

Prediktívna hodnota mikroRNA v diagnostike a prognóze srdcového zlyhania a osteoporózy

M. KUŽMA, A. GAŽOVÁ, J. KYSELOVIČ, P. JACKULIAK, Z. KILLINGER, J. PAYER

V. interná klinika, LF UK a UNB, Bratislava

SÚHRN

Kužma M., Gažová A., Kyselovič J., Jackuliak P., Killinger Z., Payer J.: **Prediktívna hodnota mikroRNA v diagnostike a prognóze srdcového zlyhania a osteoporózy**

Cieľom prehľadového článku je predstaviť súčasné poznatky o mikro-RNA (miRNA) z klinických štúdií za účelom lepšieho pochopenia etiológie a patofyziológie srdcového zlyhania (SZ), osteoporózy a sarkopénie a pokúsiť sa identifikovať profil miRNA, prostredníctvom ktorého by bolo možné zlepšiť úroveň a presnosť predikcie progresie a/alebo liečby oboch ochorení.

Kľúčové slová: osteoporóza, fraktúry, mikro-RNA, srdcové zlyhávanie

SUMMARY

Kužma M., Gažová A., Kyselovič J., Jackuliak P., Killinger Z., Payer J.: **Predictive value of microRNAs in the diagnosis and prognosis of heart failure and osteoporosis**

The review aimed to present recent findings from clinical studies on micro-RNAs (miRNAs) to better characterize the pathoetiology of heart failure, osteoporosis and sarcopenia, and to possibly even find miRNA targets which would increase the level and accuracy of prediction of the progression and/or treatment of both diseases.

Keywords: osteoporosis, fractures, mikro-RNA, heart failure

Osteologický bulletin 2017; 22(4):142–145

Adresa: MUDr. Martin Kužma, PhD., V. interná klinika, LF UK a UN, Ružinovská 6, 826 06 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: kuzma@ru.unb.sk

Došlo do redakcie: 19. 12. 2017

Prijato k tisku: 7. 2. 2018

Úvod

Osteoporóza predstavuje vážne chronické ochorenie, u ktorého 1 z 3 žien a 1 z 5 mužov vo veku 50 rokov utrpí osteoporotickú fraktúru. Na druhej strane, napriek pokroku v prevencii a liečbe chronického srdcového zlyhania (SZ) počas posledných niekoľkých desaťročí, zostáva toto ochorenie stále veľkou výzvou súčasnej medicíny, pretože pacienti so SZ majú často zlú prognózu a približne polovica zomrie do 4 rokov [1]. Podľa doterajších údajov má pacient so SZ o 30 % vyššie riziko vzniku non-osteoporotickej vertebrálnej, ale aj vertebrálnej fraktúry, ktoré sú nezávislé od tradičných rizikových faktorov osteoporózy rovnako ako zníženie kostnej hustoty. Navyše, komorbidita ako dia-

betes mellitus, chronické ochorenie obličiek, tyreopatie, gastrointestinálne choroby, ktoré sú často prítomné u pacientov so SZ, sa môžu taktiež podieľať na vzniku osteoporózy u týchto pacientov. U pacientov so SZ sú prítomné ďalšie špecifické faktory asociované so SZ, akými sú sekundárny hyperaldosteronizmus, hyponatriémia a chronické užívanie slučkových diuretik, ktoré môžu byť zodpovedné za častý výskyt osteoporózy a fraktúr u pacientov so SZ.

Väčšina prác, ktorá za východzí parameter považuje osteoporózu, je založená na skúmaní anamnézy a klinickom vyšetrení, so zameraním na identifikáciu periférnych fraktúr, zatiaľ čo riziko vertebrálnych fraktúr u týchto pacientov zostáva nejasné [2–12].

Závažnosť problematiky SZ a osteoporózy doteraz nezbudzovala veľkú pozornosť. Nie je k dispozícii dostatok údajov o hormonálnych zmenách (pohlavné hormóny, funkcia štítnej žľazy), zmenách v mineralograme, v etiológii osteoporózy u pacientov so SZ. Keďže na základe výsledkov klinických štúdií sú vertebrálne fraktúry v dôsledku častej absencie klinických príznakov v mnohých prípadoch poddiagnostikované, za účelom zistenia skutočnej prevalencie fraktúr v populačných štúdiách sa v súčasnosti používajú rádiologické a morfometrické techniky. Vertebrálne fraktúry majú veľký klinický význam, pretože ovplyvňujú prognózu pacientov s osteoporózou rizikom vzniku ďalšej fraktúry, zvýšením morbiditu a mortality. Tieto aspekty môžu mať veľký význam v populácii pacientov, akými sú pacienti so SZ.

Doterajší výskum poukazuje na možné prekrývanie základných patofyziologických mechanizmov týchto ochorení [2,13]. Zmeny kostnej denzity však nedokážu dostatočne vysvetliť zvýšené riziko fraktúr, ktoré by preto malo byť zhodnotené pomocou klinických rizikových faktorov a kostných vyšetrení [11].

Toto je v súlade s existujúcimi dôkazmi, ktoré naznačujú, že obidve choroby majú spoločné patogenetické mechanizmy a je potrebný ďalší výskum na preskúmanie základných biologických procesov s cieľom identifikovať nové terapeutické ciele pri preventívnej intervencii. Na základe týchto zistení by bolo vhodné preskúmať možné asociácie kostnej denzity a trabekulárneho kostného skóre (TBS) ako kvantitatívnych hodnotení osteoporózy s rizikom rozvoja srdcového zlyhania v populácii zdanlivo zdravých mužov a žien v strednom veku a zamerať sa na miRNA ako relatívne malú skupinu novo identifikovaných multigénnych regulátorov.

Vzťah medzi srdcovým zlyhaním a osteoporózou

Viac ako 10 rokov bol niektorými klinickými štúdiami identifikovaný možný vzťah medzi SZ a fragilitou kosti, ale aj medzi osteoporózou a zvýšeným rizikom vzniku kardiovaskulárnych (KVS) ochorení. U pacientov s nedávno diagnostikovaným KVS ochorením existuje vysoké riziko vzniku fraktúry proximálneho femuru, preto by populácia takto vysoko rizikových pacientov mohla profitovať zo skríningu a včasnej prevencie a liečby osteoporózy [2–12].

Hrubá absolútna miera fraktúry proximálneho femuru u pacientov so SZ bola 12,6 na 1 000 paciento-rokov, u pacientov po cievnej mozgovej príhode 12,6 na 1 000 paciento-rokov, u pacientov s diagnostikovaným periférnym artériovým ochorením 6,6 na 1 000 paciento-rokov a u pacientov s ischemickou chorobou srdca 5,2 na 1 000 paciento-rokov v porovnaní s 1,2 na 1 000 paciento-rokov u pacientov bez KVS ochorenia. Multivariantne upravená miera relatívneho rizika (hazard ratio – HR) fraktúry proximálneho femuru u pacientov s diagnostikovaným SZ bola 4,40 (95% konfi-

denčný interval [CI], 3,43–5,63); u pacientov po cievnej mozgovej príhode 5,09 (95% CI, 4,18–6,20); u pacientov s diagnostikovaným periférnym artériovým ochorením 3,20 (95% CI, 2,28–4,50); a u pacientov s ischemickou chorobou srdca 2,32 (95% CI, 1,91–2,84).

Medzi rizikové faktory, ktoré výrazne zvyšujú morbiditu ako aj mortalitu pacientov s osteoporózou, ako aj pacientov so SZ, patrí sarkopénia. V štúdií “Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure (SICA-HF)” [12] sa zistila prítomnosť sarkopénie u 19,7 % zo všetkých pacientov so SZ a zachovanou systolickou funkciou ľavej komory (LK) a jej vzťah medzi zníženou schopnosťou cvičiť, svalovou silou a kvalitou života. U týchto pacientov sa zistili horšie výsledky počas 6 minútového testu chôdze (404 ± 116 vs. 307 ± 145 m, $p = 0,003$) a nižšia absolútna vrcholová spotreba kyslíka ($1\,579 \pm 474$ vs. $1\,211 \pm 442$ mL/min, $p < 0,05$). Táto multicentrická štúdia preukázala, že pacienti so SZ a zachovanou systolickou funkciou LK sú minimálne rovnako postihnutí sarkopéniou ako pacienti so SZ a redukovanou systolickou funkciou LK, a teda nepostihuje prevažne pacientov so SZ a redukovanou systolickou funkciou LK, ako sa doposiaľ uvádzalo. Pacienti so SZ so zachovanou systolickou funkciou LK a sarkopéniou horšie tolerujú záťaž, čo bolo preukázané 6 minútovým testom chôdze a ďalším testovaním a majú taktiež horšiu kvalitu života [12].

Existuje však aj opačný vzťah, kedy pacienti s osteoporózou majú zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárnych ochorení [11]. Nakoľko SZ rovnako ako aj osteoporóza predstavujú v rozvinutých krajinách veľmi významný medicínsky, ekonomický aj sociálny problém, ďalší výskum spoločných mechanizmov (ktoré stále nie sú objasnené), diagnostiky a liečby osteoporózy, sarkopénie a srdcového zlyhania je nevyhnutný.

Štúdia “European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study in Norfolk, United Kingdom” zisťovala asociáciu minerálnej hustoty kostného tkaniva (BMD) meranú pri kvantitatívnom ultrazvuku päty s incidenciou srdcového zlyhania u 13 666 zdanlivo zdravých osôb vo veku 42 až 82 rokov [11]. Počas 9,3 roka trvajúceho klinického sledovania bolo zaznamenaných 380 prípadov SZ, pričom so zvyšujúcou sa hustotou kosti sa riziko SZ znižovalo. Pomer rizík (hazard ratio, HR) porovnávajúci jednotlivé kvartily s najnižším, bol 0,40 (95% CI: 0,27 až 0,59); 0,54 (95% CI: 0,37 až 0,79) a 0,46 (95% CI 0,32 až 0,68) pri analýze adjustovanej na všetky známe rizikové faktory SZ ako aj osteoporózy (vek, pohlavie, fajčenie, konzumáciu alkoholu, telesnú aktivitu, sociálny status, úroveň vzdelania, systolický krvný tlak, cukrovku, koncentráciu cholesterolu a index telesnej hmotnosti; p pre trend = 0,002), s redukciami rizika o 23 % s každým zvýšením smerodajnej odchýlky minerálnej hustoty kostí o 1 (HR: 0,77; 95% CI: 0,66 až 0,89).

Asociácia bola silnejšia u pacientov so srdcovým zlyhaním bez infarktu myokardu (HR: 0,75; 95% CI: 0,63 až 0,89) ako u SZ s predchádzajúcim infarktom myokardu (HR: 0,82; 95% CI: 0,62 až 1,09). Nakoľko bol preukázaný inverzný vzťah medzi hustotou kosti a rizikom SZ u klinicky asymptomatických jedincov, uvedené zistenia podporujú význam kardiologického vyšetrenia u pacientov s redukovanou hustotou kosti a oprávnené ďalšie skúmanie biologických mechanizmov vedúcich k osteoporóze a SZ [11].

Vzťah medzi miRNA, srdcovým zlyhaním a osteoporózou

Objasnenie potenciálnych mechanizmov podieľajúcich sa na regulácii expresie kľúčových génov pre SZ, osteoporózu a s ňou asociovanou sarkopéniou môže viesť k stanoveniu nových cieľov v liečbe pacientov s týmito ochoreniami. Svoju pozornosť sme sa rozhodli upriamiť na mikroRNA (miRNA), relatívne malú skupinu recentne identifikovaných regulátorov expresie mnohých génov. Využitie súčasných vedomostí o profile miRNA za účelom lepšej charakteristiky patofyziológie komorbidít SZ, osteoporózy a sarkopénie umožní predpovedať nové miRNA, prípadne aj určiť špecifické miRNA asociované s osteoporózou, čím by sa zvýšila úroveň a presnosť určenia progresie ako aj liečby. Vďaka odolnosti miRNA voči extracelulárnej enzymatickej degradácii v krvi a jej jednoduchej a reprodučibilnej detekcii by sa dalo vytvoriť špecifické portfólio miRNA, za účelom stanovenia profilov cirkulujúcej miRNAs (c-miRNA) ako biomarkera pri rôznych typoch ochorení a liečby SZ a osteoporózy pomocou využitia metódy miRNA špecifickej real time polymerase chain reaction (RT PCR).

Génová transkripcia a translácia sú východiskové fázy adaptácie ľudského tela na fyziologické aj patofyziologické stavy, ktoré určujú zmeny v hladinách a aktivite mnohých proteínov a hormónov. Identifikácia miRNA na začiatku roka 1990 odhalila novú úroveň komplexity transkripčnej a translačnej regulácie [14]. Malé nekódujúce molekuly RNA, nazývané mikroRNA (miRNA), regulujú post-transtranskripčne génovú expresiu väzbou na mRNA a spôsobuje jej degradáciu, alebo inhibujú transláciu cieľných transkriptov. Rastúci počet dôkazov naznačuje, že miRNA ovplyvňujú veľký počet procesov a zohrávajú rozhodujúcu úlohu nielen v bunkovej diferenciácii, proliferácii a apoptóze, ale tiež ovplyvňujú zloženie extracelulárnej matrix a udržiavajú procesy homeostázy akejkoľvek bunky, tkaniva a orgánu [15].

Presný mechanizmus cielenia a aktivácie miRNA stále nie je úplne preskúmaný. Jeden gén môže byť regulovaný viacerými miRNA a podobne môže jedna miRNA regulovať viac cieľových génov, ktoré sú často zoskupené do špecifickej biologickej dráhy [15].

Podobne ako iné regulačné molekuly, expresia miRNA sa často mení počas vývoja ochorenia. Pretože

miRNA gény majú schopnosť riadiť proliferáciu a apoptózu bunky a nachádzajú sa vo fragilných častiach genómu, ich deregulácia môže významne prispieť k rozvoju proliferatívnym ochorení [16,17]. Sú už dostupné viaceré testy, využívajúce miRNA ako biomarkery v klinickej diagnostike [18]. Doteraz bolo publikovaných len 163 článkov týkajúcich sa miRNA a osteoporózy (PubMed.gov 30. 11. 2017), prvý bol publikovaný v roku 2008, v r. 2017 bolo zatiaľ vydaných 34 článkov. O srdcovom zlyhaní a miRNA bolo vydaných 812 článkov, z toho 125 v roku 2017. Samozrejme len malá časť bola zameraná na ľudí a ešte menší počet predstavovali cielené klinické štúdie.

Pri osteoporóze môžu miRNA, krátke, nekódujúce RNA, ovplyvňovať tak vývoj osteoblastov/tvorbu kosti, ako aj vývoj osteoklastov/resorpciu kosti [19]. Posttranskripčná regulácia osteoblastogenézy pomocou miRNA môže ovplyvniť expresiu RUNX2 (napr. MiR-34c, miR-133a, miR-135a, miR-137, miR-205, miR-217, miR-338, miR-23a, miR-30c, miR-204/211, miR-103a) a Osterix (OSX) (napr. MiR-31, miR-93, miR-143, miR-145, miR-637, miR-214). Taktiež expresia génov pre kolagén typu I môže byť ovplyvnená miRNA (napr. MiR-29, miR-Let7)[20]. Aj keď účasť miRNA v osteoklastogenéze nebola doteraz dostatočne preskúmaná, zistilo sa, že miR-155, miR-223, miR-124, miR-21, miR-29 a miR-503 môžu ovplyvniť diferenciáciu a dozrievanie osteoklastov priamou, alebo nepriamou inhibíciou/upreguláciou [21,22]. Okrem toho sa dokázal podiel miR-125b, miR-26a, 12 miR-133 a miR-135 na diferenciácii osteoblastov. Skupina miR-29 zahŕňa miR-29a, miR-29b a miR-29c. Existujú dva druhy miR-29b – miR-29b-1 a miR-29b-2. Molekula miR-29a bola prvýkrát objavená v bunkách rakoviny krčka maternice (HeLa). Molekula miR-133a sa spočiatku považovala za miRNA špecifickú pre svaly, ktorá sa podieľa na regulácii diferenciácie svalových buniek a patogenéze myogénnych ochorení a ochorení srdca [20]. Všetky uvedené miRNA boli tiež skúmané v poslednom desaťročí v rámci patofyziológie regulácie srdcového zlyhania.

Súčasný poznatky o reakcii krvných profilov c-miRNA na rôzne druhy ochorení (viac ako 3 000 článkov od roku 2003), ako aj odolnosť c-miRNA voči extracelulárnej enzymatickej degradácii a ich jednoduchá a reprodukovateľná detekcia z nich robia perspektívny biomarker. O tejto možnosti sa pri osteoporóze začalo diskutovať len veľmi nedávno [23].

Literatúra

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB et al. Heart disease and stroke statistics – 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125(1): e2–e220.
2. Tanko LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, McNabb MA, Cummings SR. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral re-*

- search: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 2005;20(11):1912–1920.
3. van Diepen S, Majumdar SR, Bakal JA, McAlister FA, Ezekowitz JA. Heart failure is a risk factor for orthopedic fracture: a population-based analysis of 16,294 patients. *Circulation* 2008; 118(19):1946–1952.
 4. Frost RJ, Sonne C, Wehr U, Stempfle HU. Effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in congestive heart failure. *European journal of endocrinology* 2007;156(3):309–314.
 5. Sennerby U, Melhus H, Gedeberg R, Byberg L, Garmo H, Ahlbom A et al. Cardiovascular diseases and risk of hip fracture. *Jama* 2009; 302(15):1666–1673.
 6. Carbone L, Buzkova P, Fink HA, Lee JS, Chen Z, Ahmed A et al. Hip fractures and heart failure: findings from the Cardiovascular Health Study. *European heart journal* 2010;31(1):77–84.
 7. Gerber Y, Melton LJ, 3rd, Weston SA, Roger VL. Osteoporotic fractures and heart failure in the community. *The American journal of medicine* 2011;124(5):418–425.
 8. Lyons KJ, Majumdar SR, Ezekowitz JA. The unrecognized burden of osteoporosis-related vertebral fractures in patients with heart failure. *Circulation Heart failure* 2011;4(4):419–424.
 9. Majumdar SR, Ezekowitz JA, Lix LM, Leslie WD. Heart failure is a clinically and densitometrically independent risk factor for osteoporotic fractures: population-based cohort study of 45,509 subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012;97(4): 1179–1186.
 10. Mazziotti G, Baracca M, Doga M, Porcelli T, Vescovi PP, Giustina A. Prevalence of thoracic vertebral fractures in hospitalized elderly patients with heart failure. *European journal of endocrinology* 2012; 167(6):865–872.
 11. Pfister R, Michels G, Sharp SJ, Luben R, Wareham NJ, Khaw KT. Low bone mineral density predicts incident heart failure in men and women: the EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) – Norfolk prospective study. *JACC Heart failure* 2014;2(4): 380–389.
 12. Bekfani T, Pellicori P, Morris DA, Ebner N, Valentova M, Steinbeck L et al. Sarcopenia in patients with heart failure with preserved ejection fraction: Impact on muscle strength, exercise capacity and quality of life. *International journal of cardiology* 2016;222:41–46.
 13. McFarlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, Bahtiyar G, Sowers JR. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boded arteries, is there a link? *Endocrine* 2004;23(1):1–10.
 14. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843–854.
 15. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136(2):215–233.
 16. Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *Rna* 2008;14(1):35–42.
 17. Pencheva N, Tavazoie SF. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nature cell biology* 2013;15(6): 546–554.
 18. Meiri E, Mueller WC, Rosenwald S, Zepeniuk M, Klinke E, Edmonston TB et al. A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin. *The oncologist* 2012;17(6):801–812.
 19. Jing D, Hao J, Shen Y, Tang G, Li ML, Huang SH et al. The role of microRNAs in bone remodeling. *International journal of oral science* 2015;7(3):131–143.
 20. Nugent M. MicroRNAs and Fracture Healing. *Calcified tissue international* 2017;101(4):355–361.
 21. Liu T, Qin AP, Liao B, Shao HG, Guo LJ, Xie GQ et al. A novel microRNA regulates osteoclast differentiation via targeting protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *Bone* 2014;67:156–165.
 22. Sugatani T, Hildreth BE 3rd, Toribio RE, Malluche HH, Hruska KA. Expression of DGCR8-dependent microRNAs is indispensable for osteoclastic development and bone-resorbing activity. *Journal of cellular biochemistry* 2014;115(6):1043–1047.
 23. Kumar S, Vijayan M, Bhatti JS, Reddy PH. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Progress in molecular biology and translational science* 2017;146:47–94.