

## Streszczenie w języku polskim

**Tytuł:** *Znaczenie wybranych mikroRNA w patogenezie miażdżycy tętnic szyjnych i ich potencjalna rola jako biomarkera powikłań miażdżycy*

**Autor:** Szymon Dawid Wnęk

Choroby naczyniowo-mózgowe są wiodącą przyczyną inwalidztwa na świecie. Śmiertelność z powodu schorzeń mózgowo-naczyniowych zajmuje trzecie miejsce po zaburzeniach sercowo-naczyniowych oraz chorobach nowotworowych. Przyczyną znaczącej liczby udarów niedokrwiennych w mózgowiu są zwężenia w tętnicach przedczaszkowych, najczęściej na podłożu procesu miażdżycowego toczącego się rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej i w początkowym odcinku tętnicy szyjnej wewnętrznej. Następstwem istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej są uogólnione zaburzenia przepływu mózgowego udokumentowane w różnych badaniach obrazowych mózgowia. Również asymptomatyczna stenoza tętnic szyjnych u osób, u których nigdy wcześniej nie występowały neurologiczne objawy niedokrwienia tkanki nerwowej nasila ryzyko udaru mózgu. Wykrycie takiej stenozy stwarza choremu szansę na włączenie właściwego leczenia chirurgicznego i w efekcie obniżenie ryzyka zawału tkanki mózgowej. Pomimo możliwości zastosowania nieinwazyjnych badań angio-neurologicznych obrazujących morfologię zmian miażdżycowych w ścianach tętnic szyjnych i ich hemodynamiczne efekty przepływu, metody te nie pozwalają ocenić metabolicznego efektu wpływu jednostronnego, istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej na poziom niewydolności krążenia mózgowego, co przekłada się na mniejszą aktywność biologiczną neuronów i prowadzi do przewlekłego pogorszenia funkcji tkanki nerwowej, co oprócz zwiększonego ryzyka śmiertelnych udarów, może np. warunkować gorszą sprawność procesów poznawczych u pacjentów, zwłaszcza w starszym wieku.

Z tego powodu podejmowane są dalsze próby opracowania przesiewowych testów diagnostycznych, mogących mieć zastosowanie w rutynowej praktyce klinicznej celem oceny stopnia zaawansowania tkankowych zaburzeń metabolicznych w grupie pacjentów z bezobjawowym zwężeniem w obrębie tętnic szyjnych. W ostatnim czasie, „płynna biopsja” jako innowacyjna metoda stanowi przełom w diagnostyce nowotworów i rewolucjonizuje dotychczasowe metody badań diagnostycznych. Jest to nieinwazyjna metoda, która pozwala na wykrywanie biomarkerów molekularnych, tym samym, dostarcza wielu informacji o chorobie, jej aktywności oraz stopniu zaawansowania. Polega na analizie krążącego materiału genetycznego pochodzenia nowotworowego, wyizolowanego z krwi obwodowej

pacjentów. Pomimo istniejących doniesień wskazujących na możliwość skutecznego zastosowania „płynnej biopsji” do diagnostyki nowotworów przed pojawieniem się objawów chorobowych, ewentualna perspektywa zastosowania metody „płynnej biopsji” detekcji chorób innych niż nowotworowe, również w ich asymptotycznej fazie, pozostaje niewyjaśniona.

Dlatego celem rozprawy było ustalenie zmian ekspresji wybranych wewnątrzkomórkowych czynników genetycznych w postaci jednoniciowych cząsteczek RNA, tzw. mikroRNA, oraz białkowych substancji zewnątrzkomórkowych rozpuszczonych we krwi u asymptotycznych pacjentów, u których wykryto istotne zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej i następnie poddano ich jednostronnej endarterektomii. W takim modelu badawczym możliwe było oszacowanie efektu wpływu jednostronnego, istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej oraz efektu wpływu jednostronnego operacyjnego udrożnienia zwężonej istotnie tętnicy szyjnej wewnętrznej na wybrane genetyczne i metaboliczne czynniki, mogące posłużyć w przyszłości jako swoiste biomarkery wykrywane metodą „płynnej biopsji” u pacjentów z asymptotyczną stenozą tętnic szyjnych.

Przedstawiona dysertacja jest raportem opisującym wstępne wyniki badania do którego włączono 48 pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej o charakterze bezobjawowym leczonych w Klinice Chirurgii Naczyniowej i Angiologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie za pomocą zabiegu endarterektomii. Od wszystkich chorych pobrano krew obwodową bezpośrednio przed rozpoczęciem operacji a następnie w trzecim miesiącu po zakończonym zabiegu endarterektomii w celu izolacji subpopulacji komórek jednojądrzastych oraz osobno erytrocytów i trombocytów, które poddawano szczegółowej analizie molekularnej, obejmującej: a) poziomy ekspresji wybranych mikroRNA w komórkach jednojądrzastych krwi; b) poziomy ekspresji tożsamych sekwencji mikroRNA w pobranych blaszkach miażdżycowych oraz porównawczo w niezmięnionej miażdżycowo tętnicy; c) poziomy ekspresji osoczowych czynników białkowych o właściwościach angio-protekcyjnych i regulujących homeostazę naczyniową tkanki łącznej; d) profil aktywności enzymatycznej antyoksydantów komórkowych oraz stężenie glutationu zredukowanego osobno w populacji erytrocytów oraz trombocytów.

Stwierdzono, że istotne hemodynamicznie zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej związane było ze znamienym statycznie wzrostem poziomu ekspresji następujących mikroRNA wewnątrzkomórkowych: miR-21-3p, miR-134-5p, miR-296-5p, miR-122-5p, miR-150-5p,

miR-27a-5p, miR-34-5p oraz miR-223-3p. Ponadto, w tej samej grupie pacjentów zaobserwowano istotne obniżenie poziomu ekspresji następujących mikroRNA wewnątrzkomórkowych: miR-23a-3p, miR-30b, miR-16-5p. Równolegle stwierdzono, że blaszki miażdżycowe w porównaniu do niezmiętej ściany tętnicy miały istotnie podwyższony poziom ekspresji następujących mikroRNA: miR-9-5p, miR-126-3p, miR-134-5p, miR-296-5p, miR-122-5p, miR-126-5p, miR-133b, miR-150-5p, miR-17-3p, miR-17-5p. Natomiast poziom ekspresji był znamienne statystycznie obniżony w przypadku następujących mikroRNA: miR-23a-3p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-223-3p. Analiza ekspresji osoczowych czynników angio-protekcyjnych wykazała że zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej związane było ze znamieniem statycznie obniżeniem stężenia w przypadku EGF, FGF-beta oraz BMP-2 i Interleukiny-6. Również stężenie obu badanych metaloproteinaz (MMP-1 i MMP-3) było regulowane istotnie w dół u pacjentów przed operacyjnym usunięciem blaszki miażdżycowej w celu udrożnienia tętnicy szyjnej wewnętrznej. Żaden z osoczowych czynników angio-protekcyjnych nie wykazywał zwiększonej ekspresji u pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej

Wykazano także, że w erytrocytach krążących we krwi obwodowej pobranej przed zabiegiem operacyjnym usunięcia blaszki miażdżycowej był istotnie obniżony poziom aktywności takich antyoksydantów jak: CAT i SOD oraz stężenie zredukowanego glutationu. Interesujący jest fakt, że poziom aktywności enzymatycznej reduktazy glutationowej był istotnie podwyższony w erytrocytach u tej grupy pacjentów. Równolegle, w płytkach krwi krążących we krwi obwodowej pobranej przed zabiegiem operacyjnym usunięcia blaszki miażdżycowej był istotnie obniżony poziom aktywności takich antyoksydantów jak: CAT, SOD i GSH oraz reduktazy glutationowej a także stężenie zredukowanego glutationu. Żaden z enzymów odpowiedzialnych za obronę antyoksydacyjną w erytrocytach oraz płytkach krwi nie wykazywał zwiększonej aktywności enzymatycznej u pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej.

Na podstawie całokształtu uzyskanych wstępnych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

- 1) Ekspresja licznych sekwencji mikroRNA regulujących poziom aktywności transkrypcyjnej wielu genów w populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej jest

istotnie zależna od stenozы tętnic szyjnych w okresie bezobjawowym choroby miażdżycowej.

2) Asymptomatyczne zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej jest związane głównie ze znamienym obniżaniem poziomów osoczowych czynników angio-protekcyjnych i regulujących homeostazę naczyniowej tkanki łącznej.

3) Asymptomatyczne zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej jest związane głównie ze znamienym obniżaniem poziomów aktywności enzymów odpowiedzialnych za obronę antyoksydacyjną w krążących erytrocytach i trombocytach u pacjentów przed zabiegiem usunięcia blaszki miażdżycowej.

4) Wyniki badań wskazują, że istotna stenozа tętnicy szyjnej wewnętrznej jako głównego źródła krwi dla tkanki mózgowej może indukować określone zmiany transkryptomu i metabolomu w subpopulacjach komórek krwi oraz w osoczu krwi krążącej u pacjentów asymptomatycznych, co może przyczynić się w przyszłości do rozwoju nieinwazyjnych metod diagnostycznych opartych na „płynnej biopsji” z krwi w tej wybranej grupie pacjentów.

## **Streszczenie w języku angielskim**

Tytuł: The importance of selected microRNAs in the pathogenesis of carotid atherosclerosis and their potential role as a biomarker of atherosclerosis complications

Autor: Szymon Dawid Wnęk

Cerebrovascular diseases are the leading cause of disability worldwide. Mortality due to cerebrovascular diseases ranks third after cardiovascular disorders and cancer. The cause of a significant number of ischemic strokes in the brain are stenoses in the precranial arteries, most often due to the atherosclerotic process occurring in the bifurcation of the common carotid artery and in the the internal carotid artery. The consequence of hemodynamically significant stenosis of the internal carotid artery is a disturbance of cerebral blood flow documented due to various imaging studies of the brain. Also, asymptomatic carotid artery stenosis in people who previously have never experienced neurological symptoms of nervous tissue ischemia increases the risk of stroke. Detection of such stenosis gives the patient a chance to start appropriate surgical treatment and, as a result, reduce the risk of cerebral infarction. Despite the possibility of using non-invasive angio-neurological exams showing the morphology of atherosclerotic lesions in the walls of the carotid arteries and their hemodynamic flow effects, these methods do not allow to assess the metabolic effect of unilateral, hemodynamically significant carotid stenosis on the level of cerebral circulatory insufficiency, which is based on the lower biological activity of neurons and leads to chronic deterioration of the function of the nervous tissue, which, in addition to the increased risk of fatal strokes, may, for example, determine the worse efficiency of cognitive processes in patients, especially elderly people.

For this reason, further attempts are made to develop screening diagnostic tests that may be used in routine clinical practice to assess the severity of tissue metabolic disorders in the group of patients with asymptomatic carotid stenosis. Recently, the "liquid biopsy" as an innovative method is a breakthrough in the diagnosis of cancer and revolutionizes the existing methods of diagnostic tests. It is a non-invasive method that allows the detection of molecular biomarkers, thus providing a lot of information about the disease, its activity and stage. It consists in the analysis of circulating genetic material of neoplastic origin, isolated from the peripheral blood of patients. Despite the existing reports indicating the possibility of effective use of "liquid biopsy" for the diagnosis of cancer before the appearance of symptoms, the possible prospect of using the "liquid biopsy" method for detecting diseases other than cancer, also in their asymptomatic phase, remains unexplained.

Therefore, the aim of this doctoral thesis was to determine the changes in the expression of selected intracellular genetic factors in the form of single-stranded RNA molecules, the so-called microRNAs, and protein extracellular substances dissolved in the blood of asymptomatic patients, who were diagnosed with the significant stenosis of the internal carotid artery and subsequently underwent unilateral endarterectomy. In this research model, it was possible to estimate the effect of unilateral, hemodynamically significant stenosis of the internal carotid artery and the effect of unilateral surgical elimination of stenotic internal carotid artery on selected genetic and metabolic factors that could be used in the future as specific biomarkers detected by "liquid biopsy" in patients with asymptomatic carotid stenosis.

The presented doctoral thesis is an initial report describing the preliminary results of the study, which included 48 patients with hemodynamically significant, asymptomatic stenosis of the internal carotid artery, treated by endarterectomy at the Department of Vascular Surgery and Angiology of the Pomeranian Medical University in Szczecin. Peripheral blood was collected from all patients immediately before the operation and then in the third month after endarterectomy in order to isolate mononuclear cell subpopulation as well as erythrocytes and thrombocytes, which were subjected to detailed molecular analysis, including: a) expression of selected microRNAs in blood mononuclear cells; b) expression of microRNA sequences in the collected atherosclerotic plaques and comparatively in the unaffected normal artery; c) expression of plasma proteins with angio-protective properties and regulating homeostasis of vascular connective tissue; d) the enzymatic activity of cellular antioxidants and the concentration of reduced glutathione separately in the population of erythrocytes and thrombocytes.

It was found that hemodynamically significant stenosis of the internal carotid artery was associated with a statistically significant increase in the expression level of the following intracellular microRNAs: miR-21-3p, miR-134-5p, miR-296-5p, miR-122-5p, miR-150-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p and miR-223-3p. In addition, in the same group of patients, a significant reduction in the expression level of the following intracellular microRNAs was observed: miR-23a-3p, miR-30b, miR-16-5p. At the same time, it was found that atherosclerotic plaques, compared to the normal healthy arterial wall, had a significantly increased expression levels of the following microRNAs: miR-9-5p, miR-126-3p, miR-134-5p, miR-296-5p, miR-122-5p, miR-126-5p, miR-133b, miR-150-5p, miR-17-3p, miR-17-5p. However, the level of expression was significantly reduced for the following microRNAs: miR-23a-3p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-223-3p.



The analysis of the expression of angioprotective factors in blood plasma showed that the stenosis of the internal carotid artery was associated with a statistically significant decrease in the concentration of EGF, FGF-beta, BMP-2 and Interleukin-6. Also, the concentration of both tested metalloproteinases (MMP-1 and MMP-3) was significantly downregulated in patients before surgical removal of the atherosclerotic plaque. None of the angioprotective factors showed increased expression in patients with hemodynamically significant stenosis of the internal carotid artery.

It was also shown that in the erythrocytes circulating in the peripheral blood collected before the surgical removal of the atherosclerotic plaque, the level of activity of such antioxidants as CAT and SOD, as well as the concentration of reduced glutathione, was significantly reduced. Interestingly, the level of enzymatic activity of glutathione reductase was significantly elevated in erythrocytes from this group of patients. At the same time, in the platelets circulating in the peripheral blood collected before the surgery to remove the atherosclerotic plaque, there was a significantly reduced level of activity of such antioxidants as: CAT, SOD and GSH, as well as glutathione reductase, as well as the concentration of reduced glutathione. None of the enzymes responsible for antioxidant defense in erythrocytes and platelets showed increased enzyme activity in patients with hemodynamically significant stenosis of the internal carotid artery.

Based on all these preliminary results, the following conclusions were drawn:

- 1) The expression of several microRNA sequences regulating the transcriptional activity of many genes in the population of peripheral blood mononuclear cells is significantly dependent on carotid artery stenosis in the asymptomatic period of atherosclerotic disease.
- 2) Asymptomatic stenosis of the internal carotid artery is mainly associated with a significant decrease in plasma levels of angioprotective factors, and those, which regulate the homeostasis of the vascular connective tissue.
- 3) Asymptomatic stenosis of the internal carotid artery is mainly associated with a significant decrease in the activity of enzymes responsible for antioxidant defense in circulating erythrocytes and thrombocytes in patients before the procedure of surgical removal of atherosclerotic plaque.

4) The results of the study indicate that significant stenosis of the internal carotid artery as the main source of blood for brain tissue may induce specific transcriptome and metabolome changes in circulating blood cell subpopulations and in blood plasma of asymptomatic patients that may contribute in the future to the development of non-invasive diagnostic methods based on 'liquid biopsy' of blood in this selected group of patients.