijsku fibrozu sporije i u manjoj mjeri u usporedbi s divljim tipom miševa te se na tome temelje terapeutski potencijali antimiR-21. Najviše proučavan model je onaj s miševima u kojih je izazvana null mutacija α3 lanca kolegena tipa 4 (*Col4α3-/-*). Navedeni miševi razviju Alportov sindrom s KBB i potpunim zatajenjem bubrega do 11. tjedna. U tom modelu s ciljem usporavanja razvoja i progresije bolesti apliciran je antimiR-21 supkutano. Navedeni lijek postigao je najvišu koncentraciju u proksimalnim tubulima, ali je bio prisutan i u drugim tubularnim stanicama, endotelnim stanicama, fibroblastima i leukocitima. Rezultat je bio poboljšanje bubrežne funkcije, usporavanje progresije fibroze, smanjenje albuminurije i sekrecije uremijskih toksina te povećanje medijana preživljenja miševa. Potencijalni mehanizam navedenih promjena je derepresija ranije spomenutog PPARα metaboličkog puta koji je suprimiran pod djelovanjem prekomjernih količina miR-21. (38,43)

Terapijski uspjeh u blokiranju miR-21 u Alportovom sindromu ukazuje na mogućnost primjene navedenog antimiR-21 i u KBB druge etiologije. S obzirom na činjenicu da su miRNA poprilično konzervirane, to jest nisu se značajno evolucijski mijenjale, moguća je vrlo brza primjena navedenih antimiRa i u ljudi. AntimiR-21 je trenutno u fazi 1 kliničkih studija kao lijek za Alportov sindrom. (36,38,43)

4. MIKRO RNA U POJEDINIM BUBREŽNIM BOLESTIMA

4.1. LUPUSNI NEFRITIS

LN jedna je od najčešćih i najtežih manifestacija SLE. Zahvaćenost bubrega u SLE predstavlja značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta. Bubrežna biopsija predstavlja zlatni standard u dijagnosticiranju i klasifikaciji histoloških tipova LN. Ipak, riječ je o invazivnoj pretrazi, a serije biopsija s ciljem monitoringa progresije i terapijskog uspjeha izrazito su nepraktične. Postojeći laboratorijski markeri poput proteinurije, omjera proteina i kreatinina, klirensa kreatinina, anti-dsDNA i razina komponenata komplementa nezadovoljavajući su zbog nedostatka osjetljivosti i specifičnosti. Zbog toga se pojavila potreba za pronalaskom novih biomarkera koji bi mogli precizno prikazati prisutnost, aktivnost i težinu bubrežne bolesti u SLE te omogućiti praćenje i odgovor na terapijske procese. Nekoliko studija prikazalo je miRNA kao potencijalne biomarkere zahvaćenosti bubrega u SLE. (44–46)

Trenutna imunosupresivna terapija koju koristimo u liječenju i usporavanju progresije LN je efektivna i popravlja ishod bolesti, ali ima brojne nuspojave poput infekcija, metaboličkih disbalansa, neoplazmi i neplodnosti. Potencijalni doprinos miRNA u razotkrivanju patogeneze i mehanizama oštećenja bubrega u SLE mogao bi pomoći u razvoju specifičnije, manje toksične terapije. Pored toga, postojeća terapija mogla bi biti efektivnije primijenjena kada bismo mogli preciznije predvidjeti razvoj LN te odrediti njegov stadij i progresiju. (45,47,48)

Cirkulirajuće miRNA koje mogu biti vrlo jednostavno detektirane mogu poslužiti kao potencijalni biomarkeri LN.

Quiroz i suradnici povezali su 89 varijacija u serumskim miRNA molekulama u pacijenata s LN u odnosu na zdrave kontrole i pacijente koji boluju od SLE bez zahvaćenosti bubrega. Od toga je 5 pokazalo značajnu varijabilnost te bi, prema tome, mogli poslužiti kao biomarkeri LN. To su miR-221-5p, miR-380-3p, miR-380-3p, miR-556-5p i miR-758-3p. Razine ovih 5 miRNA u serumu bile su uvećane u pacijenata s LN u usporedbi sa zdravima i onima koji boluju od SLE bez zahvaćenosti bubrega, dok je miR-3074-3p bila uvećana samo u skupini pacijenata koji boluju od SLE bez zahvaćenosti bubrega, ne i u preostale dvije skupine. Ove miRNA su uspješno poslužile u distinkciji između LN, SLE bez zahvaćenosti bubrega i zdravih ispitanika, imale su visoku osjetljivost (97%), specifičnost (70.3%), pozitivnu prediktivnu vrijednost (82.5%) i negativnu prediktivnu vrijednost (96%). Ipak, navedene miRNA molekule nisu poslužile kao zamjena patohistološkoj klasifikaciji LN na pojedine stadije. (44)

Wang i suradnici proučavali su razine miRNA u serumu, ali i u urinu. Pokazali su da su serumske razine miR-192, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-205 i miR-429 snižene u bolesnika s LN u usporedbi sa zdravim kontrolama. Većina navedenih miRNA je u pozitivnoj korelaciji s bubrežnom funkcijom, a miR-200a i miR-429 pozitivno korelira s proteinurijom i DAI (engl. *disease activity index*). U urinu su dokazane snižene količine miR-141, miR-192, miR-200a, miR-200c i miR-429. U drugoj studiji istih autora proučavane su razine miR-146 i miR-155 u serumu i urinu. Pokazalo se da su razine navedenih miRNA bile snižene u serumu, a povišene u urinu. Razina miR-155 bila je u korelaciji s DAI i proteinurijom, razina miR-146a bila je u pozitivnoj korelaciji s glomerularnom filtracijom, a u negativnoj korelaciji s urinarnom ekspresijom TNF-α. MiR-146 je negativni regulator IFN-1 metaboličkog puta što ima važnu ulogu u patogenezi SLE i LN. (49, 52–56)

Nije se pokazala značajna povezanost između razina dosad nabrojanih miRNA u urinu i različitih kliničkih parametara, međutim Wang i suradnici su u drugoj studiji pokazali da su urinarne količine miR-221 i miR-222 bile u obrnutoj korelaciji sa serumskim anti-dsDNA i u pozitivnoj korelaciji s C3 komponentom komplementa. Uz miR-339-3p i miR-339-5p, miR-221 i miR-222 su jedni od najvažnijih regulatora ekspresije ICAM-1 gena (engl. *Intercellular adhesion molecule-1*). ICAM-1 je citokinima induciran površinski glikoprotein koji je značajno eksprimiran na površini

endotelnih stanica i stanica imunosnog sustava. Pokazalo se da navedeni glikoprotein igra važnu ulogu u razvoju imunoposredovanih bubrežnih bolesti, uključujući i LN. Potencijalni patogenetski mehanizam je poticanje adhezije leukocita za bubrežni parenhim. Zasad je potencijalna uloga količine pojedinih miRNA u urinu nedovoljno razjašnjena te su potrebna daljnja istraživanja. (45,46,54)

Jeannie L. Te i suradnici su pomoću microarray analize izolirali pojedine miRNA u **EBV transformiranim B stanicama** i **smrznutim mononuklearnim stanicama iz periferne krvi** (PBMC) dobivenim od pacijenata s LN i zdravih kontrola. Studija je provedena na Amerikancima europskog i afričkog podrijetla, dakle uključivala je ispitanike različitih rasa. Identificirano je 5 miRNA koje su bile različito eksprimirane u navedene dvije etničke populacije. To su miR-371-5p, miR-423-5p, miR-638, miR-663 i miR-1224-3p. Od toga su miR-371-5p, miR-423-5p i miR-1224-3p prvi put izolirane kao poveznica s lupusnim nefritisom i stoga izdvojene kao potencijalni biomarkeri navedene bolesti. Preostale dvije miRNA molekule već su prethodno bile izolirane. Studija je također pokazala da postoji 6 miRNA koje su bile različito eksprimirane ovisno o tome je li bila riječ o uzorku EBV transformiranih B stanica ili PBMC. To su sljedeće: miR-27b, miR-342-3p, miR-371-5p, miR-423-5p, miR-638 i miR-663. Samo miR-181 je bila različito eksprimirana u EBV transformiranim stanicama dobivenim od Amerikanaca afričkog i europskog podrijetla. (48)

Dai i suradnici su također proučavali ekspresiju miRNA u PBMC kod pacijenata sa SLE te su identificirali 16 miRNA čija je ekspresija bila promijenjena u usporedbi s kontrolama. Dai i suradnici su, u drugoj studiji, izolirali i analizirali miRNA iz uzoraka dobivenih **bubrežnom biopsijom**. Identificirano je 66 miRNA od kojih je 30 bilo nedovoljno, a 36 prekomjerno eksprimirano. Najintenzivnije je proučavana miR-223 za koju se pokazalo da je LN specifična. U bolesnika s bubrežnom manifestacijom SLE navedena miRNA je smanjeno regulirana. (47,55)

Krasoudaki i suradnici provodili su istraživanja na humanim tkivima dobivenim biopsijom te na životinjskim modelima. Od 365 miRNA čiji profil je izrađen, pokazalo se da u patogenezi LN sudjeluju 24 miRNA molekule. Od toga je 9 bilo prekomjerno, a 15 smanjeno regulirano. Navedena disregulacija bila je prisutna u LN tipovima III, IV i V. MiRNA čija je ekspresija bila poremećena, mogle bi igrati važnu ulogu u patogenezi LN, prvenstveno u metaboličkim putevima poput upalnog/citokinskog signalnog puta, membranskom transportu i homeostazi stanica. Posebno su istraživali ulogu miR-422a u LN. Pokazali su da je navedena miRNA prekomjerno eksprimirana u LN i da je povezana sa smanjenom regulacijom metaboličkog puta temeljenog na kalikrein povezanoj peptidazi 4, to jest gen za KLK4 je jedan od najvažnijih ciljnih gena miR-422a. Posljedično razina KLK4 bila je snižena. KLK4 je serinska proteaza koja ima važnu ulogu u upalnim procesima, oksidativnom stresu, koagulaciji i vaskularnoj endotelnoj funkciji. Djeluje na način da iz kininogena aktivira kinine, peptide koji aktiviraju kininske receptore. Navedeni miR-422a-KLK4 metabolički put je izdvojen zbog potencijalnog terapijskog djelovanja. (56)

Navedene varijabilnosti u ekspresiji pojedinih miRNA u SLE i LN koje su pokazale različite studije mogu se pripisati činjenici da svaki pojedini fenotip SLE, kao i različiti stadiji progresije bolesti mogu eksprimirati različite skupine miRNA. Stoga su potrebna daljnja istraživanja da bi se utvrdili najbolji biomarkeri za navedenu bolest.

4.2. IgA NEFROPATIJA

IgA nefropatija najčešći je uzrok primarnog glomerulonefritisa u svijetu. 30% oboljelih razvije progresivni oblik bolesti koji rezultira glomerularnom i intersticijskom fibrozom koje dovode do terminalnog zatajenja bubrega i potrebe za nadomjesnim liječenjem. Trenutno se dijagnostički postupak i stratifikacija rizika zasnivaju na biopsiji bubrega, a terapijske opcije su limitirane. Zbog toga se javila potreba za pronalaskom novih, manje invazivnih, ali istovremeno dovoljno

osjetljivih i specifičnih biomarkera te inovativnog terapijskog pristupa. (57)

Trenutni patogenetski model razvoja IgA nefropatije zasniva se na porastu nedostatno O-galaktozirane IgA1 forme u serumu. Takva IgA sklonija je taloženju u bubrežnom tkivu. Početni korak u navedenom procesu galaktoziranja jest vezanje N-acetilgalaktozamina za treoninske ili serinske ostatke na IgA što je posredovano enzimom N-acetilgalaktozamintransferazom 2 (GALNT2). Nakon toga slijedi O-galaktozacija uz pomoć β1,3-galaktoziltransferaze (C1GALT1). Smatra se da su navedena dva enzima, odnosno njihovi geni, ciljna mjesta djelovanja miRNA te da na taj način miRNA sudjeluju u patogenezi IgA nefropatije. (57–60)

Kada govorimo o miRNA kao potencijalnim biomarkerima u IgA nefropatiji, moramo imati u vidu njihovu različitu ekspresiju u krvi, urinu i bubrežnom tkivu.

Dai i suradnici pronašli su sniženu razinu 31 miRNA i povišenu razinu 34 miRNA molekula u uzorcima dobivenim **bubrežnom biopsijom**. (61)

Tan i suradnici identificirali su 84 miRNA koje su bile različito eksprimirane u bubrežnom tkivu. (62)

Wang G. i suradnici su u nekoliko odvojenih studija proučavali ekspresiju pojedinih miRNA u bubrežnom tkivu bolesnika s IgA nefropatijom. Razine miR-141, miR-192 i miR-205 u bubrežnom tkivu bile su povišene, a razina miR-200c bila je snižena u bolesnika s IgA nefropatijom u usporedbi s nefrektomiranim kontrolama. Količine miR-141, miR-192, miR-200a, miR-200b, miR-205 i miR-429 bile su znatno više u bolesnika oboljelih od IgA nefropatije, nego u bolesnika s neinflamatornim glomerulopatijama. U drugoj studiji Wang i suradnici dokazali su povišene razine miR-146 i miR-155 u bubrežnom tkivu i urinu bolesnika s IgA nefropatijom naspram zdravih kontrola. (63,64)

Wang N. i suradnici koristili su microarray analize da bi utvrdili razine miRNA u **sedimentu urina** u bolesnika s IgA nefropatijom i kontrola koje su bolovale od membranske nefropatije i bolesti minimalnih glomerularnih promjena, ali i zdravih kontrola. Također su proučavali ekspresiju miRNA u različitim stadijima nefropatije (prema Leejevom sustavu stupnjevanja). Dokazali su da su 4 miRNA disregulirane u stadiju I/II. MiR-223-3p i miR-629-5p bile su povišene, a miR-3613-3p i miR-4668-5p bile su snižene. 6 miRNA je bilo disregulirano u stadiju III, odnosno tri (miR-150-5p, miR-371b-5p i miR-572) su bile povišene, a tri (miR-3613-3p, miR-4668-5p i miR-6750-5p) su bile snižene. Niti jedna od istraživanih miRNA nije bila disregulirana u stadiju IV/V. Ti nalazi upućuju na to da u različitim stadijima IgA nefropatije postoji različit profil miRNA, odnosno da je ekspresija miRNA varijabilna i da ovisi od stadiju i ozbiljnosti bolesti. Posebno su proučavane miR-3613-3p i miR-4668-5p koje su bile snižene u stadijima I-III. Navedene miRNA bile su u korelaciji s glomerularnom filtracijom i Leejevim stadijem bolesti, odnosno govorile su o ozbiljnosti bolesti. Smatra se da bi te dvije miRNA mogle imati ulogu kao biomarkeri IgA nefropatije. (65)

Wang G. i suradnici uočili su sniženu razinu urinarnih miR-200a, miR-200b i miR-429, ali ne i miR-141, miR-192, miR-200c i miR-205 kod bolesnika koji boluju od IgA nefropatije. U drugoj studiji pronađene su povišene razine miR-146 i miR-155 u urinu. Postoji još jedna studija istih autora koja pokazuje da su u sedimentu urina bolesnika s IgA nefropatijom količine miR-29b bile smanjenje, a količine miR-29c i miR-93 povećane u usporedbi s kontrolama. (66,67)

Duan i suradnici pronašli su 112 miRNA koje su bile različito eksprimirane u urinarnom sedimentu bolesnika s IgA nefropatijom. Posebno su istaknute miR-25-3p, miR-144-3p i miR-486-5p čija razina je bila povišena i miR-135-3p, miR-150-3p i miR-638 kojih je u urinu bilo manje u usporedbi sa zdravim kontrolama. Zanimljivo je bilo to da su navedene tri povišene miRNA imale povišenu ekspresiju samo u urinarnom sedimentu koji je sadržavao eritrocite, ne i u urinu bez eritrocita. Bile su u pozitivnoj korelaciji s glomerularnom filtracijom pa bi mogle poslužiti kao biomarkeri prognoze bolesti. (68)

O razini miRNA u **PBMC** govori samo jedna studija. Identificirano je 37 miRNA koje su bile različito eksprimirane u PBMC pacijenata s IgA nefropatijom u usporedbi sa zdravim kontrolama. Najviše je proučavana miR-148b koja djeluje na gene za enzime koji sudjeluju u galaktozaciji IgA. Navedena miRNA pokazuje negativnu korelaciju s C1GALT1. Sama miR-148b je prekomjerno eksprimirana te djeluje supresivno na spomenuti enzim. Pored toga dokazano je da izrazito povišena miR-148b dolazi u direktnu povezanost s razinama galaktoza-deficijentne IgA1. Zbog svega nevedenog konkretna bi miRNA molekula mogla poslužiti kao farmakološka meta u liječenju IgA nefropatije. (60)

Hu i suradnici te Bao i suradnici utvrdili su da razina ekspresije miR-223 i miR-374 u **B-limfocitima** i **cikulirajućim endotelnim stanicama** koreliraju s histološkom slikom IgA nefropatije. Stoga bi navedene miRNA mogle poslužiti kao adekvatni biomarkeri u distinkciji između bolesnika s IgA nefropatijom i zdravih kontrola. (69,70)

Pojedine miRNA izolirane u prethodno navedenim studijama povezane su s kliničkim i patohistološkim pokazateljima bubrežne funkcije koji se trenutno koriste u klničkoj praksi. Navedeno je prikazano u tablici 7.

Tablica 7. Povezanost pojedinih miRNA s različitim kliničkim i patohistološkim markerima IgA nefropatije. Modificirano prema Selvaskandan i sur. (57)

tkivo iz kojeg je izolirana	miRNA	povezanost s kliničkim ili patohistološkim parametrom
tkivo bubrega	miR-21	povezanost s intersticijskom/glomerularnom fibrozom
	miR-141	obrnuta korelacija s vimentinom
	miR-146a	negativna korelacija s glomerularnom filtracijom pozitivna korelacija s proteinurijom
	miR-155	negativna korelacija s glomerularnom filtracijom pozitivna korelacija s proteinurijom povezanost s tubularnom intersticijskom fibrozom
	miR-192	povezanost s intersticijskom/glomerularnom fibrozom
	miR-200c	pozitivna korelacija s proteinurijom korelacija s E-kadherinom
	miR-205	pozitivna korelacija s proteinurijom povezanost s tubularnom intersticijskom fibrozom
sediment urina	miR-15	pozitivna korelacija s glomerularnom filtracijom negativna korelacija s proteinurijom
	miR-17	pozitivna korelacija s glomerularnom filtracijom
	miR-21	pozitivna korelacija s glomerularnom filtracijom
	miR-29b	pozitivna korelacija s glomerularnom filtracijom pozitivna korelacija s proteinurijom
	miR-29c	pozitivna korelacija s proteinurijom
	miR-93	povezanost s intersticijskom/glomerularnom fibrozom
	miR-146a	pozitivna korelacija s proteinurijom povezanost s urinarnim IL-1β, IL-6 i TNF-α
	miR-155	pozitivna korelacija s proteinurijom pozitivna korelacija s proteinurijom povezanost s urinarnim IL-1β i TNF-α
	miR-192	pozitivna korelacija s glomerularnom filtracijom negativna korelacija s proteinurijom
	miR-200a	pozitivna korelacija s proteinurijom
	miR-200b	pozitivna korelacija s proteinurijom
	miR-216a	pozitivna korelacija s glomerularnom filtracijom negativna korelacija s proteinurijom
	miR-217	pozitivna korelacija s glomerularnom filtracijom negativna povezanost s tubularnom intersticijskom fibrozom
	miR-377	povezanost s tubularnom intersticijskom fibrozom
	miR-429	pozitivna korelacija s glomerularnom filtracijom pozitivna korelacija s proteinurijom negativna povezanost s intersticijskom/glomerularnom fibrozom
B limfociti	miR-374b	pozitivna korelacija s proteinurijom
glomerularne endotelne stanice	miR-233	pozitivna korelacija s proteinurijom

Iako dosada opisani podaci predstavljaju prvi korak u razvoju neinvazivnih dijagnostičkih testova za IgA nefropatiju, još uvijek nisu dostatno istraženi i validirani. Potrebna su istraživanja na većim uzorcima i raznovrsnijim tehnikama prije nego miRNA uđu u svakodnevnu kliničku praksu.

4.3. POLICISTIČNA BUBREŽNA BOLEST

MiRNA su važne u razvoju brojnih organa pa tako i bubrega. Kao što je ranije navedeno razvoj bubrega obuhvaća interakcije između dviju važnih struktura, metanefrogenog mezenhima i mokraćovodnog pupoljka. (37)

Patogeneza nekih oblika polisitičnih bolesti bubrega može se objasniti abnormalnim razvojem bubrega. Pokazalo se da miRNA imaju ulogu u razvoju bubrega, a njihov nedostatak ili inhibicija mogu dovesti do prestanka grananja mokraćovodnog pupoljka ili diferencijacije metanefrogenog mezoderma što može rezultirati bubrežnom agenezom ili displazijom bubrega. Inhibicija miRNA u kasnijim fazama razvoja bubrega rezultirat će formiranjem brojnih tubularnih i glomerularnih cista. (37)
Dokazi dobiveni na studijama na glodavcima i uzorcima dobivenim od pacijenata s različitim oblicima policistične bolesti bubrega ukazuju na ulogu pojedinih miRNA u patogenezi policističnih bolesti bubrega. (37)

MiR-17. Ova obitelj sastoji se od tri klastera locirana na kromosomima 13, 17 i X. Klaster miR-17~92 lociran na kromosomu 13 visoko je eksprimiran u embrionalnim stanicama brojnih organa uključujući i bubreg. Mikrodelecija na kromosomu 13q koja zahvaća navedenu miRNA skupinu dovodi do Feingold sindroma obilježenog cijelim spektrom razvojnih poremećaja od kojih su najznačajniji dismorfija, mentalna retardacija, skeletne i gastrointestinalne malformacije, a moguće su bubrežne i srčane malformacije. (71) Pored toga, klaster miR-17~92 ima dokazanu onkogenu aktivnost te je visokoreguliran u brojim humanim malignim bolestima, uključujući karcinom bubrega, prostate, dojke, kolona, želuca i gušterače te B-stanični limfom. Za razvoj karcinoma osobito je važna povezanost s *c-myc* onkogenom pri čemu je miR-17~92 neophodna za inhibiciju apoptoze *c-myc* pozitivnih stanica, a *c-myc* djeluje kao izravni aktivator transkripcije miR-17~92. Najznačajniji onkogeni potencijal pokazale su miR-19a i miR-19b. (72) Prekomjerna ekspresija miR-17~92 klastera u bubregu dovodi do formiranja cista. Jedan od mehanizama kako miR-17~92 potiče rast cista je promocija proliferacije epitelnih stanica koje oblažu ciste. U miševa s prekomjerno eksprimiranim miR-17~92 ciste su se razvijale na isti način kao i u *Pkd1* knockout miševa, ali je brzina rasta bila različita. Navedeno upućuje da je miR-17~92 važnija u rastu nego u inicijaciji cista što znači da postoje drugi mehanizmi ključni u iniciranju razvoja cista. (73) Na miševima je dokazano da prekomjerna ekspresija miR-17~92 klastera dovodi do blokiranja ekspresije gena važnih u razvoju različitih policističnih bolesti bubrega, prvenstveno *Pkd1, Pkd2, Pkhd1 i Hnf-1β*, tako da se veže za specifično vezno mjesto i modificira njihovu posttranslacijsku modifikaciju. *Pkhd1* ne sadrži vezno mjesto za miR-17~92, ali u promotoru postoji vezno mjesto za *Hnf-1β* gen koji u normalnim okolnostima direktno stimulira aktivnost *Pkhd1* gena. U situaciji prekomjerne ekspresije miR-17~92 ovaj signalni put je suprimiran. Za represiju *Pkd1* i *Pkd2* najvažnija je miR-17, a za represiju *Hnf-1β* ključna je miR-25 . Na mišjim modelima pokazalo se da miR-17~92 doista je visoko eksprimiran u policističnim bubrežnim bolestima što ponovno može biti posljedica djelovanja *c-myc* onkogena. Delecija navedenog klastera u miševa dovela je do smanjenja cističnog fenotipa, poboljšanja bubrežne funkcije i prolongacije preživljenja. (73) Također mutacija veznog mjesta za klastersku skupinu na pojedinim genima dovela je do ukidanja miRNA represije na navedene gene. Međutim, utjecaj mutacije klasterskog gena u *Pkd1* pozitivnom bubregu nije još dokazan, iako bi u teoriji inhibicija miR-17~92 dovela do povišenja razine navedenog gena i usporavanja policistične bolesti. Zaključno možemo reći da miR-17~92 skupina sudjeluje u razvoju cista direktno, poticanjem stanične proliferacije, i indirektno, modifikacijom gena

koji imaju ključnu ulogu u razvoju policističnih bolesti bubrega. (37)

MiR-200. Ova obitelj miRNA sastoji se od 5 članova podijeljenih u dva klastera. Klaster miR-200b~miR-429 lociran je na kromosomu 1, a klaster miR-200c i miR-141 lociran je na kromosomu 12. Brojne činjenice govore o važnosti ove obitelji u razvoju bubrežnih tubula, ali i u patogenezi cista. Prvo, ekspresija miR-200 obitelji je visoka u zdravim bubrezima, a znatno snižena u oštećenim bubrezima. Drugo, knockout *Dicera*, enzima važnog u biogenezi miRNA, dovodi do sniženja ekspresije svih 5 članova porodice miR-200 i formiranja tubularnih cista. Treće, knockdown miR-200 u kulturama bubrežnih epitelnih stanica inhibira tubulogenezu i producira cistama nalik tvorbe. Nadalje, za miR-200 dokazano je da regulira ekspresiju *Pkd1* gena tako da se veže za specifično mjesto na navedenom genu i blokira njegovu translaciju. Zbog toga je u prethodno navedenim situacijama inaktivacije *Dicera* ili samog miR-200 gena ekspresija *Pkd1* gena pojačana. (74) I posljednje, transkripcija miR-200 regulirana je od strane *Hnf-1β* gena, a delecija navedenog gena dovodi do smanjene ekspresije miR-200 što uzrokuje nastanak bubrežnih cista. Možemo zaključiti da postoji poveznica policističnih bubrega s tri već navedena gena, *Pkd1*, *Pkhd1* i miR-200, a sva tri gena direktno regulira *Hnf-1β*. (75) Mehanizam putem kojeg miR-200 obitelj dovodi do razvoja cista uključuje već ranije navedenu epitelno-mezenhimalnu transformaciju. (37)

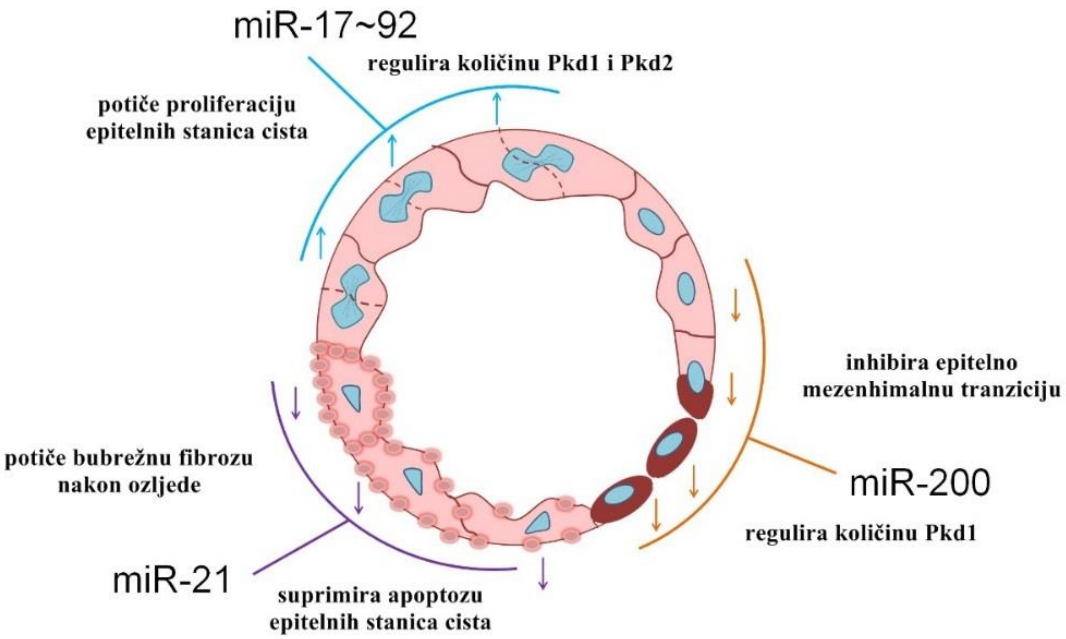
MiR-21. MiR-21 lociran je na kromosomu 17 gdje se preklapa s protein kodirajućim genom nazvanim *Vnp-1* (engl. *Vacuole membrane protein 1*). Bez obzira na to, njegova regulacija je neovisna o navedenom genu. MiR-21 nije pretjerano važna u razvoju pojedinih organa, ali je važna u promociji proliferacije i inhibiciji apoptoze u procesu regeneracije nakon oštećenja organa. MiR-21 je značajno amplificirana u pojedinim formama karcinoma zbog toga što blokira pojedine tumor supresorske gene. (76) Kao što je ranije opisano miR-21 važna je i u bubrežnoj fibrozi. Karcinomi, fibroza i cistične promjene mogu imati neke zajedničke karakteristike pa nije iznenađujuće da miR-21 ima ulogu i u cističnim promjenama bubrega. MiR-21 je pojačano regulirana u pojedinim mišjim modelima policistične bubrežne bolesti i u kulturama stanica dobivenim od bolesnika s autosomno dominantnom policističnom bubrežnom bolešću. Dokazano je da inhibicija ekspresije miR-21 usporava rast cista na modelima miševa s policističnim bubrezima. Kao kod karcinoma, miR-21 potiče rast cista inhibicijom apoptoze i promoviranjem preživljenja epitelnih stanica. Potencijalni molekularni mehanizam putem kojeg miR-21 potiče rast cista mogao bi biti putem direktne inhibicije proapoptotske tumorsupresorske PDCD4. PDCD4 knockout miševi spontano razvijaju cistične promjene. (37)

Tablica 8. U tablici su prikazane miRNA koje su pojačano, odnosno sniženo eksprimirane u policističnoj bubrežnoj bolesti. Modificirano prema Patel i sur. (37)

pojačano eksprimirani	sniženo eksprimirani
miR-17	miR-200
miR-21	miR-204
miR-214	miR-488
miR-185	
miR-146b	
miR-503	
miR-34a	
miR-10	

Potencijalna terapeutska uloga miRNA u policističnoj bolesti bubrega. Razumijevanje uloge miRNA u patogenezi policistične bubrežne bolesti dovelo je do razvoja terapijskog pristupa temeljenog na miRNA. Ovi pristupi uključuju uporabu sintetičkih

oligonukleotida nazvanih antimiR i miRNA imitacija. AntimiRom posredovana inhibicija miR-17 i miR-21 mogla bi biti odgovarajući terapijski pristup u usporavanju razvoja cista. Druga je mogućnost istodobna uporaba antimiRa s drugim lijekovima poput tolvaptana zbog mogućeg sinergističkog djelovanja. Osnovni nedostatak antimiRa je njihova ograničena distribucija u oštećene, cistične i fibrozom promijenjene bubrege. (37)



Slika 10. Potencijalni mehanizmi putem kojih pojedine miRNA djeluju na razvoj cista. Modificirano prema Patel i sur. (37)

5. MIKRO RNA U KARDIOVASKULARNIM KOMPLIKACIJAMA KBB

Brojne studije govore o utjecaju miRNA na razvoj različitih srčanih bolesti poput ishemijske bolesti srca i kongestivnog srčanog zatajenja. Kao što je već ranije navedeno, u bolesnika s KBB razvijaju se različite kardiovaskularne komplikacije te one predstavljaju vodeći uzrok smrti u takvih bolesnika. Bez obzira na poznatu povezanost bubrežnih i kardiovaskularnih bolesti, sama patogeneza i čimbenici koji posreduju navedenu povezanost još su uvijek nedostatno razjašnjeni. Stoga razvijanje potencijalnih biomarkera koji bi predvidjeli razvoj navedenih komplikacija u KBB, njihov tijek, prognozu kao i terapijski uspjeh predstavlja izazov današnje medicine. Izdvaja se nekoliko studija koje bi govorile u prilog navedenom. (77,78)

Klimczak i suradnici proučavali su povezanost između serumske ekspresije miRNA i kontrole krvnog tlaka u bolesnika s KBB, a posebno je istaknuta uloga miR-155-5p. U prijašnjim studijama dokazana je uloga navedene miRNA u razvoju KBB, to jest, miR-155 pojačano je eksprimirana u bolesnika s KBB. U ovoj studiji autori su dokazali da je navedena miRNA jače eksprimirana u bolesnika s KBB koji imaju hipertenzivne vrijednosti krvnog tlaka, a posebna povezanost se pokazala između te miRNA i noćne hipertenzije u bubrežnih bolesnika, odnosno, u takvih bolesnika miR-155-5p je bila još značajnije povišena. Kao potencijalni mehanizam djelovanja na krvi tlak istaknuta je uloga miRNA kao translacijskog inhibitora angiotenzinskih receptora tipa 1. Dakle, miR-155-5p predstavlja poveznicu između KBB i noćne hipertenzije te kao takva može poslužiti kao potencijalni biomarker i terapeutska meta, osobito kad se uzme u obzir činjenica da bolesnici s noćnom hipertenzijom nemaju dobar odgovor na klasičnu antihipertenzivnu terapiju. (79)

Wen i suradnici istraživali su ulogu miR-133a u hipertrofiji lijeve klijetke u bolesnika na hemodijalizi. Cirkulirajuće razine te miRNA bile su snižene u bolesnika na hemodijalizi. Kako navedena miRNA ima značajnu ulogu u hipertrofiji srca, točnije rečeno, njezin nedostatak pogoduje razvoju hipertrofije miokarda, uspoređena je njezina serumska razina u bolesnika s ljevostranom hipertrofijom srca koji su na hemodijalizi, bolesnika na hemodijalizi bez hipertrofičnih promjena srca i zdravih kontrola. Dokazana je poveznica između snižene razine miR-133a u bolesnika na hemodijalizi i razvoja hipertrofije lijeve klijetke. Studija upućuje na to da bi navedena miRNA mogla poslužiti kao alternativni biomarker hipertrofičnih promjena srca u bolesnika na hemodijalizi. (80)

MiR-21 je prikazana kao jedna od vodećih miRNA u razvoju bubrežne fibroze. Isto tako, istaknuta je njezina uloga u patologiji drugih organa, prvenstveno srca. (78, 81, 82) Već ranije navedeni kardiorenalni sindrom tip 4 je stanje u kojem KBB pridonosi patološkim promjenama u srcu, uključujući i hipertrofiju lijevog ventrikula, dijastoličku disfunkciju te kardiovaskularnim incidentima. Chuppa i suradnici proučavali su ulogu navedene miRNA u razvoju kardiorenalnog sindroma tipa 4. U mišjem modelu ta miRNA bila je pojačano eksprimirana što je bilo povezano s tlačnim i volumnim opterećenjem srca te razvojem hipertrofije lijevog ventrikula i u konačnici zatajenja srca. Također, pokazalo se da je knockdown miR-21 gena prevenirao hipertrofično remodeliranje srca. Smatra se da su potencijalni mehanizmi kojima miR-21 dovodi do remodeliranja i disfunkcije miokarda slični onima u razvoju bubrežne fibroze, a posebno je istaknuta supresija PPARα. (77)

Taïbi i suradnici proučavali su ekspresiju 6 miRNA (miR-126, miR-143, miR-145, miR-221, miR-222 i miR-223) u aorti miševa s ciljem utvrđivanja razlika između KBB modela i zdravih kontrola. Cilj je bio otkrivanje dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera ateroskleroze u KBB. Obje miRNA specifične za glatkomišićne vaskularne stanice (miR-143 i miR-145) pokazale su sniženu ekspresiju u svim stadijima ateroskleroze, neovisno je li bila riječ o KBB modelu ili o aterosklerozi u miševa bez bubrežnih oštećenja. Razina njihovog ciljnog proteina miokardina bila je snižena. Inflamatorna miR-223 bila je povišena u uznapredovalim stadijima KBB, u sklopu kojih

se razvila aterosklerotska bolest aorte. Razina miR-126, koja je uobičajeno podrijetla iz endotela, bila je povišena. Nakon uporabe lijeka svelamera došlo je do parcijalne korekcije navedenih promjena miRNA što ukazuje na činjenicu da postoji direktna veza između izmijenjenih razina miRNA i uremijske vaskularne toksičnosti. Zaključno možemo reći da navedene miRNA imaju značajnu ulogu u vaskularnoj remodelaciji u bolesnika s KBB te bi, stoga, mogle poslužiti kao ciljne mete prevencije i liječenja kardiovaskularnih komplikacija KBB. (83)

Razumijevanje uloge miRNA u razvoju komplikacija KBB, prvenstveno kardiovaskularnih komplikacija, od velikog je značaja u prognostičkom i terapeutskom pogledu za navedene pacijente. Međutim mali broj studija i velika količina nepoznatih činjenica upućuju na to da su potrebna dodatna istraživanja prije bilo kakve kliničke uporabe miRNA u kardiorenalnih bolesnika.

6. ZAKLJUČAK

KBB poprima pandemijske razmjere danas u svijetu te predstavlja značajan globalni javnozdravstveni problem. Unatoč poznatim raznovrsnim etiološkim faktorima, brojni patofiziološki metabolički putevi u razvoju i progresiji KBB ostaju nerazjašnjeni. Potpuno je razumljivo se da stupanj nasljeđivanja KBB ne može u potpunosti objasniti na razini DNA. Također za utjecaj okolišnih čimbenika ne možemo reći da djeluje u potpunosti samostalno. Postaje sve jasnije da epigenetika ima ključnu ulogu kako u razvoju i fiziologiji zdravog bubrega, tako i u patogenetskim procesima. Pored toga, dijagnostički postupak je efikasan, ali često bez mogućnosti izbjegavanje invazivnih pretraga, a terapija je prihvatljiva, no daleko od mogućnosti potpunog zaustavljanja svake progresije KBB. U tom kontekstu ponovno vidimo značaj epigenetike. Neophodan je razvoj neinvazivnih biomarkera koji bi s visokom osjetljivošću i specifičnošću detektirali bolest te predviđali prognozu i pratili terapijski uspjeh. Nadalje, radi i se na razvoju novih lijekova temeljenih na upravo spomenutim epigenetskim procesima koji bi bili jednostavni za primjenu, prihvatljivi za pacijenta i s malim brojem nuspojava. U ovom radu su od različitih epigenetskih mogućnosti istaknute miRNA molekule. One predstavljaju sve što je upravo navedeno. Posrednik su između DNA i njihovog konačnog produkta, a mogu biti i značajna karika u utjecaju okolišnih čimbenika na razvoj bolesti. U studijama su se pokazale kao primjereni alat za uporabu u svakodnevnoj kliničkoj praksi te mogu poslužiti kao adekvatni biomarkeri u serumu, urinu i uzorku tkiva dobivenom biopsijom, ali i kao učinkovito terapeutsko sredstvo. AntimiRi i miRNA imitacije dokazano su u brojnim studijama usporile, čak i potpuno prekinule progresiju agresivnih bubrežnih bolesti u životinjskim modelima.

Zaključno možemo reći da bi, zbog neupitnog porasta incidencije i zdravstvenog značaja KBB, medicina trebala razviti nove mogućnosti prevencije, dijagnostike i liječenja iste. Stoga bi se u budućnosti istraživanja trebala usmjeriti na epigenetske procese s ciljem boljeg razumijevanja patofizioloških procesa u bubregu te razvoja širokog spektra mogućnosti njezine primjene u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ingrid Prkačin, prim. dr. med. na povjerenju, stručnom vodstvu, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima, Milki i Branku, na neizmjernoj podršci, strpljenju i vjeri u mene.

LITERATURA

1. Galešić K, Sabljar-Matovinović M. Kronična insuficijencija bubrega. U: Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, urednici. Interna medicina. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str. 1087–91.
2. Yaqoob M. Chronic kidney disease. U: Kumar P, Clark M, urednici. Kumar & Clark's Clinical Medicine. 8. izd. London: Elsevier Ltd; 2012. str. 615–24.
3. Watnick S, Dirkx T. Chronic kidney disease. U: Papadakis M, McPhee SJ, urednici. Current Medical Diagnosis & Treatment. 54. izd. San Francisco: McGraw-Hill Education; 2015. str. 900–6.
4. Goddard J, Turner AN. Chronic kidney disease. U: Walker BR, Colledge NR, Ralston SH, Penman ID, urednici. Davidson's Principles and Practice of medicine. 22. izd. Philadelphia: Elsevier; 2014. str. 483–8.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease [Internet]. 2012. [pristupljeno 29. 04.2018.]. Dostupno na: http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf
6. Čala S. Hrvatski registar nadomještanja bubrežne funkcije - HRNBF, Izvještaj za 2012. godinu [Internet]. 2012. [pristupljeno 29. 04.2018.].Dostupno na: https://www.hdndt.org/doc/HRNBF-2012.pdf
7. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveni-statistički ljetopis za 2016. godinu [Internet]. 2017. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/05/Ljetopis_2016_IX.pdf
8. Anothaisintawee T, Rattanasiri S, Ingsathit A, Attia J, Thakkinstian A. Prevalence of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. Clin Nephrol. 2009.;71(3):244–54.
9. Duraković Z, Gašparović V, Ivanović D, Gjurašin M, Radošević-Stašić B. Bubrežna insuficijencija. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, urednici. Patofiziologija, knjiga prva. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 984–1025.
10. Taal MW. Risk Factors and Chronic Kidney Disease. U: Skorecki K, Chertow GM, Marsden PA, Taal MW, Alan S, urednici. Brenner and Rector's The Kidney, 2-Volume Set. 10. izd. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2015. str. 669–92.
11. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJL, Mann JF, i ostali. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: Epidemiology, mechanisms, and prevention. Lancet [Internet]. 2013.;382(9889):339–52. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60595-4
12. Bergman Marković B. Kardiorenalni sindrom: klinička slika, pravovremena dijagnoza i liječenje u obiteljskoj medicini. Acta medica Croat [Internet]. 2016.;70(4–5):207–16. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/179203
13. Prkačin I, Čavrić G, Bašic-Jukić N. MicroRNA in kidney disease. BANTAO Journal. 2016.;14(1):8–10.
14. Khella HWZ, Bakhet M, Lichner Z, Romaschin AD, Jewett MAS, Yousef GM. MicroRNAs in kidney disease: An emerging understanding. Am J Kidney Dis [Internet]. 2013.;61(5):798–808. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.09.018
15. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? Nat Rev Genet. 2008.;9(2):102–14.
16. Ramdas V, McBride M, Denby L, Baker AH. Canonical transforming growth factor-β signaling regulates disintegrin metalloprotease expression in experimental renal fibrosis via miR-29. Am J Pathol [Internet].

2013.;183(6):1885–96. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.027
17. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol. 2009.;11(3):228–34.
18. Banek L. Urogenitalni sustav. U: Sadler T, urednik, Bradamante Ž, Grbeša Đ, ur. hr. izdanja. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. str. 231–5.
19. Karolina DS, Wintour EM, Bertram J, Jeyaseelan K. Riboregulators in kidney development and function. Biochimie [Internet]. 2010.;92(3):217–25. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.12.008
20. Ma L, Qu L. The function of MicroRNAs in renal development and pathophysiology. J Genet Genomics [Internet]. 2013.;40(4):143–52. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2013.03.002
21. Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G. MicroRNAs in kidney physiology and disease. Nat Rev Nephrol [Internet]. 2015.;11(1):23–33. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2014.202
22. Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Goldberg S, Schermer B, Harfe BD, i ostali. Podocyte-Specific Deletion of Dicer Alters Cytoskeletal Dynamics and Causes Glomerular Disease. J Am Soc Nephrol [Internet]. 2008.;19(11):2150–8. Dostupno na: http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2008020233
23. Shi S, Yu L, Chiu C, Sun Y, Chen J, Khitrov G, i ostali. Podocyte-Selective Deletion of Dicer Induces Proteinuria and Glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol [Internet]. 2008.;19(11):2159–69. Dostupno na: http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2008030312
24. Akkina S, Becker BN. MicroRNAs in kidney function and disease. Transl Res [Internet]. 2011.;157(4):236–40. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.011
25. Chung ACK, Lan HY. MicroRNAs in renal fibrosis. Front Physiol. 2015.;6(FEB):1–10.
26. Meng XM, Tang PMK, Li J, Lan HY. TGF-ß/Smad signaling in renal fibrosis. Front Physiol. 2015.;6(MAR):1–8.
27. Chen HY, Zhong X, Huang XR, Meng XM, You Y, Chung ACK, i ostali. MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice. Mol Ther. 2014.;22(4):842–53.
28. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, i ostali. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. EMBO Rep. 2008.;9(6):582–9.
29. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, i ostali. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nat Cell Biol. 2008.;10(5):593–601.
30. Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, i ostali. An autocrine TGF- /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. Mol Biol Cell [Internet]. 2011.;22(10):1686–98. Dostupno na: http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-02-0103
31. Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, Linn G, i ostali. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. Sci Transl Med. 2012.;4(121).
32. Loboda A, Sobczak M, Jozkowicz A, Dulak J. TGF-β1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation. Mediators Inflamm. 2016.;2016:8319283.
33. McClelland AD, Herman-Edelstein M, Komers R, Jha JC, Winbanks CE, Hagiwara S, i ostali. miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy

by targeting PTEN and SMAD7. Clin Sci (Lond) [Internet]. 2015.;129(12):1237–49. Dostupno na: http://www.clinsci.org/content/129/12/1237.abstract
34. Brigant B, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Mckay N, Liabeuf S, Pelletier M, i ostali. Serum microRNAs are altered in various stages of chronic kidney disease: a preliminary study. Clin Kidney J Clin Kidney J Adv Access Publ July [Internet]. 2016.;4:1–8. Dostupno na: https://academic.oup.com/ckj/article/10/4/578/3940588
35. Szeto C-C, Ching-Ha KB, Ka-Bik L, Mac-Moune LF, Cheung-Lung CP, Gang W, i ostali. Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. Dis Markers. 2012.;33(3):137–44.
36. Denby L, Baker AH. Targeting non-coding RNA for the therapy of renal disease. Curr Opin Pharmacol [Internet]. 2016.;27:70–7. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2016.02.001
37. Hajarnis S, Lakhia R, Patel V. MicroRNAs and Polycystic Kidney Disease. U: Li X, urednik. Polycystic Kidney Disease [Internet]. Brisane: Codon Publications; 2015. str. 313–34. Dostupno na: http://codonpublications.com/index.php/codon/catalog/view/33/101/235-1
38. Gibson NW. Engineered microRNA therapeutics. J R Coll Physicians Edinb. 2014.;44(3):196–200.
39. Gomez IG, Grafals M, Portilla D, Duffield JS. MicroRNAs as potential therapeutic targets in kidney disease. J Formos Med Assoc [Internet]. 2013.;112(5):237–43. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2012.12.011
40. van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. EMBO Mol Med [Internet]. 2014.;6(7):851–64. Dostupno na: http://embomolmed.embopress.org/cgi/doi/10.15252/emmm.201100899
41. Prakash TP, Graham MJ, Yu J, Carty R, Low A, Chappell A, i ostali. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. Nucleic Acids Res. 2014.;42(13):8796–807.
42. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, i ostali. Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. N Engl J Med [Internet]. 2013.;368(18):1685–94. Dostupno na: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1209026
43. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, i ostali. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. J Clin Invest. 2015.;125(1):141–56.
44. Navarro-Quiroz E, Pacheco-Lugo L, Lorenzi H, Díaz-Olmos Y, Almendrales L, Rico E, i ostali. High-throughput sequencing reveals circulating miRNAs as potential biomarkers of kidney damage in patients with systemic lupus erythematosus. PLoS One [Internet]. 2016.;11(11):1–12. Dostupno na: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0166202
45. Wu H, Zeng J, Yin J, Peng Q, Zhao M, Lu Q. Organ-specific biomarkers in lupus. Autoimmun Rev. 2017.;16(4):391–7.
46. Soliman S, Mohan C. Lupus nephritis biomarkers. Clin Immunol [Internet]. 2017.;185(2017):10–20. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.08.001
47. Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. Rheumatol Int. 2009.;29(7):749–54.
48. Te JL, Dozmorov IM, Guthridge JM, Nguyen KL, Cavett JW, Kelly JA, i ostali. Identification of unique MicroRNA signature associated with lupus nephritis. PLoS One [Internet]. 2010.;5(5):1–7. Dostupno na: http://journals.plos.org/plosone/article

?id=10.1371/journal.pone.0010344
49. Wang G, Tam L, Li E, Kwan B, Chow K, Luk C, i ostali. Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus [Internet]. 2011.;20(5):493–500. Dostupno na: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0961203310389841
50. Wang G, Tam LS, Li EKM, Kwan BCH, Chow KM, Luk CCW, i ostali. Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 2010.;37(12):2516–22.
51. Wang G, Tam LS, Kwan BCH, Li EKM, Chow KM, Luk CCW, i ostali. Expression of miR-146a and miR-155 in the urinary sediment of systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol. 2012.;31(3):435–40.
52. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, i ostali. MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. Arthritis Rheum. 2009.;60(4):1065–75.
53. Szeto CC, Kwan BCH, Tam LS. Urinary mRNA in Systemic Lupus Erythematosus [Internet]. 1. izd. Sv. 62, Advances in Clinical Chemistry. Elsevier Inc.; 2013. 197-219 str. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800096-0.00005-6
54. Guan J, Wang G, Tam LS, Kwan BCH, Li EKM, Chow KM, i ostali. Urinary sediment ICAM-1 level in lupus nephritis. Lupus. 2012.;21(11):1190–5.
55. Dai Y, Huang Y-S, Tang M, Lv T-Y, Hu C-X, Tan Y-H, i ostali. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. Lupus [Internet]. 2007.;16(12):939–46. Dostupno na: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0961203307084158
56. Krasoudaki E, Banos A, Stagakis E, Loupasakis K, Drakos E, Sinatkas V, i ostali. Micro-RNA analysis of renal biopsies in human lupus nephritis demonstrates up-regulated miR-422a driving reduction of kallikrein-related peptidase 4. Nephrol Dial Transplant. 2016.;31(10):1676–86.
57. Selvaskandan H, Pawluczyk I, Barratt J. MicroRNAs: a new avenue to understand, investigate and treat immunoglobulin A nephropathy? Clin Kidney J [Internet]. 2018.;11(1):29–37. Dostupno na: https://academic.oup.com/ckj/article/11/1/29/4191363
58. Gale DP, Molyneux K, Wimbury D, Higgins P, Levine AP, Caplin B, i ostali. Galactosylation of IgA1 Is Associated with Common Variation in C1GALT1. J Am Soc Nephrol. 2017.;28(7):2158–66.
59. Eijgenraam JW, Van Kooten C. IgA1 glycosylation in IgA nephropathy: As sweet as it can be. Kidney Int. 2008.;73(10):1106–8.
60. Serino G, Sallustio F, Cox SN, Pesce F, Schena FP. Abnormal miR-148b Expression Promotes Aberrant Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy. J Am Soc Nephrol [Internet]. 2012.;23(5):814–24. Dostupno na: http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2011060567
61. Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y. Microarray analysis of micro-ribonucleic acid expression in primary immunoglobulin A nephropathy. Saudi Med J. 2008.;29(10):1388–93.
62. Tan K, Chen J LW et al. Genome-wide analysis of microRNAs expression profiling in patients with primary IgA nephropathy. Genome. 2013.;56:161–169.
63. Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, Choi PCL, Chow KM, Li PKT, i ostali. Intrarenal expression of microRNAs in patients with IgA nephropathy. Lab Investig [Internet]. 2010.;90(1):98–103. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2009.118
64. Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, Chow KM, Li PKT, Szeto CC. Elevated levels of miR-146a and miR-155 in kidney biopsy and urine from patients with IgA nephropathy. Dis Markers.

2011.;30(4):171–9.
65. Wang N, Bu R, Duan Z, Zhang X, Chen P, Li Z, i ostali. Profiling and initial validation of urinary microRNAs as biomarkers in IgA nephropathy. PeerJ [Internet]. 2015.;3:e990. Dostupno na: https://peerj.com/articles/990
66. Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, Chow KM, Li PKT, Szeto CC. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: Novel biomarkers of fibrosis. Am J Nephrol. 2012.;36(5):412–8.
67. Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, Chow KM, Kam-Tao Li P, Szeto CC. Expression of microRNAs in the urinary sediment of patients with IgA nephropathy. Dis Markers. 2010.;28(2):79–86.
68. Duan ZY, Cai GY, Bu R, Lu Y, Hou K, Chen XM. Selection of urinary sediment miRNAs as specific biomarkers of IgA nephropathy. Sci Rep. 2016.;6(March):1–10.
69. Hu S, Bao H, Xu X, Zhou X, Qin W, Zeng C, i ostali. Increased MIR-374b promotes cell proliferation and the production of aberrant glycosylated IgA1 in B cells of IgA nephropathy. FEBS Lett [Internet]. 2015.;589(24):4019–25. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.033
70. Bao H, Chen H, Zhu X, Yao G, Yu Y, Qin W, i ostali. MiR-223 downregulation promotes glomerular endothelial cell activation by upregulating importin 4 and 5 in IgA nephropathy. Kidney Int [Internet]. 2014.;85(3):624–35. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1038/ki.2013.469
71. Tassano E, Di Rocco M, Signa S, Gimelli G. De novo 13q31.1-q32.1 interstitial deletion encompassing the miR-17-92 cluster in a patient with Feingold syndrome-2. Am J Med Genet Part A. 2013.;161(4):894–6.
72. Mu P, Han Y-C, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogrodowski P, i ostali. Genetic dissection of the miR-17 92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. Genes Dev. 2009.;23(646):2806–11.
73. Patel V, Williams D, Hajarnis S, Hunter R, Pontoglio M, Somlo S, i ostali. miR-17 92 miRNA cluster promotes kidney cyst growth in polycystic kidney disease. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2013.;110(26):10765–70. Dostupno na: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1301693110
74. Patel V, Hajarnis S, Williams D, Hunter R, Huynh D, Igarashi P. MicroRNAs Regulate Renal Tubule Maturation through Modulation of Pkd1. J Am Soc Nephrol [Internet]. 2012.;23(12):1941–8. Dostupno na: http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2012030321
75. Hajarnis SS, Patel V, Aboudehen K, Attanasio M, Cobo-Stark P, Pontoglio M, i ostali. Transcription factor hepatocyte nuclear factor-1β (HNF-1β) regulates microRNA-200 expression through a long noncoding RNA. J Biol Chem. 2015.;290(41):24793–805.
76. Ma X, Kumar M, Choudhury SN, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Kanakamedala K, i ostali. Loss of the miR-21 allele elevates the expression of its target genes and reduces tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2011.;108(25):10144–9. Dostupno na: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103735108
77. Chuppa S, Liang M, Liu P, Liu Y, Casati MC, Cowley AW, i ostali. MicroRNA-21 regulates peroxisome proliferator–activated receptor alpha, a molecular mechanism of cardiac pathology in Cardiorenal Syndrome Type 4. Kidney Int. 2018.;93(2):375–389.
78. Oliveira-Carvalho V, Silva MMF Da, Guimarães GV, Bacal F, Bocchi EA. MicroRNAs: New players in heart failure. Mol Biol Rep. 2013.;40(3):2663–70.
79. 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.;11(12):831–841.e4.
80. Wen P, Song D, Ye H, Wu X, Jiang L, Tang B, i ostali. Circulating MiR-133a as

a biomarker predicts cardiac hypertrophy in chronic hemodialysis patients. PLoS One [Internet]. 2014.;9(10). Dostupno na: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103079

81. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2010.;393(4):643–8. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.045

82. Oliveira-Carvalho V, Carvalho VO, Silva MM, Guimarães GV, Bocchi EA. MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure? Arq Bras Cardiol. 2012.;98(4):362–9.

83. Taïbi F, Metzinger-Le Meuth V, M'Baya-Moutoula E, Djelouat M seif el I, Louvet L, Bugnicourt JM, i ostali. Possible involvement of microRNAs in vascular damage in experimental chronic kidney disease. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet]. 2014.;1842(1):88–98. Dostupno na: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.005

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Anja Ivošević

Datum rođenja: 7.8.1993.

Mjesto rođenja: Ogulin

OBRAZOVANJE

Prva osnovna škola Ogulin 2000.-2008.

Gimnazija Bernardina Frankopana Ogulin 2008.-2012.

Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet 2012.-2018.

IZVANNASTAVNE AKTIVNOSTI

2015.-2017. Demonstrator na Katedri za Patofiziologiju

2016.-2018. Demonstrator na Katedri za Internu medicinu, na kolegiju Klinička propedeutika

12.3.2016. Sudjelovanje na radionici Kardio dan Studentske sekcije za kardiologiju

19.5.2017. Sudjelovanje na tečaju Suvremeni principi rekonstrukcijske kirurgije na KB Dubrava

od 2018. volonter u Liniji za rijetke bolesti

CERTIFIKATI I PRIZNANJA

BLS/AED certifikat

STRANI JEZICI

Aktivno služenje engleskim i njemačkim jezikom.