

**lek. KAROLINA KONIECZNAK**, Klinika Chorób Wewnętrznych, Nefrologii i  
Dializoterapii WIM-PIB

**Promotor:** prof. dr hab. n. med. Stanisław Niemczyk

**Promotor pomocniczy:** dr hab. n. med. Aleksandra Rymarz

## **Ocena znaczenia wybranych cząsteczek microRNA w diagnostyce nefropatii IgA**

### **STRESZCZENIE**

MicroRNA (miRNA) to endogenne, niekodujące RNA, które składają się z nukleotydów w liczbie od 21 do 25, a ich sekwencja jest wysoce konserwatywna wśród gatunków zwierząt. Cząsteczki microRNA są ważnymi regulatorami ekspresji genów. Hamują translację lub doprowadzają do degradacji transkryptów docelowych genów, przez co oddziałują na proliferację i różnicowanie komórek, apoptozę oraz metabolizm komórkowy. Szacuje się, że do 30% genów kodujących białka jest regulowanych przez miRNA. W związku z tym ich rola ma niebagatelny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie organizmu, a zaburzenia związane z ich ekspresją mogą prowadzić do rozwoju wielu procesów patologicznych w organizmie. MicroRNA charakteryzuje się swoistością narządową oraz tkankową.

Badania prowadzone nad microRNA przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat wielu chorób, które mogą doprowadzić współczesną naukę do bardziej wnikliwego poznania ich etiologii, opracowania dokładniejszego sposobu monitorowania leczenia i prognozowania przebiegu poszczególnych chorób oraz opracowania skutecznej terapii. Swoiste narządowo microRNA oraz panele cząstek microRNA mogłyby stanowić doskonały, nieinwazyjny biomarker w diagnostyce chorób nerek.

### **Cel główny pracy**

Ocena znaczenia wybranych microRNA w diagnostyce nefropatii IgA oraz monitorowania skuteczności leczenia.

### **Cele szczegółowe**

1. Ocena ekspresji cząsteczek microRNA miR-146a, miR-155, miR-200b, miR-429 w osadzie moczu i we krwi.
2. Ocena zależności między ekspresją cząsteczek miRNA we krwi i w moczu a stężeniem IL-1beta, IL-6, IL-8, RANTES w surowicy krwi i w moczu.

3. Ocena zależności ekspresji microRNA od stopnia zaawansowania choroby oraz obrazu histopatologicznego wg klasyfikacji Oxfordzkiej i klasyfikacji wg Haasa.

## **Material i metody**

Badanie obserwacyjne, prospektywne z grupą kontrolną, przeprowadzone w populacji pacjentów będących pod opieką Kliniki Chorób Wewnętrznych, Nefrologii i Dializoterapii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie.

Do grupy badanej włączono pacjentów, którzy wyrazili świadomą, dobrowolną, pisemną zgodę oraz mieli powyżej 18 lat. Włączano chorych obu płci, którzy mieli rozpoznaną nefropatię IgA oraz którzy zostali zakwalifikowani do leczenia immunosupresyjnego wg schematu Pozziego. Natomiast do grupy kontrolnej rekrutowane były osoby bez chorób przewlekłych, w tym chorób nerek oraz z podejrzeniem choroby nerek. Do badania nie były rekrutowane pacjentki w ciąży, chorzy, w ciężkim stanie ogólnym, z przewlekłą niewydolnością serca NYHA III/IV, niewydolnością oddechową, niewydolnością wątroby, rozsiałym procesem nowotworowym, z klinicznymi objawami infekcji. Ponadto nie rekrutowano pacjentów, którzy wyrazili sprzeciw do udziału w badaniu, którzy nie wykazywali chęci współpracy oraz w przypadku grupy kontrolnej, nie włączano osób z chorobami przewlekłymi oraz chorobami nerek lub ich podejrzeniem,

Do grupy badanej zostało włączonych 27 pacjentów, 14 kobiet, 13 mężczyzn. Decyzja o wykonaniu diagnostycznej biopsji nerki była podejmowana u pacjentów z podejrzeniem choroby nerek. Następnie po analizie wyników biopsji, szczegółowo zapoznawano się z dokumentacją medyczną chorych, u których w badaniu histopatologicznym rozpoznano nefropatię IgA. Pacjentów, którzy zostali zakwalifikowani do leczenia immunosupresyjnego według wytycznych KDIGO z 2012 roku, przydzielano do grupy badanej. Analizę przeprowadzano dwukrotnie- w chwili włączenia, czyli przed rozpoczęciem leczenia immunosupresyjnego oraz po 6 miesiącach od włączenia do badania. Do grupy kontrolnej włączono 26 osób bez chorób przewlekłych, bez rozpoznanej choroby nerek i bez podejrzenia chorób nerek. Do grupy kontrolnej włączono 14 kobiet i 12 mężczyzn.

Od każdego chorego zebrano dokładny wywiad lekarski, przeprowadzono badanie przedmiotowe, analizę dokumentacji medycznej, dostępnych wyników badań laboratoryjnych oraz wyników badania histopatologicznego materiału uzyskanego dzięki diagnostycznej biopsji nerki. Osoby spełniające kryterium rozpoczęcia leczenia, oceniono wyjściowo i po 6 miesiącach. Osoby do grupy kontrolnej rekrutowano po wykluczeniu chorób nerek oraz dopasowywano pod względem wieku i płci do osób z grupy badanej. U każdego pacjenta

oznaczono parametry nerkowe (kreatynina, eGFR, mocznik), białkomocz dobowy, ekspresję wybranych cząsteczek microRNA we krwi i w moczu (miR-146a, miR-155, miR-200b, miR-429) oraz stężeni IL-1beta, IL-6, IL-8 oraz RANTES we krwi w moczu.

Badania laboratoryjne wykonane w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie. Oznaczenia ekspresji cząsteczek miRNA146, miRNA155, miRNA200b, miRNA429 oraz stężenia IL-1beta, IL-6, IL-8 oraz RANTES przeprowadzono w Pracowni Genetyki Zakładu Patomorfologii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie. Badania wykonano oznaczając ekspresję genów i SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Analiza statystyczna przeprowadzona została w programie Statistica 13.0. W przypadku zmiennych ilościowych podstawowe miary położenia i rozproszenia podane zostały jako średnia  $\pm$ SD, mediana i zakres. Zgodność rozkładu zmiennych ilościowych z rozkładem normalnym sprawdzono za pomocą testu Saphiro-Wilka. W przypadku zmiennych jakościowych podano rozkłady procentowe.

W związku z tym, że rozkład co najmniej jednej zmiennej nie był zgodny z rozkładem normalnym do weryfikacji postawionych w pracy hipotez zastosowano odpowiednio test

U-Manna-Whitneya w przypadku zmiennych niepowiązanych lub par Wilcoxon'a w przypadku zmiennych powiązanych. Do zbadania kierunku i siły korelacji pomiędzy zmiennymi wyznaczono współczynnik korelacji rang Spearmana. Poziom istotności statystycznej przyjęto równy 0.05.

## **Wyniki**

Grupę badaną stanowiło 27 pacjentów, wśród których było 14 kobiet (51.9%) i 13 mężczyzn (48.1%). Średnia wieku wynosiła  $39.8 \pm 12.5$  lat, mediana 38 lat, przedział wiekowy od 21 do 64 lat. W grupie tej 20 chorych (74.1%) miało nadciśnienie tętnicze. Na cukrzycę typu 2 chorowało 3 (11.1%) pacjentów. U 23 osób (85.2%) stosowano leczenie nefroprotecyjne, przy czym 19 pacjentów (82.6%) przyjmowało ACEI, a 4 pacjentów (17.4%) przyjmowało ARB.

U wszystkich chorych w badaniu ogólnym moczu stwierdzano krwinkomocz. Ponadto białkomocz nerczycowy ( $>3000$  mg/24h) obserwowano u 5 pacjentów (18.5%), u 22 (77.8%) występował białkomocz subnerczycowy. U jednego z pacjentów (3.7%) dobowy proteiniuria wyjściowo nie została oznaczona. Zachowaną funkcję nerek (eGFR $>90$ ) stwierdzono u 17 osób (63%). Do grupy kontrolnej włączono 26 osób bez chorób przewlekłych w wywiadach, w tym bez chorób nerek oraz bez podejrzenia choroby nerek. Zrekrutowanych zostało 14 kobiet

(53,85%) i 12 mężczyzn (46,15%). Średnia wieku w grupie kontrolnej wynosiła 40,38. Grupa badana i grupa kontrolna nie różniły się istotnie między sobą pod względem płci i wieku.

Średnia liczba kłębuszków pobranych w trakcie DBN wynosiła  $15.3 \pm 7.1$ , mediana 14.5. Najmniejsza liczba pobranych kłębuszków wynosiła 6, największa 35. Średnia liczba kłębuszków stwardniałych w całości wynosiła  $3.9 \pm 2$ , mediana 5, najmniejsza liczba stwardniałych kłębuszków 0 największa 24. Średni odsetek stwardniałych kłębuszków wynosił  $24.7 \pm 23.4\%$ , mediana 15,1%, zakres od 0% do 85,7%. Analizując klasyfikację zmian morfologicznych w przebiegu IgA-N według Haasa, najczęściej stwierdzano klasę III (ogniskowy rozplam w kłębuszkach), która była obecna w biopsjach nerek 10 pacjentów (37%). Klasa IV (rozlany rozplam w kłębuszkach) obecna była u 8 pacjentów (29.6%). Klasa V (twardnienie > 40% kłębuszków lub włóknienie >50% powierzchni kory) obecna była u 4 pacjentów (14.8%). Zmiany morfologiczne odpowiadające klasie I (ogniskowa proliferacja mezangium) stwierdzono u 1 pacjenta (3.7%). Natomiast wynik badania histopatologicznego nerki u 4 chorych (14.8%) pacjentów nie zawierał analizy klasyfikacji według Haasa.

Porównując wyniki badań laboratoryjnych u grupy badanej z grupą kontrolną stwierdzono istotną statycznie różnicę w stężeniach kreatyniny pomiędzy grupami. Grupa kontrolna miała istotnie statystycznie niższy poziom kreatyniny niż grupa badana. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w stężeniu mocznika w surowicy krwi pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.

W oznaczeniach wyjściowych istotną statycznie różnicę pomiędzy grupą kontrolną a badaną dla ekspresji cząsteczek miRNA we krwi stwierdzono dla cząsteczek miR-146a, miR-155 oraz miR-429. Podobnie w moczu- istotną statycznie różnicę w ekspresji pomiędzy grupą badaną a kontrolną stwierdzono dla cząsteczek miR-146a, miR-155 oraz miR-429. W oznaczeniach kontrolnych istotną statycznie różnicę pomiędzy grupą kontrolną a badaną dla cząsteczek miRNA we krwi stwierdzono dla miR-140a, miR-155 oraz miR-429. W moczu istotną statycznie różnicę pomiędzy grupą badaną a kontrolną stwierdzono dla miR-155, miR-200b oraz miR-249. Ponadto istotną statycznie różnicę stężenia cytokin otrzymano dla IL-1beta, IL-6, IL-8, RANTES zarówno w surowicy krwi jak i w moczu. W każdym przypadku stężenie IL-1beta, IL-6, IL-8 oraz RANTES było istotnie statystycznie niższe w grupie kontrolnej, niż w grupie badanej.

Analizując różnicę w ekspresji cząsteczek miRNA między oznaczeniami wyjściowymi a kontrolnymi stwierdzono dla cząsteczek miR-146a, miR-155 i miR-429. W każdym przypadku zaobserwowano istotny statycznie spadek ekspresji wyżej wymienionych cząsteczek miRNA. Podobnie, w przypadku stężenia cytokin zaobserwowano istotne

statystycznie obniżenie stężenia IL-1beta, IL-6, IL-8 oraz RANTES. W moczu istotną statystycznie zmianę ekspresji cząsteczek miRNA stwierdzono dla miR-146a, miR-155 i miR-200b. W każdym przypadku w badaniach kontrolnych zaobserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji cząsteczek miRNA. Stwierdzono również istotne statystycznie obniżenie stężenia IL-1beta w moczu, oraz istotny statystycznie wzrost stężenia IL-6 oraz RANTES w kontrolnych oznaczeniach. W oznaczeniach wykonanych przy włączeniu do badania, istotną statystycznie dodatnią korelację stwierdzono tylko pomiędzy ekspresją cząsteczki miR-146 we krwi i w moczu oraz pomiędzy stężeniem IL-6 w surowicy krwi i w moczu. Ponadto obserwowano istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy poziomem ekspresji cząsteczki miR-146a a stężeniem RANTES. W badaniach kontrolnych istotną statystycznie dodatnią korelację stwierdzono tylko pomiędzy stężeniem IL-beta1 w surowicy krwi i w moczu oraz stężeniem RANTES w surowicy krwi i moczu. Pomiedzy ekspresją wybranych cząsteczek microRNA we krwi i w moczu nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności.

W badaniach wyjściowych istotną statystycznie dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy poziomem ekspresji cząsteczki miR-146 a stężeniem IL-6 w surowicy krwi. Dodatkowo istotną statystycznie ujemną korelację stwierdzono pomiędzy poziomem ekspresji cząsteczki miR-146a a stężeniem RANTES w surowicy krwi. W badaniach wyjściowych pomiędzy wynikami oznaczeń wykonanych z moczu nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji. W badaniach kontrolnych istotną statystycznie dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy ekspresją cząsteczki miR-200b a stężeniem IL-6 oraz pomiędzy ekspresją cząsteczki miR-200b a stężeniem RANTES we krwi. Pomiedzy ekspresją cząsteczki miR-200b a stężeniem IL-8 stwierdzono ujemną silną, istotną statystycznie korelację. Ponadto stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy ekspresją cząsteczki miR-429 a stężeniem IL-8. W badaniach wykonanych w ramach kontroli, istotną statystycznie ujemną silną korelację stwierdzono pomiędzy ekspresją cząsteczki miR-146a a stężeniem IL-8 w moczu. Ponadto istotną statystycznie silną dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy ekspresją cząsteczki miR-146a a stężeniem RANTES w moczu. Pomiedzy ekspresją cząsteczki miR-155 a stężeniem IL-8 stwierdzono ujemną istotną statystycznie korelację. Ponadto istotną statystycznie dodatnią umiarkowaną korelację stwierdzono pomiędzy ekspresją cząsteczki miR-429 a stężeniem IL-8 w moczu.

Analizując ekspresję cząsteczek miRNA we krwi i w moczu w oznaczeniach wyjściowych, istotną statystycznie dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy stężeniem kreatyniny w surowicy krwi a ekspresją cząsteczki miR-200b w moczu. W oznaczeniach kontrolnych nie

stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją wybranych cząsteczek miRNA we krwi i w moczu a stężeniem kreatyniny w surowicy krwi.

Wyjściowo nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją wybranych cząsteczek miRNA a stopniem białkomoczu dobowego. Natomiast w oznaczeniach kontrolnych stwierdzono istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy stopniem dobowej utraty białka z moczem a ekspresją cząsteczki miR-146a.

Dodatkowo grupę badaną podzielono na grupy pod względem zmian morfologicznych opisanych w klasyfikacji według Hassa. W analizie statystycznej uwzględniono tylko grupę pacjentów z obecnością zmian w biopsji nerki o typie ogniskowego rozplemu w kłębuszkach nerkowych (III) oraz grupę pacjentów z obecnością zmian morfologicznych o typie rozlanego rozplemu w kłębuszkach nerkowych (IV). W pozostałych podgrupach była zbyt mała liczba pacjentów (klasa II – 1 pacjent i klasa V – 3 pacjentów). Istotną statystycznie różnicę pomiędzy uwzględnionymi grupami stwierdzono tylko przypadku stężenia IL-8 w moczu w oznaczeniach wyjściowych. Grupa pacjentów ze zmianami w klasie IV miała istotnie statystycznie niższe stężenie IL-8, niż grupa pacjentów ze zmianami morfologicznymi w klasie III.

## **Wnioski**

1. Obserwuje się wyższą ekspresję cząsteczek miR-146a, miR-155 i miR-429 zarówno we krwi, jak i w moczu u chorych z nefropatią IgA w stosunku do populacji osób zdrowych.
2. Ekspresja cząsteczek miR-146a, miR-155 i miR-429 ulega po leczeniu istotnemu spadkowi, wobec czego powyższe cząsteczki microRNA wydają się być dobrym wskaźnikiem służącym do oceny skuteczności leczenia nefropatii IgA.
3. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją badanych cząsteczek microRNA a zmianami morfologicznymi w biopsjach nerek ujętych w klasie Oxfordzkiej oraz w klasie wg Haasa.
4. Wyższa ekspresja badanych cząsteczek miRNA u pacjentów z nefropatią IgA, korelowała z wyższym stężeniem cytokin prozapalnych.
5. Pacjenci, u których stwierdzono homozygotę zmutowaną, mają większe prawdopodobieństwo zachorowania na nefropatię IgA.

## **SUMMARY**

### **The importance of selected microRNA molecules in the diagnosis of IgA nephropathy**

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous, non-coding RNAs that consist of 21 to 25 nucleotides, and their sequence is highly conserved among animal species. MicroRNAs are important regulators of gene expression. They inhibit translation or lead to the degradation of transcripts of target genes, thus affecting cell proliferation and differentiation, apoptosis and cell metabolism. It is estimated that up to 30% of protein-coding genes are regulated by miRNAs. Therefore, their role has a significant impact on the proper functioning of the body, and disorders related to their expression can lead to the development of many pathological processes in the body. MicroRNA is organ and tissue specific.

Research conducted on microRNA contributes to the broadening of knowledge about many diseases that can lead modern science to a more thorough understanding of their etiology, the development of a more accurate method of monitoring treatment and prognostication of the course of individual diseases, and the development of effective therapy. Organ-specific microRNAs and panels of microRNA particles could be an excellent, non-invasive biomarker for diagnosing kidney diseases.

#### **The aim of the study**

Evaluation of the importance of selected microRNAs in the diagnosis of IgA nephropathy and monitoring the effectiveness of treatment.

#### **Specific objectives**

1. Evaluation of the expression of microRNA molecules miR-146a, miR-155, miR-200b, miR-429 in urine and in blood.
2. Assessment of the relationship between the expression of miRNA molecules in the blood and urine and the concentration of IL-1beta, IL-6, IL-8, RANTES in the blood serum and urine.
3. Assessment of the dependence of microRNA expression on the stage of the disease and histopathological picture according to the Oxford classification and Haas classification.

## **Material and methods**

An observational, prospective study with a control group, conducted in the population of patients under the care of the Department of Internal Medicine, Nephrology and Dialysis of the Military Institute of Medicine in Warsaw.

The study group included patients who gave informed, voluntary, written consent and were over 18 years old. Patients of both sexes who had been diagnosed with IgA nephropathy and who were qualified for immunosuppressive treatment according to the Pozzi regimen were included. The control group consisted of people without chronic diseases, including kidney diseases, and with suspected kidney disease. Pregnant patients, patients in severe general condition, chronic heart failure NYHA III/IV, respiratory failure, liver failure, disseminated neoplastic process, with clinical signs of infection were not recruited for the study. Moreover, patients who expressed their opposition to participation in the study, who did not show willingness to cooperate, were not recruited, and in the case of the control group, people with chronic diseases and kidney diseases or their suspicion were not included,

The study group included 27 patients, 14 women and 13 men. The decision to perform a diagnostic kidney biopsy was made in patients with suspected kidney disease. Then, after analyzing the biopsy results, the medical records of patients diagnosed with IgA nephropathy in histopathological examination were reviewed in detail. Patients who were qualified for immunosuppressive treatment according to the KDIGO guidelines from 2012 were assigned to the study group. The analysis was carried out twice - at the time of inclusion, i.e. before the start of immunosuppressive treatment, and after 6 months from the inclusion in the study. The control group included 26 people without chronic diseases, without diagnosed kidney disease and without suspected kidney disease. The control group included 14 women and 12 men.

A detailed medical history was collected from each patient, a physical examination, analysis of medical documentation, available laboratory test results and the results of histopathological examination of the material obtained by diagnostic kidney biopsy were performed. People who met the criteria for starting treatment were assessed at baseline and after 6 months. People in the control group were recruited after excluding kidney diseases and matched in terms of age and sex to people from the study group. Renal parameters (creatinine, eGFR, urea), 24-hour proteinuria, expression of selected microRNA molecules in blood and urine (miR-146a, miR-155, miR-200b, miR-429) and concentrations of IL-1beta, IL-6, IL-8 and RANTES in blood and in urine.

Laboratory tests performed at the Laboratory Diagnostics Department of the Military Institute of Medicine in Warsaw. Determination of the expression of miRNA146, miRNA155,



miRNA200b, miRNA429 molecules and the concentration of IL-1beta, IL-6, IL-8 and RANTES was carried out in the Laboratory of Genetics, Department of Pathomorphology, Military Institute of Medicine in Warsaw. The tests were performed by determination of gene expression and SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Statistical analysis was carried out in the Statistica 13.0 program. For quantitative variables, the basic measures of position and dispersion are given as mean  $\pm$  SD, median and range. Compatibility of the distribution of quantitative variables with the normal distribution was checked using the Saphiro-Wilk test. For categorical variables, percentage distributions are given.

Due to the fact that the distribution of at least one variable was not consistent with the normal distribution, the hypotheses presented in the work were verified by the

U-Mann-Whitney for unrelated variables or Wilcoxon pairs for related variables. Spearman's rank correlation coefficient was determined to examine the direction and strength of correlations between the variables. The level of statistical significance was assumed equal to 0.05.

## **Results**

The study group consisted of 27 patients, including 14 women (51.9%) and 13 men (48.1%). The mean age was  $39.8 \pm 12.5$  years, median 38 years, age range from 21 to 64 years. In this group, 20 patients (74.1%) had arterial hypertension. 3 (11.1%) patients had type 2 diabetes. Twenty-three patients (85.2%) were on nephroprotective treatment, with 19 patients (82.6%) taking an ACEI and 4 patients (17.4%) taking an ARB.

Hematuria was found in all patients in the urinalysis. In addition, nephrotic proteinuria ( $>3000$  mg/24h) was observed in 5 patients (18.5%), 22 (77.8%) had subnephrotic proteinuria. In one patient (3.7%), 24-hour proteinuria was initially not determined. Preserved kidney function (eGFR $>90$ ) was found in 17 patients (63%). The control group included 26 people with no history of chronic diseases, including no kidney disease and no suspected kidney disease. 14 women (53.85%) and 12 men (46.15%) were recruited. The mean age in the control group was 40.38. The study group and the control group did not differ significantly in terms of sex and age.

The average number of glomeruli collected during DBN was  $15.3 \pm 7.1$ , median 14.5. The smallest number of glomeruli collected was 6, the largest 35. The average number of total glomeruli was  $3.9 \pm 2$ , median 5, the smallest number of glomeruli sclerosis was 0 the highest 24. The average percentage of glomeruli sclerosis was  $24.7 \pm 23.4\%$ , median 15.1%, range from

0% to 85.7%. Analyzing the classification of morphological changes in the course of IgA-N according to Haas, class III (focal glomerular proliferation) was most often found, which was present in the kidney biopsies of 10 patients (37%). Class IV (diffuse glomerular proliferation) was present in 8 patients (29.6%). Class V (sclerosis > 40% of the glomeruli or fibrosis > 50% of the cortical surface) was present in 4 patients (14.8%). Morphological changes corresponding to class I (focal mesangial proliferation) were found in 1 patient (3.7%). However, the histopathological examination of the kidney in 4 patients (14.8%) did not include the Haas classification analysis.

Comparing the results of laboratory tests in the study group with the control group, a statistically significant difference in creatinine concentrations between the groups was found. The control group had a statistically significantly lower creatinine level than the study group. There was no statistically significant difference in the concentration of urea in the blood serum between the study group and the control group.

In the initial assays, a statistically significant difference between the control group and the study group for the expression of miRNA molecules in the blood was found for miR-146a, miR-155 and miR-429 molecules. Similarly, in urine - a statistically significant difference in expression between the test group and the control group was found for miR-146a, miR-155 and miR-429 molecules. In control assays, a statistically significant difference between the control group and the study group for miRNA molecules in the blood was found for miR-140a, miR-155 and miR-429. In urine, a statistically significant difference between the study group and the control group was found for miR-155, miR-200b and miR-249. In addition, a statistically significant difference in the concentration of cytokines was obtained for IL-1beta, IL-6, IL-8, RANTES in both serum and urine. In each case, the concentration of IL-1beta, IL-6, IL-8 and RANTES was statistically significantly lower in the control group than in the study group.

By analyzing the difference in the expression of miRNA molecules between the baseline and control assays, miR-146a, miR-155 and miR-429 molecules were found. In each case, a statistically significant decrease in the expression of the above-mentioned miRNA molecules was observed. Similarly, in the case of cytokine concentrations, a statistically significant decrease in the concentration of IL-1beta, IL-6, IL-8 and RANTES was observed. In urine, a statistically significant change in the expression of miRNA molecules was found for miR-146a, miR-155 and miR-200b. In each case, a statistically significant decrease in the expression of miRNA molecules was observed in the control studies. A statistically significant decrease in the concentration of IL-1beta in the urine was also found, and a statistically significant increase in the concentration of IL-6 and RANTES in control tests. In the assays performed at the

inclusion in the study, a statistically significant positive correlation was found only between the expression of the miR-146 molecule in the blood and urine and between the concentration of IL-6 in the blood serum and in the urine. In addition, a statistically significant negative correlation was observed between the level of expression of the miR-146a molecule and the concentration of RANTES. In control studies, a statistically significant positive correlation was found only between the concentration of IL-beta1 in the blood serum and urine and the concentration of RANTES in the blood serum and urine. There were no statistically significant relationships between the expression of selected microRNA molecules in blood and urine.

In the initial studies, a statistically significant positive correlation was found between the expression level of the miR-146 molecule and the concentration IL-6 in blood serum. In addition, a statistically significant negative correlation was found between the level of expression of the miR-146a molecule and the concentration of RANTES in the blood serum. In baseline studies, no statistically significant correlations were found between urine tests. In control studies, a statistically significant positive correlation was found between the expression of the miR-200b molecule and the concentration of IL-6, and between the expression of the miR-200b molecule and the concentration of RANTES in the blood. There was a strong, statistically significant negative correlation between miR-200b expression and IL-8 concentration. In addition, a statistically significant positive correlation was found between the expression of the miR-429 molecule and the concentration of IL-8. In studies performed as a control, a statistically significant negative strong correlation was found between the expression of the miR-146a molecule and the concentration of IL-8 in the urine. In addition, a statistically significant, strong positive correlation was found between the expression of the miR-146a molecule and the concentration of RANTES in the urine. There was a statistically significant negative correlation between miR-155 expression and IL-8 concentration. In addition, a statistically significant positive moderate correlation was found between the expression of the miR-429 molecule and the concentration of IL-8 in the urine.

When analyzing the expression of miRNA molecules in the blood and urine in the baseline assays, a statistically significant positive correlation was found between the concentration of creatinine in the blood serum and the expression of the miR-200b molecule in the urine. In control assays, no statistically significant correlation was found between the expression of selected miRNA molecules in the blood and urine and the concentration of creatinine in the blood serum.

Initially, no statistically significant correlation was found between the expression of selected miRNA molecules and the degree of 24-hour proteinuria. However, in the control

assays, a statistically significant negative correlation was found between the degree of 24-hour urinary protein loss and the expression of the miR-146a molecule.

In addition, the study group was divided into groups in terms of morphological changes described in the Hass classification. The statistical analysis included only the group of patients with changes in the kidney biopsy of the focal glomerulonephritis type (III) and the group of patients with morphological changes of the diffuse glomerulonephritis type (IV). In the remaining subgroups, the number of patients was too small (class II - 1 patient and class V - 3 patients). A statistically significant difference between the groups was found only in the case of urinary IL-8 concentration in the baseline tests. The group of patients with lesions in class IV had a statistically significantly lower concentration of IL-8 than the group of patients with morphological lesions in class III.

## **Conclusions**

1. Higher expression of miR-146a, miR-155 and miR-429 molecules is observed both in blood and urine in patients with IgA nephropathy compared to the population of healthy people.
2. The expression of miR-146a, miR-155 and miR-429 molecules decreases significantly after treatment, therefore these microRNA molecules seem to be a good indicator for assessing the effectiveness of IgA nephropathy treatment.
3. No correlation was found between the expression of the studied microRNA molecules and morphological changes in kidney biopsies included in the Oxford class and in the Haas class.
4. Higher expression of the studied miRNA molecules in patients with IgA nephropathy correlated with a higher concentration of pro-inflammatory cytokines.
5. Homozygous mutant patients are more likely to develop IgA nephropathy.