خلاصة أطروحة طالبة الدكتوراه: نوال خنطيل جبار/ كلية التربية/ قسم الكيمياء

MicroRNA- as Biomarker of Oxidative Stress-Mediated Apoptosis and Cytokines Release in Pathogenesis of Type II Diabetic Nephropathy in Iraqi Patients

Abstract

Diabetic nephropathy is the most common and prevalent complication of diabetes mellitus. Persistent hyperglycemia was induced oxidative stress, leading to inflammation, cell damage and death by apoptosis.

Recent evidences have been demonstrated that microRNA is involved in the development of diabetic nephropathy. However, the role of microRNA in regulation of oxidative stress, inflammation and apoptosis during diabetic nephropathy still unclear. The aim of this study was to determine in vivo the role of the serum microRNA-146a and microRNA-29b in pathogenesis of diabetic nephropathy.

The study was performed from January 2017 to June 2018. Ninety subjects were enrolled in this study, sixty patients (thirty patients with type 2 diabetes mellitus, thirty patients with diabetic nephropathy) and thirty subjects appeared normal healthy persons as control group. All laboratory tests analysis was performed in Diwaniyah teaching hospital and the clinical chemistry research lab, college of medicine, university of Al- Qadisiyah.

A blood sample (5 ml) was taken from each subject, 1ml blood was used for messenger RNA expression by Real-Time quantitative polymerase chain reaction, serum was obtained from the 4 ml blood for biochemical analysis.

Oxidative stress biomarkers such as serum reactive oxygen species level was measured by enzyme-linked immune sorbent assay. Advanced oxidation of protein

product, antioxidant enzyme activities such as catalase, and superoxide dismutase as indirect markers of oxidative stress were measured spectrophotometry. Levels of serum pro- and anti-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- alpha and interlukine-10 were measured to investigate the inflammatory response by using enzyme-linked immune sorbent assay. Additionally, caspase-3 as apoptotic biomarker was measured by enzyme-linked immune sorbent assay technique. Real-Time quantitative polymerase chain reaction was applied to measure mRNAs gene expression for nuclear factor kappa- B cells, B-cell lymphoma 2 as anti- apoptotic markers as well as serum microRNA expression like microRNA -146a and microRNA -29b.

A significant difference was observed in the levels of fasting plasma glucose, glycated hemoglobin, blood pressure, creatinine, blood urea, and serum albumin concentration in diabetic nephropathy compared to type 2 diabetes mellitus and control groups ($P < 0.05$). Altered lipid metabolism characterized by higher value of serum triglyceride, total cholesterol in diabetic nephropathy, then diabetic group significantly compared to control group ($P \leq 0.05$). Results were clearly showed an increase in level of reactive oxygen species in patient groups compared to control group ($P \leq 0.05$). Advanced oxidation of protein product level was significantly higher in diabetic nephropathy group compared to diabetic and control groups ($P \leq 0.05$).

Increased oxidative stress was stimulated cytokines, tumor necrosis factor- alpha and interlukine-10 release which significantly increased in diabetic nephropathy group compared to type 2 diabetic and control groups ($P \leq 0.05$) and induced apoptosis which was shown by higher levels of caspase-3 in diabetic nephropathy compared to diabetic and control groups ($P \leq 0.05$). Quantification analysis of gene expression by Real-Time quantitative polymerase chain reaction was indicated a significant

increase in Nuclear factor kappa- B cells and down regulation of B-cell lymphoma 2 gene expression in diabetic nephropathy compared to diabetic and control groups ($P \leq 0.05$). A positive correlation between caspase-3 and advanced oxidation protein products, and negative correlation between catalase and advanced oxidation of protein product were recorded in this study.

An investigation was carried out into the role microRNA-146a and 29b in metabolic changes in diabetic nephropathy and type 2 diabetic groups compared to control. The results showed a significant decrease in serum microRNA -146a expression level, while an increase in serum microRNA -29b expression level was observed in diabetic nephropathy group compared to control group. MicroRNA -146a was negatively correlated with Glycated hemoglobin and positively correlated with Superoxide dismutase. MicroRNA-29b was negatively correlated with antiapoptotic B-cell lymphoma 2.

In conclusion, these findings may go some way towards explaining that numerous pathway were involved in diabetic complication such as hyperglycemia-mediated oxidative stress that initiated inflammation and induced apoptosis, these changes may reflect effects on specific genes expression that may play an essential role in the developing a therapeutic approach to diabetic nephropathy pathogenesis.

Examination Committee Certification

We chairman and members of the discussion committee, certify that we have studied this thesis " *MiRNA- as Biomarker of Oxidative Stress-Mediated Apoptosis and Cytokines Release in Pathogenesis of type II Diabetic Nephropathy in Iraqi Patients* " presented by the student (***Nawal Khinteel Jabbar***) and examined her in its contents and that, we have found its worthy to be accepted for the ***Degree of Doctorate philosophy in chemistry / biochemistry*** with (Excellent).

Signature:
Name: **Prof. Dr. Ferdous Abbas Jabir**
College of Medicine/ University of Al-Qadisiyah
(Chairperson)
Date: 16 / 1 / 2019

Signature:
Name: **Prof. Dr. Ahmed Mousa Issa**
College of Medicine / University of Jabir ibn Hayyan
(Member)
Date: 15 / 1 / 2019

Signature:
Name: **Prof. Dr. Shoroq Mohammed Abas**
College of Medicine /University of Al-Qadisiyah
(Member)
Date: 14 / 1 / 2019

Signature:
Name: **Asst. Prof. Dr. Hanaa Addai Ali**
College of Science / University of Kufa
(Member)
Date: 15 / 1 / 2019

Signature:
Name: **Asst. Prof. Dr. Mustafa Taha Mohammed**
College of Science / University of Al-Mustansiriyah
(Member)
Date: 16 / 1 / 2019

Signature:
Name: **Asst. Prof. Dr. Anwar Jasib Almzaiel**
College of Medicine/ University of Al-Qadisiyah
(Supervisor)
Date: 16 / 1 / 2019

I have certified upon the discussion of the examining committee

Signature:
Name: Prof. **Dr. Khalid Jawad Al-Adilee**
Address: Dean of the College of Education
University of Al-Qadisiyah
Date: 20 / 1 / 2019

المعلمة الجزيئية ـ كمؤشر بيولوجي للإجهاد التأكسدي- المسبب لموت الخلايا المبرمج وتحرير الحركيات الخلوية المساهمة في تطور أمراضية اعتلال الكلى في مرض السكري من النوع الثاني لدى المرضى العراقيين

الخلاصة

اعتلال الكلية السكر (DN) هو أكثر المضاعفات شيوعا وانتشارا لمرض السكري (DM) .ارتفاع السكر المستمر يحفز الإجهاد التأكسدي ، مما يؤدي إلى الالتهابات ، تلف الخلايا وموتها من خلال الموت المبرمج. اثبتت الأدلة الأخيرة أن microRNA تساهم في تطور اعتلال الكلية السكري، ومع ذلك فإن دور ال microRNA في تنظيم الإجهاد التأكسدي والالتهاب وموت الخلايا المبرمج أثناء الاعتلال الكلوي السكري لا يزال غير واضح. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد دور الـmicroRNA-146a و microRNA-29b في مصل الدم وعلاقته بالاعتلال الكلوي.

شملت الدراسة 60 مريضا (30 مريضا يعانون من السكري النوع الثاني، و30 مريضا يعانون الاعتلال الكلوي السكري) و30 من الأشخاص الأصحاء كمجموعة سيطرة. أخذت عينة دم (5 مل) من كل المجاميع، تم اخذ (1 مل) من الدم لاجراء qPCR، وعزل السيرم من الدم المتبقي لغرض التحاليل البيوكيميائية مثل المؤشرات الحيوية للتأكسد مثل (ROS) بواسطة الاليزا. الأكسدة المتقدمة للبروتين (AOPP)، انزيمات مضادات الأكسدة مثل الكاتاليز(CAT) والسوبراوكسايددسمتيز (SOD)كمؤشرات غير مباشرة تمثل مستوى الإجهاد التأكسدي من خلال قياس الطيف الضوئي. كما تم قياس مستويات السيتوكينات في مصل الدم المحفزة والمضادة للالتهابات مثل عامل نخر الورم- ألفا(TNF-α)، عامل الانترليوكين-10(IL-10) لمعرفة مستوى الاستجابة للالتهاب باستخدام تقنية الاليزا ، وكذلك مستوى الكازبيز-3(Cas-3) كمؤشر حيوي للموت المبرمج باستخدام تقنية الاليزا. تم استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل qPCR لتحديد التعبير الجيني لل NF-kB mRNA, Bcl-2 كمؤشرات حيوية مضادة لموت الخلايا المبرمج وكذلك التعبير الجيني لل miRNA-146a و miRNA-29b بواسطة تقنية RT-PCR.

لوحظ اختلاف معنوي في مستويات متوسط السكر الصائم (FPG) والهيموغلوبين السكري (HbA1c)، ضغط الدم، تركيز كل من الكرياتنين، اليوريا، والالبومين لمجموعات الاعتلال الكلوي السكري (DN) مقارنة السكري النوع الثاني (T2DM) ومجموعة السيطرة ($P < 0.05$). هناك تباين ملحوظ في

مستوى الدهون حيث وجد زيادة مستوى الدهون الثلاثية(TG)، ومستوى الكوليسترول (TC) لمصل الدم في مجموعتي الاعتلال الكلوي يليها مجموعة السكري مقارنة بمجموعة السيطرة (P <0.05).

أوضحت النتائج زيادة مستوى ROS في مجموعات المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة (P <0.05). مستوى اكسدة البروتين (AOPP) كان أعلى بشكل ملحوظ في مجموعة الاعتلال الكلوي السكري من مجموعة السكري النوع الثاني ومجموعة السيطرة (P <0.05). ارتفاع الجهد التأكسدي حفز تحرير السيتوكينات الالتهابية TNF-α وIL-10 والتي ازدادت بصورة معنوية في مجموعة الاعتلال الكلوي مقارنة بمجموعة السكري ومجموعة السيطرة (P <0.05) والتي بدورها حفزت موت الخلايا الذي تبين من خلال زيادة تركيز انزيم Caspase-3 في مجموعة الاعتلال الكلوي مقارنة بمجموعتي السكري النوع الثاني والسيطرة (P <0.05).

التحليل الكمي للتعبير الجيني بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (RT-PCR) اظهر تعبيرا معنويا عاليا لNF-kB وانخفاض التعبير الجيني ل من Bcl-2 في مجموعة الاعتلال الكلوي مقارنة مع مجموعة السكري ومجموعة السيطرة (P <0.05). أظهرت الدراسة وجود علاقة إيجابية لمعامل الارتباط بين Caspase-3 وAOPP، بينما يوجد معامل ارتباط سلبي بين CAT و.AOPP

من خلال الدراسة الحالية يتبين دور miRNA-146a و miRNA29b في التغييرات الأيضية في DN و T2DMمقارنة بمجموعة السيطرة. أظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً في مستوى التعبير المصلي ل miRNA-146a, في حين لوحظ زيادة في مستوى التعبير المصلي ل miRNA-29b في مجموعة DN مقارنة بمجموعة التحكم. هناك معامل ارتباط سلبي للmiRNA-146a مع HbA1c ومعامل ارتباط إيجابي معSOD .بينما هناك معامل ارتباط سلبي لل MiRNA-29b مع Bcl-2والالبومين.

يمكن أن نستنتج من هذه النتائج أن العديد من المسارات الحيوية لها دور في المضاعفات السكرية مثل الإجهاد التأكسدي الناتج عن ارتفاع السكر والذي يكون سببا للالتهابات والتي بدورها تحفز الموت الخلايا، هذه التغيرات ربما ينعكس تأثيرها على التعبير لجينات معينة الذي قد ساهم ويلعب دورا أساسيا في تطور السبل الدوائية في مرضية الاعتلال الكلوي السكري.

المشرف

أ. م. د. انوار جاسب ثعبان
كلية الطب / جامعة القادسية