



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

---

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Szymon Dawid Wnęk

# **„Znaczenie wybranych mikroRNA w patogenezie miażdżycy tętnic szyjnych i ich potencjalna rola jako biomarkera powikłań miażdżycy”**

Wykonana w Zakładzie Patologii Ogólnej Katedry Fizjopatologii, Hematologii i  
Transplantologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

*Promotor: Dr hab. n. med. Miłosz Kawa*

*Promotor pomocniczy: Dr n. med. Anna Sobuś*

**SZCZECIN 2023**

*Serdeczne podziękowania składam Promotorowi Rozprawy  
Panu Dr hab. Miłoszowi Kawie  
za opiekę naukową i pomoc merytoryczną w trakcie realizacji projektu  
oraz poświęcony czas i wsparcie okazywane podczas powstawania niniejszej dysertacji.*

*Serdecznie dziękuję  
Panu Profesorowi Bogusławowi Machalińskiemu  
za umożliwienie wykonania badań molekularnych w Zakładzie Patologii Ogólnej  
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego.*

*Dziękuję dr Annie Sobuś,  
dr Ewie Pius-Sadowskiej oraz dr Karolinie Łuczowskiej  
za pomoc w realizacji części badań oraz za okazaną życzliwość.*

*Dziękuję także Wszystkim Osobom  
Niewymienionym tu z Imienia, których wiedza naukowa i wsparcie oraz życzliwa pomoc  
przyczyniły się do powstania niniejszej Rozprawy Doktorskiej.*

Praca finansowana z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki,  
numer: UMO-2012/05/B/NZ7/02299.

## Spis treści.

Wykaz skrótów i skrótowców.....	7
<b>2. Wstęp.....</b>	<b>16</b>
2.1. MikroRNA .....	16
2.1.1. Charakterystyka .....	16
2.1.2. Biogeneza mikroRNA.....	17
2.1.3. Oddziaływania na komórki organizmu .....	18
2.1.4. Funkcje biologiczne wybranych miRNA i ich aktywność regulacyjna w organizmie człowieka .....	18
2.2. Procesy biologiczne związane z funkcjonalnością wewnątrzkomórkową z mikroRNA ..	22
2.2.1. Stan zapalny .....	22
2.2.1.1. Charakterystyka stanu zapalnego .....	22
2.2.1.2. Szlak NF- $\kappa$ B.....	23
2.2.1.3. Szlak JAK-STAT .....	23
2.2.1.4. Szlak MAPK .....	24
2.2.2. Proliferacja komórek.....	25
2.2.3. Apoptoza .....	28
2.2.3.1. Szlak wewnętrzny .....	29
2.2.3.2. Szlak zewnętrzny.....	30
2.2.3.3. Szlak perforynowo-granzymowy .....	31
2.2.3.4. Szlak wykonawczy .....	32
2.2.4. Stres oksydacyjny .....	33
2.2.4.1. Rola wybranych enzymów i substancji o charakterze ochronnym przed stresem oksydacyjnym .....	36
2.3. Układ krwionośny .....	38
2.3.1. Tętnice.....	39
2.3.2. Komórki śródbłonna .....	40
2.3.3. Funkcje wybranych czynników na układ krwionośny i śródbłonek naczyniowy .....	41
2.4. Miażdżycy .....	45
2.4.1. Charakterystyka miażdżycy .....	45
2.5. Rozpoznawanie i klasyfikacja zwężeń tętnicy szyjnej .....	48
2.6. Metody leczenia operacyjnego zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej .....	50
<b>3. Założenia teoretyczne i cele badań .....</b>	<b>53</b>

<b>4. Materiał i metody</b> .....	56
4.1. Pacjenci .....	56
4.2. Materiał biologiczny do badań .....	58
4.3. Procedury laboratoryjne .....	59
4.3.1. Izolacja materiału komórkowego .....	59
4.3.2. Izolacja materiału tkankowego .....	60
4.3.3. Badanie stężenia materiału genetycznego .....	61
4.3.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji .....	62
4.3.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR .....	62
4.3.6. Elektroforeza żelowa .....	64
4.3.7. Typowanie stabilnego mmiRNA referencyjnego oraz wyliczenie poziomu ekspresji badanych miRNA .....	65
4.3.8. Detekcja czynników białkowych za pomocą multipleksowej techniki Luminex .....	65
4.3.9. Aktywność enzymów przeciwutleniających i stężenia glutationu w płytkach krwi i erytrocytach .....	67
4.4. Metoda analizy statystycznej uzyskanych wyników .....	69
<b>5. Wyniki</b> .....	70
5.1. Ekspresja wybranych mikroRNA w komórkach jednojądrzastych z krwi obwodowej. ...	70
5.1.1. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłonna oraz stanem niedokrwienia tkankowego. ....	70
5.1.2. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego. ....	73
5.1.3. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek .....	75
5.2. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA w blaszce miażdżycowej i tkance niezmienionej miażdżycowo tętnicy .....	78
5.2.1. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłonna oraz stanem niedokrwienia tkankowego. ....	78
5.2.2. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego. ....	81
5.2.3. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z wewnątrzkomórkową regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek. ....	83
5.3. Ocena osocowego stężenia wybranych czynników białkowych uczestniczących w metabolizmie tkanki łącznej, w tym w procesach syntezy i degradacji składników włóknistych ściany tętnic. ....	86
5.3.1. Ocena stężenia wybranych czynników wzrostu i cytokin o właściwościach angio- protekcyjnych .....	87
5.3.2. Ocena stężenia wybranych czynników białkowych, w tym enzymów, które zapewniają integralność naczyń krwionośnych. ....	89

5.4. Ocena patofizjologicznych mechanizmów ochrony składników ścian naczyń przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. ....	92
5.4.1. Parametry obrony antyoksydacyjnej oceniane w erytrocytach krwi obwodowej u pacjentów z istotnym zwężeniem tętnicy szyjnej .....	92
5.4.2. Parametry obrony antyoksydacyjnej oceniane w płytkach krwi obwodowej u pacjentów z istotnym zwężeniem tętnicy szyjnej. ....	95
<b>6. Dyskusja</b> .....	<b>98</b>
<b>7. Streszczenie w języku polskim</b> .....	<b>105</b>
<b>8. Streszczenie w języku angielskim</b> .....	<b>109</b>
<b>9. Bibliografia</b> .....	<b>113</b>
<b>10. Spis tabel</b> .....	<b>133</b>
<b>11. Spis rycin</b> .....	<b>134</b>

## Wykaz skrótów i skrótowców.

Skrót/Skrótowiec	Rozwinięcie skrótu/skrótowca	Opis w języku polskim
8-OHdG	<i>8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine</i>	Marker uszkodzenia DNA, 8-hydroksy-2-deoksyguanozyna
AGO	<i>Argonaute protein</i>	Białko argonauta
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>	Zespół nabytego niedoboru odporności
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>	Czynnik indukujący apoptozę
Ang1	<i>Angiopoietin 1</i>	Angiopoetyna 1
Ang2	<i>Angiopoietin 2</i>	Angiopoetyna 2
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>	Czynnik aktywujący proteazę apoptotyczną 1
Apo2L/DR4	<i>Apoptosis-inducing ligand 2 for death receptor 4</i>	Ligand 2 indukujący apoptozę dla receptora śmierci 4
Apo2L/DR5	<i>Apoptosis-inducing ligand 2 for death receptor 5</i>	Ligand 2 indukujący apoptozę dla receptora śmierci 5
Apo3L/DR3	<i>Apoptosis-inducing ligand 3 for death receptor 3</i>	Ligand 3 indukujący apoptozę dla receptora śmierci 3
ATC	<i>Anaplastic thyroid cancer</i>	Rak anaplastyczny tarczycy
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>	Adenozyno-5'-trifosforan
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>	Kinaza regulująca sygnał apoptozy 1
AU	<i>Arbitrary unit</i>	Dowolna/umowna jednostka

Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	Grupa białek z rodziny Chłoniaka komórek B 2
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	Białka morfogenetyczne kości
CAD	<i>Caspase-activated deoxyribonuclease</i>	Dezoksyrybonukleaza aktywowana kaspazą
CAT	<i>Catalase</i>	Katalaza
CCND2	<i>Gene encoding the CCND2 cell cycle activator</i>	Gen kodujący aktywator cyklu komórkowego CCND2
CD40/p50	<i>Cluster of differentiation 40</i>	Klaster zróżnicowania 40
CD40L/CD154	<i>Cluster of differentiation 154</i>	Klaster zróżnicowania 154
CD8+	<i>Cluster of differentiation 8</i>	Klaster zróżnicowania 8
cDNA	<i>Complementary DNA</i>	Komplementarny DNA
CEA	<i>Carotid endarterectomy</i>	Endarterektomia tętnicy szyjnej
c-FLIP	<i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i>	Komórkowe białko hamujące FLICE
COX	<i>Cyclooxygenase</i>	Cyklooksygenaza
CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>	Region krytyczny zespołu DiGeorge'a Gen 8
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>	Kompleks sygnalizacyjny indukujący śmierć
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Kwas deoksyrybonukleinowy
DNAzy	<i>Deoxyribonucleases</i>	Deoksyrybonukleazy



ds-miRNA	<i>Double-stranded microRNA</i>	Dwuniciowe mikroRNA
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Kwas wersenowy
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	Naskórkowy czynnik wzrostu
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>	Kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
ERK1/2	<i>Kinases 1/2 regulated by extracellular signal</i>	Kinazy 1/2 regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
ESeH	<i>Selenol</i>	Selenol
ESeOH	<i>selenic acid</i>	Kwasu selenowy
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i>	Domena śmierci powiązana z Fas
FasL/FasR	<i>Fas ligand</i>	Ligand Fas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	Agencja Żywności i Leków
FGF $\alpha$	<i>Fibroblast growth factor <math>\alpha</math></i>	Czynnik wzrostu fibroblastów $\alpha$
FGF $\beta$	<i>Fibroblast growth factor <math>\beta</math></i>	Czynnik wzrostu fibroblastów $\beta$
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i>	Peroksydaza glutationowa
GR	<i>Glutathione reductase</i>	Reduktaza glutationowa
GTPaza	<i>Hydrolase enzymes that bind to the nucleotide guanosine triphosphate</i>	Enzymy hydrolazy, które wiążą się z nukleotydem trójfosforanem guanozyny
GSH	<i>Glutathione</i>	Glutation
GST	<i>Glutathione s-transferase</i>	S-transferaza glutationowa

HtrA2/Omi	<i>HtrA serine peptidase 2</i>	Peptydaza serynowa HtrA 2
IAP	<i>Inhibitors of apoptosis</i>	Inhibitory apoptozy
ICAD	<i>Inhibitor of caspase-3– activated DNase</i>	Inhibitor DNazy aktywowanej kaspazą-3
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i>	Insulinopodobny czynnik wzrostu I
IKK $\alpha$	<i><math>\alpha</math> subunit of inhibitor of nuclear factor kappa B</i>	Podjednostka $\alpha$ inhibitora czynnika jądrowego kappa B
IKK $\beta$	<i><math>\beta</math> subunit of inhibitor of nuclear factor kappa B</i>	Podjednostka $\beta$ inhibitora czynnika jądrowego kappa B
IKK $\gamma$	<i>Regulatory subunit of inhibitor of nuclear factor kappa B</i>	Podjednostka regulatorowa inhibitora czynnika jądrowego kappa B
IL-1	<i>Interleukin 1</i>	Interleukina 1
IL-6	<i>Interleukin 6</i>	Interleukina 6
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B</i>	Inhibitor czynnika jądrowego kappa B
JAK	<i>Janus kinases</i>	Kinazy janusowe
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>	c-Jun N-końcowa kinaza
LDL	<i>High-density lipoprotein</i>	Lipoproteina o niskiej gęstości
LOX	<i>Lysyl oxidase</i>	Oksydaza lizylowa
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>	Białko aktywowane mitogenem
MAPK p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>	Kinazy białkowe aktywowane mitogenem p38
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	Kinaza białkowa aktywowana mitogenem

MAPKK	<i>MAP kinase kinases</i>	Kinazy kinazy MAP
MAPKKK	<i>Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase</i>	Kinaza kinazy kinazy białkowej aktywowanej mitogenem
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>	Białko chemotaktyczne monocytów 1
MDA	<i>Malondialdehyde</i>	dialdehyd malonowy
MDA-T32 ATC	<i>Cell line that was isolated from the thyroid of a male with carcinoma</i>	Linia komórkowa wyizolowana z tarczycy mężczyzny z rakiem
miRISC	<i>MiRNA-induced silencing complex</i>	Kompleks wyciszający indukowany miRNA
miRNA, miR	<i>MicroRNA</i>	Mikro RNA
MKK1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	Kinaza białkowa aktywowana mitogenem kinaza 1
MKK2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>	Kinaza białkowa aktywowana mitogenem kinaza 2
MKK3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>	Kinaza białkowa aktywowana mitogenem kinaza 3
MKK4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>	Kinaza białkowa aktywowana mitogenem kinaza 4
MKK6	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>	Kinaza białkowa aktywowana mitogenem kinaza 6
MKK7	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>	Kinaza białkowa aktywowana mitogenem kinaza 7
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>	Metaloproteinazy macierzy
mRNA	<i>Messenger RNA</i>	Informacyjny/matrycowy RNA

NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i>	Niekodujący RNA
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	Czynnik jądrowy kappa- wzmacniacz łańcucha lekkiego aktywowanych komórek B
NM23-H1	<i>Nucleoside diphosphate kinase Nm23-H1</i>	Kinaza difosforanowa nukleozydu Nm23-H1
NOS	<i>Nitric oxide synthases</i>	Syntazy tlenku azotu
NuMA	<i>The Nuclear Mitotic Apparatus Protein</i>	Białko jądrowego aparatu mitotycznego
ODe	<i>Ornithine decarboxylase</i>	Dekarboksylaza ornityny
P450	<i>Cytochrome P450</i>	Cytochrom P450
p52	<i>A protein of the NF-κB family</i>	Białko z rodziny NF-κB
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>	Polimeraza poli (ADP- rybozy).
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	Sól fizjologiczna buforowana fosforanami
PCP4	<i>Purkinje Cell Protein 4</i>	Białko komórki Purkinjego 4
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	Płytkopochodny czynnik wzrostu
pre-miRNA	<i>Precursor-miRNAs</i>	miRNA prekursorowe
pri-miRNA	<i>Primary miRNA</i>	Pierwotne miRNA
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>	Receptory rozpoznające wzorce

Rel	<i>The proto-oncogene c-Rel, protein that in humans is encoded by the REL gene</i>	Protoonkogen c-Rel, białko, które u ludzi jest kodowane przez gen REL
RelA	<i>Transcription factor RelA</i>	Czynnik transkrypcyjny RelA
RelB	<i>Transcription factor RelB</i>	Czynnik transkrypcyjny RelB
RFT/ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Reaktywne formy tlenu
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>	Białko oddziałujące z receptorem
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	Kompleks wyciszający indukowany RNA
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Kwas rybonukleinowy
RNaza III	<i>Ribonuclease III</i>	Rybonukleaza III
SET	<i>Multitasking protein, involved in apoptosis, transcription, nucleosome assembly and histone chaperoning</i>	Białko wielozadaniowe, zaangażowane w apoptozę, transkrypcję, składanie nukleosomów i opiekę nad histonami
Smac/DIABLO	<i>Secondary mitochondria-derived activator of caspases/ Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI</i>	Wtórny aktywator kaspaz pochodzący z mitochondriów/ Bezpośredni inhibitor białka wiążącego apoptozę o niskim pI
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>	Dysmutaza ponadtlenkowa
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription protein</i>	Przetwornik sygnału i aktywator białka transkrypcyjnego
SW579	<i>Squamous cell carcinoma cell line</i>	Linia komórkowa raka kolczystokomórkowego

TAE	<i>TAE buffer is a buffer solution containing a mixture of Tris-acetate buffer, acetic acid and EDTA.</i>	Bufor TAE jest roztworem buforowym zawierającym mieszaninę buforu tris-octanowego, kwasu octowego i EDTA.
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>	Transformujący czynnik wzrostu beta
TH1	<i>TH1 helper lymphocytes</i>	Limfocyty pomocnicze TH1
TH2	<i>TH2 helper lymphocytes</i>	Limfocyty pomocnicze TH2
Tie1	<i>Tyrosine Kinase With Immunoglobulin Like And EGF Like Domains 1</i>	Kinaza tyrozynowa z domenami podobnymi do immunoglobulin i podobnymi do EGF 1
Tie2	<i>Tyrosine Kinase With Immunoglobulin Like And EGF Like Domains 2</i>	Kinaza tyrozynowa z domenami podobnymi do immunoglobulin i podobnymi do EGF 2
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	Czynnik martwicy nowotworu
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>	Receptor czynnika martwicy nowotworu 1
Toso	<i>Protein that blocks Fas-induced apoptosis in T cells by inhibiting caspase-8 processing</i>	Białko, które blokuje indukowaną przez Fas apoptozę w limfocytach T poprzez hamowanie przetwarzania kaspazy-8
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain</i>	Domena śmierci związana z receptorem TNF
TRBP	<i>Transactivation response RNA binding protein</i>	Białko wiążące RNA odpowiedzi transaktywacyjnej

UV	<i>Ultraviolet</i>	Ultrafiolet
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>	Cząsteczka adhezji komórek naczyń 1
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
XPO5	<i>Exportin 5</i>	Eksporyna 5

## **2. Wstęp**

### **2.1. Mikro RNA**

#### **2.1.1. Charakterystyka**

MiRNA należą do grupy ncRNA (non-coding RNAs- RNA niekodujące) co bezpośrednio wskazuje na fakt niewystępowania miRNA kodujących struktury białkowe w organizmie. Odnajdziemy je zarówno w organizmach zwierzęcych jak i roślinnych. Szacuje się, że w ludzkim genomie miRNA modulują poziomy ekspresji do 60% wszystkich genów kodujących budowę białek [16]. Należy również zauważyć, że dane jednostki miRNA w swoim działaniu modulującym ekspresję genów nie będą skupiały się na jednym ściśle określonym genie a raczej na ich większej ilości. Do modulacji ekspresji w przypadku miRNA dochodzi na poziomie translacyjnym. Ze względu na wysoki poziom występowania miRNA powiązywane są z wieloma procesami zachodzącymi w organizmie człowieka takimi jak: proliferacja i różnicowanie komórek, ogólny rozwój organizmu, apoptoza, stres oksydacyjny i wiele innych. Poza przejawami swojej roli w procesach fizjologicznych, miRNA w których doszło do dysregulacji mogą wpływać na rozwój zjawisk patofizjologicznych takich jak: cukrzyca, nowotwory, miażdżyca tętnic, dystrofie mięśniowe itp. Podstawową binarną jednostką funkcjonalną miRNA jest kompleks RISC składający się z miRNA oraz białek Argonauta (AGO) [16]. Kompleks ten posiada funkcję pozwalającą na rozpoznawanie swoich celów w postaci mRNA na podstawie składu nukleotydowego zgodnego z zasadą parowania zasad Watsona i Cricka. Ważnym aspektem działania miRNA jest ich zdolność do łatwego przyłączania i odłączania od celu swojego działania co pozwala na sprawne oddziaływanie z szeroką grupą docelowych cząsteczek. Uściślając, to białka AGO odpowiadają w kompleksie RISC za zapewnienie wydajnej platformy pozwalającej kofaktorom modulującym na wiązanie się z cząsteczkami docelowymi natomiast cząsteczka miRNA jest odpowiedzialna za rozpoznawanie swoich celów [16].



### 2.1.2. Biogeneza mikroRNA

Powstawanie miRNA w organizmie człowieka jest procesem wieloetapowym do wystąpienia, którego wymagane są fazy zachodzące zarówno w jądrze komórkowym jak i w cytoplazmie komórki. Początkowo długie pri-miRNA są transkrybowane przez polimerazę RNA II i III z tak zwanym czepkiem (cap) oraz ogonem poli-Adeninowym. Pri-miRNA składają się z dwuniciowego rdzenia, dwóch flankujących nieustrukturyzowanych jednoniciowych ogonów, około 30 par zasad oraz pętli końcowej [16, 43]. W kolejnych etapach dojrzewania pri-miRNA są przetwarzane do form prekursorowych określanych jako pre-miRNA i na tym etapie składają się z 70 nukleotydowych struktur typu stem-loop. Do przemiany pri-miRNA do formy pre-miRNA dochodzi dzięki mikroprocesorowemu kompleksowi białkowemu w którego skład wchodzi enzym RNaza III Drosha, genu regionu krytycznego 8 zespołu Di George'a (DGCR8) oraz dwuniciowego białka wiążącego RNA [16, 43]. Dojrzewanie kompleksów pre-miRNA nie zatrzymuje się na tym etapie, ponieważ swoje działanie zaczyna wykazywać enzym RNaza III Dicer dzięki której tworzone są dupлекsy miRNA określane skrótem ds-miRNA w strukturze których odnajdziemy dołączony do końca 5' fosforan z dwunukleotydowym dodatkiem oraz hydroksylem przy końcu 3'. Dupлекsy miRNA są następnie transportowane do białek typu Argonauta które są aktywną częścią kompleksu wyciszającego indukującego RNA (RISC) który zawiera białko wiążące RNA odpowiedzi transaktywacyjnej (TRBP), Dicer oraz AGO. Białko TRBP wykorzystuje zdolność do identyfikacji nici określanymi mianem „pasażera” i „przewodnika” w cząsteczkach ds-miRNA [16, 43]. TRBP dodatkowo wykrywa właściwości termodynamiczne danych ds-miRNA określając która z nici jest mniej stabilna przy końcu 5' po to, aby dołączyć dane ds-miRNA w poprawnej orientacji do białek AGO. AGO następnie rozwija struktury ds-miRNA i usuwa nić „pasażerską” co doprowadza do powstania dojrzałych cząsteczek miRNA. Poza opisanym powyżej procesem powstawania miRNA istnieją podklasy miRNA które przechodzą proces dojrzewania w inny sposób. Pierwsze pochodzące z krótkich intronów określane jako agotrony w postaci dojrzałej przypominają budowę pre-miRNA. Składają się z 80 do 100 par zasad a ich biogeneza zachodzi niezależnie od Dicer i Drosha, ale nadal powiązana jest z białkami Argonauta [16, 43]. W tym wypadku cząsteczki pre-miRNA są transportowane do cytoplazmy przez Eksportynę-5 (XPO5) która należy do rodziny karioferyny  $\beta$  w połączeniu z Ran GTPazą. Drugie określane mianem mirtronów

pomijają pierwszy etap obróbki Drosha i polegają na splicingu oraz usuwaniu rozgałęzień (debranching) do wytworzenia cząsteczek pre-miRNA które są substratami dojrzewających miRNA za pośrednictwem Dicer [16, 43].

### **2.1.3. Oddziaływania na komórki organizmu**

Konsekwencją posiadania zdolności do zmiany poziomów ekspresji genów jest następstwo w postaci wpływu na szereg różnych procesów fizjologicznych jak i patofizjologicznych organizmu ludzkiego. Tego typu interakcje są osiągnięte poprzez sekwencyjny proces. Kompleks RISC najpierw doprowadza do wyłączenia funkcji swojego celu poprzez tłumienie translacji mRNA a w dalszym etapie inicjuje jego degradację. Badania oddziaływań kompleksów miRISC wykazały, że posttranskrypcyjna modulacja zachodzi poprzez inhibicję etapu elongacji w translacji, proces tak zwanego ribosome drop-off oraz degradację białek. W przypadku niewielkiej grupy miRNA zaobserwowano inne i niezależne od kompleksu RISC oddziaływania w obrębie jądra komórkowego [17, 19, 26].

### **2.1.4. Funkcje biologiczne wybranych miRNA i ich aktywność regulacyjna w organizmie człowieka**

Z puli badanych miR wybrano 12, które wykazywały największe różnice w poziomach ekspresji. Do tej grupy zaliczono: miR-21, miR-23, miR-296, miR-30, miR-122, miR-126, miR-150, miR-16, miR-17, miR-27, miR-34 oraz miR-223.

**miRNA-21** w badaniach wykazuje potencjalne działanie stabilizacyjne na blaszkę miażdżycową poprzez zwiększenie szybkości proliferacji komórek mięśni gładkich i hamowanie aktywności makrofagów. Brak ekspresji miR-21 w makrofagach powoduje przyspieszenie rozwoju miażdżycy, martwicy blaszki oraz ogólnego stanu zapalnego naczyń. Również w innych chorobach układu krwionośnego takich jak zwłóknienie mięśnia sercowego, niewydolność serca, rozwój i ekspansja tętniaka aorty brzusznej miR-21 wykazuje swój wpływ [58].

Zaobserwowano, że **miRNA-23** hamuje aktywność komórek progenitorowych śródbłonna u pacjentów z chorobą wieńcową poprzez oddziaływanie na czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). Ponadto miR-23 jest sugerowane jako biomarker niewydolności serca. W badaniach wykazano dynamiczną zmianę ekspresji krążącego miRNA-23 we wczesnych fazach ostrego zawału mięśnia sercowego. Dodatkowo ukazują się korelacje między krążącym miRNA-23 a ciężkością zwichnięcia tętnic u pacjentów z chorobą wieńcową [57].

**miRNA-296** wykazuje dwojaką naturę w przypadku chorób nowotworowych. Odnalezienie można doniesienia zarówno o wpływach onkogennych tego miR jak i supresorowych, hamujących rozwój guzów nowotworowych. Przykładowe badania nad pacjentami z rakiem jelita grubego wykazały zmniejszoną ekspresję miRNA-296 w tkankach nowotworu. Zmniejszona ekspresja była również skorelowana z niekorzystnymi parametrami klinicznymi i złym rokowaniem. Badania na hodowlach in-vitro ukazują funkcje hamujące migrację i inwazję komórek raka jelita. Pod względem mechanicznym miRNA-296 w tym wypadku zatrzymywało przejście nabłonkowo-mezenchymalne komórek nowotworu [56].

**miRNA-30** w badaniach na modelu mysim wykazuje wpływ regulacyjny na proliferację komórek. Stwierdzono, że nadekspresja rodziny miRNA-30 promuje różnicowanie komórek prekursorowych mięśni a hamowanie ekspresji powodowało ograniczenie różnicowania mioblastów in-vitro. Zauważono również ograniczenie ekspresji miRNA-30 w stanach patologicznych takich jak uszkodzenie mięśni wyindukowane wstrzyknięciem chlorku baru i zaniku mięśni [55].

**miRNA-122** podobnie jak miRNA-30 wywiera wpływ na różnicowanie komórek organizmu. W badaniach na modelu zwierzęcym szczurów z osteoporozą zidentyfikowano białko komórki Purkiniego 4 (PCP4) jako potencjalny cel działania miR-122. W przypadku nadekspresji tego miR zauważono wpływy hamujące na proliferację i różnicowanie osteoblastów a wzmacniane przez nadekspresję PCP4. miRNA-122 może indukować aktywację szlaku sygnałowego c-Jun NH2-końcowej kinazy (JNK), podczas gdy PCP4 blokuje ten szlak. Dodatkowo zauważono, że hamujący wpływ miRNA-122 może być kompensowany przez aktywację PCP4 lub hamowanie szlaku sygnałowego JNK [54].

**miRNA-126** w danych literaturowych wykazuje oddziaływanie na proliferację i apoptozę komórek. W modelu zwierzęcym świnia zaobserwowano, że podwyższona ekspresja tego miR promuje progresję cyklu komórkowego, proliferację komórek oraz hamuje apoptozę. miRNA-126 uważane jest również za potencjalny marker związany z sercem i ostrym zespołem wieńcowym. Dodatkowo badania ukazują istotne powiązanie miRNA-126 z występowaniem zawału mięśnia sercowego [53].

**miRNA-150** jest regulatorem hamującym stany zapalne i patologiczną angiogenezę. U pacjentów z uszkodzeniem wzroku u którego podstaw stoi rozwinięta cukrzyca, wykazano obniżone poziomy miRNA-150. U myszy karmionych dietą bogatą w tłuszcze już po miesiącu zaobserwowano spadek miRNA-150 w krwi i siatkówce a także zmniejszoną wrażliwość na światło. Myszy z knockoutem miRNA-150 jak i kontrolne poddane diecie bogato tłuszczowej rozwinęły cukrzycę. W wieku 7-8 miesięcy myszy z knockoutem miRNA-150 w normalnej diecie miały zwiększoną degenerację naczyń włosowatych siatkówki w porównaniu z myszami kontrolnymi, co wskazuje, że miR-150 jest ważny w utrzymaniu integralności strukturalnej mikronaczyń siatkówki. Delecja miRNA-150 pogorszyła dysfunkcję siatkówki wywołaną przez dietę bogatą w tłuszcze już po 1 miesiącu oraz zaostrzyła wywołaną przez retinopatię cukrzycową poprzez dalsze nasilenie zapalenia siatkówki i zwyrodnienia mikrokrążenia [227].

Badania sugerują, że **miRNA-16** może odgrywać rolę w angiogenezie w zespołach mielodysplastycznych poprzez oddziaływanie na czynnik wzrostu śródbłonna (VEGF). U pacjentów z zespołem mielodysplastycznym zaobserwowano istotnie niższy poziom miRNA-16 i podwyższony poziom VEGF co sugeruje występowanie korelacji między mikroRNA i angiogenezą [52].

**miRNA-17** powiązywane jest z zarówno funkcjami onkogennymi, jak i hamującymi rozwój nowotwów poprzez indukując represję translacji i / lub rozpad mRNA. W raku anaplastycznym tarczycy (ATC) zachodzi silna ekspresja klastra miR-17-92. Podczas gdy trzy z czterech rodzin miRNA-17-92 były onkogenne, odkryliśmy nową rolę miR-17 jako supresora guza in vitro i in vivo. Hamowanie miR-17 zwiększyło ekspresję klastra miRNA-17-92 i znacznie zwiększyło poziomy dojrzałych miRNA-18a i miRNA-19a. Hamowanie miRNA-17 zwiększyło ekspresję aktywatora cyklu komórkowego CCND2, związanego ze zwiększoną proliferacją komórek i wzrostem

guza w przeszczepionych komórkach SW579 u myszy ksenoprzeszczepowych. Wykazano, że hamowanie miRNA-17 nie hamuje wzrostu guza tarczycy w komórkach SW579 i MDA-T32 ATC, ale zwiększa ekspresję innych członków rodziny miRNA-17-92 i geny indukujące progresję raka [51].

**miRNA-27** wykazuje zaangażowanie w różne procesy w tym: rozwój embrionalny, angiogeneza, adipogeneza i miażdżycę tętnic. Wykazano wpływ miRNA-27 w sposób hamujący jak i pobudzający na geny związane z mięśniem sercowym [49].

**miRNA-34** w modelach mysich hamuje rozwój oraz promuje apoptozę kostniakomięsaka. Dane literaturowe sugerują również wpływ miRNA-34 na proliferację i migrację komórek [45, 46].

**miRNA-223** wykazuje wpływ na procesy autofagii, stany zapalne. Dane wskazują również na funkcję regulatorową w różnicowaniu komórek układu immunologicznego [44].

## **2.2. Procesy biologiczne związane z funkcjonalnością wewnątrzkomórkową mikro RNA**

MikroRNA jako modulatory ekspresji genów będą wykazywały istotny wpływ na różne procesy zachodzące w organizmie. W ramach tej pracy głównymi celami będą procesy związane z ryzykiem, występowaniem i rozwojem miażdżycy tętnic.

### **2.2.1. Stan zapalny**

#### **2.2.1.1. Charakterystyka stanu zapalnego**

Stan zapalny jest naturalną reakcją obronną organizmu wystawionego na kontakt z niepożądanymi czynnikami oraz w odpowiedzi na powstałe na różne sposoby uszkodzenia fizyczne struktur ciała. Najbardziej powszechnymi czynnikami indukującymi odpowiedź zapalną będą infekcje bakteryjne, wirusowe i grzybicze oraz ze strony fizycznej obrażenia zewnętrzne takie jak zadrapania czy uszkodzenie poprzez działanie ciała obcego np.: kiedy w palec wbije nam się drzazga. Inne czynniki mogące prowadzić do powstania takich reakcji to promieniowanie i kontakt z różnymi środkami fizycznymi. Poza podstawowymi źródłami rozpoznaje się wiele złożonych zespołów chorobowych, w których często dochodzić będzie do powstania wielu ognisk zapalnych. Przykładową chorobą u podstaw, której stać będzie stan zapalny to reumatoidalne zapalenie stawów [152]. Jest to choroba układowa tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym i charakterze zapalnym z przebiegiem przewlekłym. Ostry stan zapalny charakteryzuje się kilkoma objawami mogącymi występować jednocześnie, natomiast są sytuacje, kiedy stan zapalny nie będzie powodował jakichkolwiek objawów lub będzie prowadził tylko do ich części. Główne objawy to: zaczerwienienie, ciepło, ból, obrzęk i utrata funkcji. Przykładem utraty funkcji będą trudności w oddychaniu przy stanach zapalnych dolnych dróg oddechowych czy też łagodniejsze takie jak pogorszenie węchu przy przeziębieniu. W przypadku ciężkiego stanu zapalnego dochodzi również do pojawienia się objawów ogólnoustrojowych. Złe samopoczucie, gorączka i zmęczenie będą takimi obawami a ich pojawienie się oznacza wysoką aktywność układu immunologicznego [152]. Rzadkim objawem będzie posocznica. Pobudzony układ odpornościowy zużywa duże ilości energii, ale dzięki temu produkuje większą ilość komórek i przeciwciał. Dzięki dokładniejszej analizie procesów występujących w stanie zapalnym, dowiemy się, że, dochodzi w tym

wypadku do aktywacji kaskady sygnalizacji chemicznej, stymulującej reakcje mające na celu regenerację tkanek. Sygnały chemiczne stymulują chemotaksję leukocytów a co za tym idzie przejście tych komórek z krwi do tkanek [152]. Pobudzone leukocyty wytwarzają cytokiny indukujące reakcję zapalną. Podobnie jak w przypadku apoptozy, stan zapalny może być aktywowany na kilka sposobów.

#### **2.2.1.2. Szlak NF- $\kappa$ B**

Pierwszy szlak wykorzystuje kompleks białkowy NF- $\kappa$ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [151, 126]. Czynniki transkrypcyjny NF- $\kappa$ B jest zaangażowany w cztery procesy: odpowiedź immunologiczną, utrzymanie komórki przy życiu, apoptozę i procesy zapalne. Do grupy NF- $\kappa$ B zalicza się pięć czynników: c-Rel, RelB, RelA, p50 i p52. Na aktywność NF- $\kappa$ B wpływają różne bodźce takie jak: cytokiny, enzymy i substancje pochodzące od mikroorganizmów [151, 126]. W warunkach fizjologicznych działanie NF- $\kappa$ B jest hamowane przez białka I $\kappa$ B (ang. inhibitor of nuclear factor kappa B). Kinaza I $\kappa$ B składa się z dwóch podjednostek: IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  oraz podjednostki regulatorowej IKK $\gamma$  [151]. Początkowe wykrywanie infekcji odbywa się za pośrednictwem wrodzonych receptorów rozpoznawania wzorców PRR (ang. Pattern recognition receptors), które wykorzystują podobne mechanizmy transdukcji sygnału w celu aktywacji kinazy I $\kappa$ B (IKK). IKK reguluje aktywację szlaku NF- $\kappa$ B poprzez fosforylację I $\kappa$ B [151]. Fosforylacja I $\kappa$ B powoduje jego degradację przez proteasom, a następnie uwolnienie NF- $\kappa$ B do translokacji jądrowej i aktywacji transkrypcji genów. Szlak ten wpływa na procesy zapalne poprzez regulację produkcji cytokin oraz rekrutację komórek zapalnych.

#### **2.2.1.3. Szlak JAK-STAT**

W szlaku JAK-STAT czynny udział biorą kinazy janusowe (JAK) oraz przetwornik sygnału i aktywator białek transkrypcyjnych (STAT) [112, 128, 152]. Dodatkowo w szlaku JAK-STAT zaangażowane są również inne czynniki. Wymienić można: czynniki wzrostu, interferony, cytokiny, leptynę, hormon wzrostu. Szlak ten jest również mechanizmem sygnalizacyjnym, poprzez który czynniki zewnątrzkomórkowe mogą kontrolować ekspresję genów. JAK powiązane z receptorami są aktywowane przez

ligandy i fosforylują się nawzajem. W tym procesie powstają miejsca dokowania dla STAT. Również STAT przechodzi fosforylację i dalej dimeryzację poprzedzającą proces translokacji do jądra komórkowego [112, 128, 152]. Do procesów dimeryzacji STAT oraz wiązania DNA niezbędna jest również fosforylacja tyrozyny. To dzięki temu sygnalizacja JAK-STAT umożliwia translację sygnałów zewnątrzkomórkowych na odpowiedź transkrypcyjną. Białka STAT po translokacji do jądra wiążą regiony promotorowe genów zapalnych regulując w ten sposób ich transkrypcję. Przekazywanie sygnału przez czynniki transkrypcyjne prowadzi do wydzielania cytokin dodatkowo czynniki transkrypcyjne modulują ekspresję genów zapalnych takich jak: TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (CSF- ang. granulocyte colony-stimulating factor), transformujący czynnik wzrostu TGF- $\beta$  (ang. transforming growth factor  $\beta$ ), chemokiny i interferony [112, 128, 152]. W chorobach zapalnych, metabolicznych, autoimmunologicznych i nowotworowych dochodzi do rozregulowania aktywności między innymi JAK-STAT i NF- $\kappa$ B oraz szlaku MAPK.

#### **2.2.1.4. Szlak MAPK**

MAPK to rodzina kinaz białkowych serynowo-treoninowych, które kierują odpowiedzią komórkową na różne bodźce, w tym szok cieplny, cytokiny zapalne, stres osmotyczny i mitogeny, które regulują przeżycie komórek i apoptozę, różnicowanie i proliferację [114, 116, 152]. Kinazy MAPK u ssaków obejmują: kinazy N-końcowe c-Jun, kinazę MAP p38 i kinazę ERK1/2 regulowaną sygnałami zewnątrzkomórkowymi. Każdy szlak sygnałowy MAPK zawiera co najmniej trzy składniki: MAPK, kinazę MAPK (MAPKK) i kinazę kinazy MAPK (MAPKKK) [114, 116, 152]. Schematem działania tych trzech składników jest po pierwsze fosforylacja i aktywacja MAPKK przez MAPKKK, a po drugie fosforylacja i aktywacja MAPK przez MAPKK. Kinazy ERK są aktywowane przez mitogeny i sygnały różnicowania, podczas gdy bodźce zapalne i stres aktywują JNK i p38. MKK1 i MKK2 aktywują ERK1/2, MKK4 i MKK7 aktywują JNK, a MKK3 i MKK6 aktywują p38. Aktywacja MAPK, w tym Erk1/2 i JNK, prowadzi do fosforylacji i aktywacji czynników transkrypcyjnych p38 obecnych w cytoplazmie lub jądrze, co inicjuje odpowiedź zapalną [114, 116, 152].



### 2.2.2. Proliferacja komórek

Po zakończeniu pierwszych podziałów komórkowych następujących po zapłodnieniu, komórki nowo utworzonej zygoty zaczynają się różnicować, tj. zaczynają zachodzić nieodwracalne zmiany we wzorcu ekspresji genów i funkcji komórki. W tym momencie proliferacja komórek podlega stanowi zróżnicowania komórkowego [153]. To stan zróżnicowania decyduje o tym, czy i w jakich okolicznościach może nastąpić proliferacja komórek. Ogólnie rzecz biorąc, zróżnicowane komórki proliferują w odpowiedzi na określone sygnały zewnątrzkomórkowe. Czynniki zewnątrzkomórkowe, które regulują proliferację komórek, obejmują cytokiny stymulujące wzrost i hamujące wzrost, macierz zewnątrzkomórkowa lub podłoże, z którym styka się komórka oraz rodzaj i stopień bliskości sąsiednich komórek. Bardzo często te same czynniki są również ważnymi regulatorami zróżnicowania [153]. Proliferacja i różnicowanie komórek zachodzi w intensywny sposób podczas rozwoju embrionalnego i noworodkowego, ale występują również w wielu, ale nie we wszystkich tkankach dorosłych organizmów. Proliferacja komórek (używana tutaj zamiennie ze wzrostem) i różnicowanie są złożonymi procesami i nie ma pojedynczych „głównych” genów ani przełączników molekularnych, które kontrolują którykolwiek z tych procesów. Proliferacja i różnicowanie są kontrolowane przez interakcje różnych cząsteczek regulatorowych. Komórki mogą istnieć w żywym, spoczynkowym stanie wzrostu lub aktywnym proliferującym stanem wzrostu. Komórki nieproliferujące mogą zachowywać żywotność przez długi czas, a w niektórych przypadkach mogą być dość aktywne metabolicznie [153]. U wyższych eukariontów komórki nieproliferujące mogą znajdować się w stanie odwracalnego zatrzymania wzrostu lub w stanie nieodwracalnego zatrzymania wzrostu. Na przykład w organizmach dorosłych hepatocyty i komórki mięśni poprzecznie prążkowane są proliferacyjnie nieaktywne. Przez większość życia organizmu oba te typy komórek pozostają w stanie spoczynku, ale są aktywne metabolicznie. Jeśli jednak wątroba lub mięsień jest uszkodzony i dochodzi do utraty masy tkanki, to może to prowadzić do zmiany stanu działania danych komórek [153]. Przykładowo hepatocyty w nieuszkodzonych częściach wątroby zachowują zdolność do proliferacji i prowadzą podziały do momentu praktycznie całkowitej odbudowy masy narządu. W przypadku dojrzałych mięśni, komórki są zróżnicowane w ostateczny sposób i nie mogą się dalej rozmnażać. Proliferujące komórki mogą dzielić się w sposób ciągły lub mogą podlegać tylko ograniczonemu

podziałowi komórkowemu. Przykładowo fibroblasty skóry i hepatocyty namnażają się w odpowiedzi na określony bodziec np.: uszkodzenie. Niezależnie od typu proliferacji, przebiega ona poprzez serię regulowanych zdarzeń nazywanych cyklem komórkowym.

Istotnymi cechami cyklu komórkowego eukariotycznego są cztery kolejne, czasowo i biochemicznie oddzielne fazy: mitoza (M), faza luki (G1), faza syntetyczna (S) i G2 [153]. Faza M jest kulminacją cyklu komórkowego, w którym pojedyncza komórka daje początek dwóm genetycznie identycznym komórkom potomnym. Jest to zatem początek lub koniec cyklu komórkowego, w zależności od punktu widzenia. W mitozie zreplikowany genom jest podzielony na dwa jądra. Jądro i zawartość cytoplazmy komórki są fizycznie podzielone, a sama komórka dzieli się na dwie komórki potomne. Zatem na końcu mitozy każda komórka potomna zawiera jedno jądro zawierające niezreplikowaną zawartość DNA z fazy G1 [153]. W większości przypadków nowo utworzona komórka potomna albo przygotowuje się do innego cyklu komórkowego (faza G1) lub wchodzi w stan wzrostu nieproliferacyjnego. Z wyjątkiem rzadkich przypadków replikacja DNA nie rozpoczyna się natychmiast po fazie M. Faza G1 to przerwa między fazą M a replikacją DNA, podczas której komórki oceniają wykonalność i celowość dalszej proliferacji i przygotowują się do metabolicznych wymagań syntezy DNA. Ocena ta przebiega przez kilka etapów regulacyjnych lub kontrolnych. Jednym z najważniejszych jest punkt restrykcyjny lub punkt R, który występuje od 1 do 2 godzin przed rozpoczęciem replikacji DNA. Faza G1 odgrywa największy wpływ na stan różnicowania komórek. Każda tkanka i typ komórki mają swoje specyficzne potrzeby i regulatory. Faza G1 jest jednym z najbardziej zmiennych okresów cyklu komórkowego [153]. W przypadku komórek ssaków czas trwania G1 może wahać się od kilku godzin do kilku dni, w zależności od typu komórki. Replikacja genomu zachodzi podczas fazy S cyklu komórkowego. Ze względu na unikalną chemiczną i fizyczną strukturę DNA, jego synteza wymaga udziału specjalnych enzymów potrzebnych do produkcji prekursorów, reakcji rozwijania i replikacji polimeru, sprawdzania poprawności replikacji i upewnienia się, że nowo zreplikowane DNA szybko powraca do chromatyny. Niektóre z tych działań są często skoordynowane lub przeprowadzane w jądrze tuż przed rozpoczęciem fazy S, a zatem mogą być kontrolowane przez białko regulatorowe lub proces, który działa późno w fazie G1 [153]. Po rozpoczęciu replikacji DNA komórka jest na ogół zobowiązana do zakończenia procesu. Komórki, którym częściowo lub całkowicie uniemożliwiono

ukończeniu fazy S, (przykładowo przy podaniu środków farmakologicznych), często rozwijają poważne nieprawidłowości chromosomalne lub obumierają. Po zakończeniu fazy S, interwał G2 pozwala komórkom przygotować się do fazy M. Faza G2 jest stabilna, ale w przypadku niektórych komórek (np.: niektóre komórki wątroby) wchodzi one w stan wzrostu nieproliferującego z fazy G2 [153]. Kiedy takie komórki są stymulowane do proliferacji, wchodzi w fazę M po bardzo krótkim okresie przerwy, bez występowania pośredniej fazy S.

Zidentyfikowano wiele genów, których ekspresja zależy od stanu wzrostu komórek. Ekspresja tych genów zmienia się, kiedy komórki modyfikują swój stan wzrostu (np.: ze stanu proliferacji do braku proliferacji i odwrotnie). Również stymulacja czynnikami wzrostu lub inhibitorami wzrostu może wywoływać tego typu zmiany, natomiast zmian ekspresji nie obserwuje się w etapach cyklu komórkowego. Mniejsza liczba genów jest regulowana przez cykl komórkowy a ekspresja jest ograniczona do określonej fazy cyklu komórkowego. Niektóre geny regulowane przez wzrost lub cykl komórkowy są niezbędne do proliferacji komórek, ale nie są regulatorami proliferacji. Przykłady obejmują geny kodujące histon zależny od replikacji kinazy tymidynowej lub innych enzymów biorących udział w metabolizmie DNA oraz dekarboksylaza ornityny (ODe) [153]. Inne geny regulujące wzrost mogą nie mieć nic wspólnego stricte z proliferacją, ale mogą odzwierciedlać zróżnicowany status komórki. Na przykład, wiele genów jest indukowanych, gdy spoczynkowe fibroblasty są stymulowane do proliferacji. Fibroblasty proliferują w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki, ale bodźce, które indukują proliferację fibroblastów, również indukują odpowiedź komórek w postaci wytwarzania produktów, które pomogą w naprawie tkanek. Zatem ta klasa genu regulowanego wzrostem jest bardziej prawdopodobnie związana z funkcją fibroblastów i mniej prawdopodobnie związane z jego zdolnością do proliferacji [153].

Dane literaturowe dotyczące kontroli proliferacji komórkach wyższych eukariotów w dużej mierze bazują na badaniach fibroblastów w hodowlach [153]. Komórki te dobrze rosną w hodowli i w łatwy sposób wchodzi w odwracalny, spoczynkowy stan, gdy konfluencja wzrasta a pożywka i czynniki wzrostu zostają wyczerpane. Dzięki badaniom zidentyfikowano szereg czynników wzrostu stymulujących proliferację fibroblastów. Szczególnie dobrze spisały się trzy: płytkopochodny czynnik wzrostu (pDGF), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) i insulinopodobny czynnik wzrostu-I (IGF-I) [153]. Wszystkie trzy są polipeptydami, które wiążą się z receptorami

powierzchniowymi komórki posiadającymi wewnętrzną aktywność białkowej kinazy tyrozynowej. PDGF, EGF i IGF-I są mitogenne dla wielu typów komórek, w tym wielu rodzajów fibroblastów. Czynniki wzrostu PDGF, EGF odgrywają główną rolę w stymulacji fibroblastów w celu przejścia z fazy  $G_0$  do wczesnych etapów fazy  $G_1$ . IGF-1 głównie działa w późnych etapach fazy  $G_1$  i w przechodzeniu w fazę S. Większość komórek wymaga co najmniej dwóch z tych czynników [153]. Przejście fazowe S osiągając szczyt odpowiednio około 30 i 100 minut po stymulacji przez PDGF lub EGF.

### **2.2.3. Apoptoza**

Organizm ludzki w pewnym sensie polega na balansie tworzenia nowych komórek oraz obumieraniu komórek starych lub nie funkcjonujących. Dzieje się to od początku do końca życia i powoduje to, że w pewnym sensie co jakiś czas wymieniamy nasze stare ciało na nowe. Podstawowym procesem zapewniającym tego typu wymianę pokoleniową komórek jest apoptoza. Komórki stale muszą być „wymieniane” na nowe przykładowo czerwone krwinki funkcjonują przez około 120 dni. Kiedy komórki są już wyeksploatowane wchodzi na jedną z kilku ścieżek apoptozy i w naturalny, zaprogramowany sposób obumierają by następnie zostać zastąpione przez nowe komórki. Bardzo ważną funkcją apoptozy będzie również pozbywanie się komórek zmienionych, uszkodzonych, potencjalnie mogących przejść transformację nowotworową itp. Ta funkcja zabezpiecza nasz organizm przed wieloma chorobami i ich konsekwencjami. Zaprogramowana śmierć komórki to proces skomplikowany, który możemy podzielić na dwie główne szlaki: szlak wewnętrzny nazywany też mitochondrialnym oraz szlak zewnętrzny określany również mianem szlaku receptora śmierci [107, 108]. Dawniej obydwie drogi śmierci komórki były od siebie odseparowane jednak aktualnie wiemy, że obydwie szlaki są ze sobą powiązane i mogą wpływać wzajemnie na siebie. Poza dwoma głównymi typami istnieje również jeden dodatkowy, w którym swoją rolę wykazuje cytotoksyczność limfocytów T oraz śmierć komórki zależną od perforyny-granzymu [107, 108].

### 2.2.3.1. Szlak wewnętrzny

W tym typie apoptozy poprzez wewnętrzne szlaki sygnalizacyjne dochodzi do inicjacji apoptozy. W skład całego procesu wchodzi różnego rodzaju bodźce nie powiązane z receptorami. Sygnały tego typu oddziałują na wybrane cele we wnętrzu komórki a cały proces jest inicjowany przez mitochondria [106]. Sygnały wytwarzane przez bodźce mogą działać w sposób negatywny i pozytywny. Pozytywnymi sygnałami mogą być: niedotlenienie, infekcje wirusowe, toksyny, hipertermia, promieniowanie jonizujące i wolne rodniki tlenowe. Sygnały pozytywne powodują zmiany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej prowadzi to do otwarcia przejściowych porów przepuszczalności mitochondriów, uwolnienia dwóch głównych grup białek proapoptotycznych z przestrzeni międzybłonowej do cytozolu i utraty potencjału przebłonowego. Pierwsza grupa białek składa się z Smac/DIABLO, cytochromu C oraz proteazy serynowej HtrA2/Omi. Białka te prowadzą do aktywacji szlaku mitochondrialnego zależnego od kaspazy. Cytochrom C aktywuje i wiąże prokaspazę-9 i Apaf-1 (ang. Apoptotic protease activating factor 1) tworząc apoptosom, natomiast tak zgrupowana prokaspaza-9 aktywuje kaspazę-9. HtrA2/Omi i Smac/DIABLO działają jako promotory apoptozy poprzez hamowanie aktywności inhibitorów białek apoptozy (IAP) [107, 108]. Druga grupa białek proapoptotycznych działa znacznie później, bo po śmierci komórki. Do tej grupy należą: AIF (ang. Apoptosis Inducing Factor), CAD (Ang. caspase-activated deoxyribonuclease) i endonukleaza G. W wyniku działania AIF, który przemieszcza się do jądra komórkowego, dochodzi do powstania wczesnej formy kondensacji jądrowej. Zachodzi to poprzez fragmentację DNA na kawałki o długości między 50 a 300 tysięcy par zasad oraz kondensację obwodowej chromatyny jądrowej. Endonukleaza G również wędruje do jądra, gdzie wywołuje reakcję rozszczepienia chromatyny jądrowej w celu powstania fragmentów oligonukleosomalnego DNA. Obydwa białka są niezależne od kaspazy. Po zakończeniu oddziaływań AIF i endonukleazy G z mitochondriów zostaje uwolniony CAD, który również przemieszcza się do jądra. CAD w jądrze jest rozszczepiany przez kaspazę-3 [107, 108]. Rozszczepiony CAD niesie za sobą reakcję powodującą fragmentację oligonukleosomalnego DNA i wyraźnej, zaawansowanej kondensacji chromatyny. Za kontrolę i regulację tego typu apoptotycznych zdarzeń mitochondrialnych odpowiadają białka z rodziny Bcl-2. Grupa Bcl-2 może działać zarówno antyapoptotycznie jak i proapoptotycznie poprzez regulację przepuszczalności błony mitochondrialnej. Najprawdopodobniej regulacja przepuszczalności błony

oznaczają zmiany w poziomach uwalniania cytochromu c i co za tym idzie, regulację procesów apoptotycznych.

### **2.2.3.2. Szlak zewnętrzny**

W przeciwieństwie do szlaku wewnętrznego apoptozy u podstaw działania szlaku zewnętrznego stoją szlaki sygnalizacyjne aktywujące apoptozę, a w całej reakcji pośredniczą receptory transbłonowe. W skład uczestniczących w reakcji receptorów wchodzi receptory śmierci należące do nadrodziny genów receptora czynnika martwicy nowotworu (TNF) [106, 107, 108]. Receptory TNF wyróżniają się podobnymi do siebie domenami pozakomórkowymi bogatymi w cysteinę oraz posiadają domenę cytoplazmatyczną składającą się z około 80 aminokwasów określanych mianem „domeny śmierci” cFunkcją domeny jest przekazywanie sygnału śmierci z powierzchni komórki do jej wewnętrznych szlaków sygnałowych. Na ten moment najlepiej poznanymi ligandami i odpowiadające im receptory śmierci to: TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4, Apo2L/DR5 i FasL/FasR. Dobrze zdefiniowaną sekwencję zdarzeń szlaku zewnętrznego odnajdziemy w modelu FasL/FasR i TNF- $\alpha$ /TNFR. Na początku całego procesu dochodzi tutaj do grupowania receptorów i wiązania z homologicznym ligandem trymetrycznym [106, 107, 108]. W kolejnym etapie rekrutowane są białka cytoplazmatyczne, na których odnajdziemy odpowiednie domeny śmierci wiążące się z receptorami. Wiązanie liganda Fas z receptorem Fas prowadzi do wiązania białka adaptorowego domeny śmierci FADD (ang. Fas Associated Death Domain), natomiast współmiernie wiązanie liganda TNF z receptorem TNF skutkuje wiązaniem białka adaptorowego TRADD (ang. TNF receptor-associated death domain) z rekrutacją FADD i RIP (ang. receptor-interacting protein). Dalej, FADD łączy się z prokaspazą-8 w wyniku dimeryzacji domeny efektorowej śmierci. W ten sposób dochodzi do wytworzenia kompleksu sygnalizacyjnego indukującego śmierć (DISC) co prowadzi do aktywacji prokapsazy-8. Po tym etapie rozpoczyna się faza wykonawcza apoptozy. Również ten szlak apoptotyczny wymaga regulacji [106, 107, 108]. Do regulacji poprzez hamowanie przystosowane jest białko c-FLIP, które wiąże się z kaspazą-8 i FADD co czyni je nieskutecznymi. Inny punkt regulacji apoptozy obejmuje białko Toso, które blokuje indukowaną przez Fas apoptozę w limfocytach T poprzez hamowanie przetwarzania kaspazy-8.

### 2.2.3.3. Szlak perforynowo-granzymowy

Cytotoksyczność wyrażana za pośrednictwem limfocytów T to rodzaj wrażliwości komórek CD8<sup>+</sup> w, której zabijane są komórki niosące antygeny. Dochodzi tutaj do zabijania komórek poprzez działanie szlaku zewnętrznego i interakcje z FasL/FasR [91, 98, 107,]. Jednak cechą charakterystyczną będzie tutaj występowanie nowego szlaku reakcji, w którym na komórki zakażone wirusem i komórki nowotworowe działać cytotoksycznie będą wydzielane przez błonowo cząsteczki tworzące pory perforyny z dalszym egzofitycznym uwalnianiem granulek cytoplazmatycznych przez pory i do komórek docelowych. Głównymi składnikami granulek są w tym wypadku proteazy serynowe, granzym A i granzym B. Funkcją granzymu B będzie rozszczepianie białek w miejscu reszt asparagianu a co za tym idzie aktywacja prokaspazy-10 i rozszczepianie czynników takich jak ICAD (inhibitor DNAzy aktywowanej kaspazy) [91, 98, 107,]. Poza tymi funkcjami granzym B wykorzystuje również szlak mitochondrialny do wzmacniania sygnału śmierci. Dochodzi do tego poprzez cięcie Bid i indukcję uwalniania cytochromu c. Kolejną funkcją granzymu B jest bezpośrednia aktywacja kaspazy-3. Granzym B tym sposobem omija szlaki sygnalizacyjne i bezpośrednio indukuje fazę wykonawczą apoptozy. Granzym A to również ważny składnik cytotoksyczności limfocytów T, który, poza tym aktywuje szlaki niezależne od kaspazy. W komórkach granzym A aktywuje proces nacinania DNA przez DNAzę NM23-H1, która jest produktem genu supresorowego guzów [91, 98, 107,]. DNAza NM23-H1 pełni ważną rolę w zapobieganiu rozwojowi guzów nowotworowych powodując apoptozę komórek nowotworowych. Działanie DNAzy NM23-H1 regulowane jest przez białko składające się z nukleosomów SET, które hamuje działanie genu NM23-H1. Proteaza granzymu A rozcina kompleks SET zatrzymując tym sposobem inhibicję NM23-H1, który powoduje apoptotyczną degradację DNA. SET poza funkcją inhibitora NM23-H1 odgrywa również ważną rolę w strukturze chromatyny i naprawie DNA. Białka tworzące kompleks SET współpracują w celu ochrony chromatyny i struktury DNA a inaktywacja kompleksu przez granzym A przyczynia się do apoptozy w wyniku blokowania zachowania integralności struktury DNA i chromatyny [91, 98, 107,].

#### 2.2.3.4. Szlak wykonawczy

Zwieńczeniem działania szlaków wewnętrznego i zewnętrznego będzie szlak wykonawczy. Końcowy etap apoptozy komórki jest aktywowany przez kaspazy wykonawcze. Enzymy te aktywują endonukleazę cytoplazmatyczną, która degradowuje materiał jądrowy oraz proteazy, które degradowują białka cytoszkieletowe i jądrowe. W skład działających na tym etapie kaspaz wymienić możemy: kaspazę 3, 6 i 7 [67, 107]. Działają one jako kaspazy efektorowe. Prowadzą do rozszczepienia różnych substratów w tym PARP, cytokreatyny, białka cytoszkieletu i błony komórkowej, alfa fodryny, białko jądrowe NuMA itp. A cała reakcja prowadzi do zmian biochemicznych i morfologicznych obserwowanych w komórkach apoptotycznych. Najważniejszą w tych procesach jest kaspaza-3, aktywowana przez jedną z kaspaz inicjujących (kaspaza-8, 9 i 10). Kaspaza-3 aktywuje endonukleazę CAD. W komórkach proliferujących CAD tworzy kompleks z inhibitorem ICAD [67, 107]. Rolą kaspazy-3 w komórkach apoptotycznych będzie uwalnianie CAD z kompleksu z ICAD. Aktywny CAD degradowuje chromosomalne DNA w jądrach komórkowych i powoduje kondensację chromatyny. Do działań kaspazy-3 zalicza się również rozpad komórki na ciała apoptotyczne oraz reorganizację cytoszkieletu. Jednym z głównych substratów aktywnej kaspazy-3 w procesie reorganizacji cytoszkieletu będzie białko gelsolina. Gelsolina wiąże bifosforan fosfadytyloinozytolu łącząc organizację aktyny i transdukcję sygnału oraz działa jako jądro do polimeryzacji aktyny [67, 107]. Kaspaza-3 rozszczepia gelsolinę, natomiast fragmenty gelsoliny rozszczepiają włókna aktynowe powodując w ten sposób przerwanie cytoszkieletu, transdukcję sygnału i podział komórek. Ostatnim składnikiem procesu apoptozy jest fagocytarny wychwyty komórek apoptotycznych i ich fragmentów. W tym etapie charakterystycznymi reakcjami są eksternalizacja fosfadytyloseryny oraz asymetria fosfolipidów. Translokacja fosfadytyloseryny do zewnętrznego płata komórki wiąże się z utratą aktywności translokazy aminofosfolipidowej i niespecyficznym przerzutem fosfolipidów różnych klas. Występowanie fosfadytyloseryny na zewnętrznych częściach komórek apoptotycznych ułatwia ich niepowiązaną z reakcją zapalną identyfikację fagocytarną co następnie umożliwia wcześniejsze pobieranie i usuwanie komórek apoptotycznych [67, 107]. Wczesny i skuteczny proces wychwyty komórek bez uwalniania ich zawartości pozwala na zachodzenie reakcji bez udziału stanu zapalnego.



#### 2.2.4. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem spowodowanym brakiem równowagi pomiędzy produkcją i akumulacją reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach i tkankach a zdolnością układu biologicznego do detoksykacji tych reaktywnych produktów. Reaktywne formy tlenu odgrywają kilka ról fizjologicznych i są normalnie generowane jako produkty uboczne metabolizmu tlenu [180]. Mimo to czynniki stresu pochodzące ze środowiska (promienie UV, promieniowanie jonizujące, metale ciężkie) oraz ksenobiotyki (leki) przyczyniają się do znacznego zwiększenia produkcji RFT, powodując w ten sposób zaburzenia równowagi, które prowadzą do uszkodzenia komórek i tkanek (stres oksydacyjny). Różnego rodzaju substancje takie jak witamina E, polifenole i flawonoidy mogą ograniczać negatywne wpływy środowiska i samych RFT na ciało człowieka. Rodniki nadtlenkowe ( $O_2^{\cdot-}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodniki hydroksylowe ( $\cdot OH$ ) i tlen singletowy ( $^1O_2$ ) to powszechnie definiowane reaktywne formy tlenu [180]. Są wytwarzane jako metaboliczne produkty uboczne przez układy biologiczne. Procesy, takie jak fosforylacja białek, aktywacja czynników transkrypcyjnych, apoptoza, odporność i różnicowanie, są zależne od prawidłowej produkcji RFT i obecności wewnątrz komórek. Kiedy wzrasta produkcja RFT, może dochodzić do występowania szkodliwego wpływu na ważne struktury komórkowe (lipidy, białka i kwasy nukleinowe). Dane literaturowe wskazują na związek intensywności produkcji RFT a różnymi chorobami (nowotwory, zaburzenia metabolizmu i co ważne w odniesieniu do tematu rozprawy- miażdżycy tętnic). Główną strukturą wytwarzającą RFT są mitochondria. Produkcja reaktywnych form tlenu będzie zachodzić zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych. Oznacza to, że  $O_2^{\cdot-}$  może być wytwarzany przez lipooksygenazy (LOX), cyklooksygenazy (COX), w oddychaniu komórkowym, podczas procesów metabolizmu kwasu arachidonowego oraz przez komórki zapalne i śródbłónka. Do obrony antyoksydacyjnej komórki wykorzystują system oparty na działaniu składników enzymatycznych takich jak katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx) i dysmutaza nadtlenkowa (SOD) [176, 180].

Produkcja wolnych rodników opiera się na reakcjach enzymatycznych i nieenzymatycznych. Reakcje enzymatyczne zdolne do generowania aktywnych form tlenu związane są z łańcuchem oddechowym, układem cytochromu P450, fagocytozą i syntezą prostaglandyn. Rodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ) jest generowany przez oksydazę NADPH, oksydazę ksantynową i peroksydazy. Po utworzeniu bierze udział w kilku reakcjach, które z kolei generują nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy ( $OH^{\cdot}$ ), nadtlenoazotyn ( $ONOO^{\cdot}$ ) i kwas podchlorawy ( $HOCl$ ). Rodnik hydroksylowy ( $OH^{\cdot}$ ), najbardziej reaktywny spośród wszystkich rodzajów wolnych rodników *in vivo*, powstaje w reakcji  $O_2^{\cdot-}$  z  $H_2O_2$ , z  $Fe^{2+}$  lub  $Cu^+$  jako katalizatorem reakcji (reakcja Fentona). Rodnik tlenku azotu ( $NO^{\cdot}$ ), który pełni ważne funkcje fizjologiczne, jest syntetyzowany w wyniku utleniania argininy do cytruliny przez syntazę tlenku azotu (NOS) [176, 180]. Również reakcje nieenzymatyczne mogą być odpowiedzialne za produkcję wolnych rodników, mówimy tutaj o sytuacjach, kiedy tlen reaguje ze związkami organicznymi lub gdy komórki są wystawione na działanie promieniowania jonizującego, również podczas oddychania mitochondrialnego. Wolne rodniki są generowane zarówno ze źródeł endogennych, jak i egzogennych. Aktywacja komórek odpornościowych, zapalenie, niedokrwienie, infekcja, rak, nadmierne ćwiczenia, stres psychiczny i starzenie się są odpowiedzialne za endogenną produkcję wolnych rodników. Egzogenna produkcja wolnych rodników może wystąpić w wyniku narażenia na zanieczyszczenia środowiska, metale ciężkie (Cd, Hg, Pb, Fe i As), niektóre leki (cyklosporyna, takrolimus, gentamycyna i bleomycyna), rozpuszczalniki chemiczne, gotowanie (wędzone mięso, przepracowany olej i tłuszcz), dym papierosowy, alkohol i promieniowanie [176, 180]. Kiedy te egzogenne związki wnikają do organizmu, ulegają rozkładowi lub są metabolizowane, a jako produkty uboczne powstają wolne rodniki.

Wolne rodniki, utrzymywane w niskim lub umiarkowanym stężeniu, pełnią kilka korzystnych funkcji dla organizmu. Na przykład są potrzebne do syntezy niektórych struktur komórkowych i do wykorzystania przez system obronny gospodarza do zwalczania patogenów. W rzeczywistości fagocyty syntetyzują i przechowują wolne rodniki, aby móc je uwolnić w celu zniszczenia atakujących organizm mikroorganizmów. Wolne rodniki biorą również udział w szeregu komórkowych szlaków sygnałowych. Mogą być wytwarzane przez nefagocytyjące izoformy oksydazy NADPH; w tym przypadku wolne rodniki odgrywają kluczową rolę regulacyjną w

wewnątrzkomórkowych kaskadach sygnałowych w kilku typach komórek, takich jak fibroblasty, komórki śródbłonka, komórki mięśni gładkich naczyń, miocyty serca i tkanka tarczycy [174, 176, 180]. Dobrze poznanym wolnym rodnikiem działającym jako cząsteczka sygnałowa jest tlenek azotu (NO). Jest ważnym przekaźnikiem międzykomórkowym wymagany do prawidłowej modulacji przepływu krwi, zaangażowany w zakrzepicę i ma kluczowe znaczenie dla prawidłowej aktywności neuronów. Tlenek azotu bierze również udział w niespecyficzej obronie gospodarza, wymaganej do eliminacji wewnątrzkomórkowych patogenów i komórek nowotworowych. Innym fizjologicznym działaniem wolnych rodników jest indukowanie odpowiedzi mitogennej.

Wolne rodniki poza swoimi fizjologicznymi działaniami mogą również wykazywać działania patologiczne. W tego typu reakcjach dochodzi do powstania zjawiska stresu oksydacyjnego, szkodliwego procesu, który może negatywnie wpływać na struktury komórkowe między innymi błony komórkowe, lipidy, białka, lipoproteiny i kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). Stres oksydacyjny pojawia się, gdy istnieje brak równowagi między powstawaniem wolnych rodników a zdolnością komórek do ich usuwania. Na przykład nadmiar rodników hydroksylowych i nadtlenoazotynów może powodować peroksydację lipidów, uszkadzając w ten sposób błony komórkowe i lipoproteiny [176, 180]. To z kolei doprowadzi do powstania dialdehydu malonowego (MDA) i sprzężonych związków dienowych, o których wiadomo, że są zarówno cytotoksyczne, jak i mutagenne. Będąc rodnikową reakcją łańcuchową, peroksydacja lipidów rozprzestrzenia się bardzo szybko, wpływając na dużą ilość cząsteczek lipidowych. Również białka mogą ulegać uszkodzeniu w wyniku stresu oksydacyjnego, w tym wypadku dochodzi do modyfikacji konformacyjnych, które mogą determinować utratę lub upośledzenie ich aktywności enzymatycznej. Również wcześniej wymienione DNA nie jest odporne na uszkodzenia związane ze stresem oksydacyjnym, z których najbardziej reprezentatywnym jest formacja 8-okso-2'-deoksyguanozyny (8-OHdG); jest to szczególnie szkodliwa zmiana DNA, która może być odpowiedzialna za mutagenozę [162]. Może również powodować utratę informacji epigenetycznej. Stres oksydacyjny, jeśli nie jest ściśle kontrolowany, może być odpowiedzialny za indukcję wielu chorób, zarówno przewlekłych, jak i zwyrodnieniowych, a także przyspieszać proces starzenia się organizmu i powodować ostre patologie (urazy i udary mózgu).

#### **2.2.4.1. Rola wybranych enzymów i substancji o charakterze ochronnym przed stresem oksydacyjnym**

W pracy poza ekspresją miR sprawdzono również kilka wybranych substancji i enzymów mających na celu ochronę przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego. Badanymi czynnikami były: SOD (dysmutaza ponadtlenkowa), GPx (Peroksydaza glutationowa), GST (s-transferaza glutationowa), GR (reduktaza glutationowa) i GSH (glutation).

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) odgrywa bardzo ważną rolę jako defensywa antyoksydacyjna organizmu przed stresem oksydacyjnym [181]. Enzym działa jako dobry środek terapeutyczny przeciwko chorobom, w których pośredniczą reaktywne formy tlenu. Dysmutazy ponadtlenkowe to grupa metaloenzymów. SOD stanowią pierwszą linię obrony przed urazami, w których pośredniczą reaktywne formy tlenu. Białka te katalizują dysmutację anionu ponadtlenkowego wolnego rodnika ( $O_2^-$ ) do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i obniżają poziom  $O_2^-$ , który przy nadmiernym stężeniu uszkadza komórki. Enzym może służyć jako środek przeciwzapalny, a także może zapobiegać zmianom przedrakowym komórek [181]. Naturalne poziomy SOD w organizmie spadają wraz ze starzeniem się organizmu, a zatem wraz z wiekiem człowiek staje się bardziej podatny na choroby związane ze stresem oksydacyjnym. Badania donoszą, że SOD ma ważny związek z kilkoma problemami zdrowotnymi człowieka w tym zaburzeniami związanymi z erytrocytami, mukowiscydozą, zespołem bólu po cholecystektomii, wrażliwym na steroidy zespołem nerczycowym, stwardnieniem zanikowym bocznym, apoptozą neuronów, AIDS. Dodatkowo niektórzy badacze sugerowali silny związek między aktywnością SOD a chorobą Alzheimera [181]. W wielu modelach zwierzęcych z uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym mięśnia sercowego, zapaleniem i uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym mózgu itp. Stwierdzono skuteczność działania SOD. Mimetyki SOD oferują potencjał w leczeniu chorób wynikających ze stresu oksydacyjnego.

Peroksydaza glutationowa (GPx) bierze udział w terminacji szlaku reaktywnych form tlenu, co skutkuje ograniczeniem intensywności procesów stresu oksydacyjnego [181]. GPx katalizuje degradację  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i przyczynia się do komórkowej aktywności przeciwutleniającej wielu organizmów. GPx zawiera seleno-cysteinę w swoim miejscu

aktywnym, w którym selenol (ESeH) rozkłada  $H_2O_2$  do  $H_2O$  poprzez reakcję redoks i utlenia się do kwasu selenowego (ESeOH) [181]. Kwas selenowy przechodzi następnie reakcje redoks z dwoma zredukowanymi glutationami (GSH), aby przejść z powrotem do formy selenolu.

S-transferazy glutationowe (GST) to rodzina enzymów detoksykacyjnych katalizujących sprzężanie glutationu (GSH) z szeroką gamą endogennych i egzogennych związków elektrofilowych [182]. GST są podzielone na dwóch odrębnych członków nadrodziny: członków rodziny mikrosomalnej i cytozolowej związanej z błoną. Ludzkie cytozolowe GST są wysoce polimorficzne. Odgrywają rolę regulacyjną w ścieżce kinazy białkowej aktywowanej mitogenem, która uczestniczy w sygnałach przeżycia i śmierci komórek poprzez interakcje białko:białko z c-Jun N-końcową kinazą 1 (JNK1) i ASK1 (kinaza regulująca sygnał apoptozy) [182, 183]. JNK i ASK1 są aktywowane w odpowiedzi na stres komórkowy. GST są zaangażowane w rozwój oporności na środki chemioterapeutyczne. Sugeruje się, że GST pełnią dwie różne role w rozwoju lekooporności poprzez bezpośrednią detoksykację, a także działają jako inhibitor szlaku kinazy MAP. GST są obiecującym celem terapeutycznym ze względu na fakt występowania nadekspresji określonych izozymów w wielu różnych nowotworach. Poza chorobami nowotworowymi sugeruje się ich rolę w etiologii innych chorób: neurodegeneracyjnych, stwardnieniu rozsianym oraz astmie [182, 183].

Reduktaza glutationowa (GR) to powszechnie występujący tiol redukujący odpowiedzialny za utrzymanie podaży zredukowanego glutationu (GSH) [184]. W swojej zredukowanej formie glutation odgrywa kluczową rolę w komórkowej kontroli reaktywnych form tlenu. Reaktywne formy tlenu działają jako wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe molekuly sygnalizacyjne, a złożone reakcje krzyżowe między poziomami reaktywnych form tlenu, poziomami utlenionego i zredukowanego glutationu i innych tioli oraz enzymami przeciwutleniającymi, takimi jak reduktaza glutationu, określają najbardziej odpowiednie warunki dla kontroli redoks w komórce lub do aktywacji zaprogramowanej śmierci komórki [184].

### 2.3. Układ krwionośny

Generalny urząd statystyczny zbierając i prezentując dane umieralności Polских obywateli w jasny sposób ukazuje jak wielkim problemem są w Polsce choroby układu krążenia, które od lat są na pierwszym miejscu śmiertelności. Rocznie nawet nowotwory nie doprowadzają do tak wielu zgonów jak choroby krążenia. Dzięki tego typu statystykom wiemy jak ważne jest badanie problemów występujących w tym układzie i jak bardzo potrzebne społeczeństwu są metody wczesnego wykrywania rozwoju różnych chorób. Serce, tętnice, żyły i wypełniające ją krew razem składają się na cały układ krążenia, którego zadaniem jest doprowadzenie tlenu i składników odżywczych do wszystkich komórek organizmu ludzkiego. Człowiek rodząc się i biorąc pierwszy oddech rozpoczyna cykl trwający aż do samej śmierci. Nie bez przyczyny w dawnych czasach medycyna za śmierć człowieka uznawała zatrzymanie pracy serca oraz zatrzymanie oddechu. Szczególnym procesem związanym z oddychaniem i pracą układu krążenia jest wysycanie tlenem krwi i dostarczanie tego pierwiastka do komórek. Komórki ciała potrzebują tlenu do wytworzenia energii w postaci ATP (Adenozyno-5'-trifosforan) w procesie fosforylacji oksydacyjnej a sam proces przebiega w mitochondriach, czyli organellach komórkowych które w prosty sposób możemy określić mianem fabryk energii [186, 190, 191]. Układ krwionośny człowieka jako układ zamknięty poprzez pompowanie krwi doprowadza do jej stałego obiegu. Krążenie płucne i ogólnoustrojowe jest połączone poprzez serce i jego struktury w taki sposób, aby dochodziło do pompowania krwi z lewej komory do narządów ogólnoustrojowych a następnie powrotu krwi do prawej komory i transportu do płuc, gdzie ponownie nastąpi wymiana gazowa. Tkanki organizmu są połączone w sposób równoległy i w następstwie tego obserwuje się, że objętość wyrzutowa lewej komory jest dzielona pomiędzy różne narządy, ale tylko ściśle określona ilość krwi przepływa przez dany narząd przed wejściem do żylnego obiegu narządu [186, 190, 191]. Stwierdzono również, że ciśnienie krwi oraz skład krwi tętniczej na wejściu do każdego narządu jest są takie same. Co ważne organizm posiada funkcję lokalnej regulacji przepływu krwi co pozwala na niezależną regulację w każdym narządzie.

### 2.3.1. Tętnice

Omawiając zagadnienie ekspresji miRNA związanych z procesami zachodzącymi w układzie krwionośnym nie można pominąć charakteryzacji narządu czy też tkanki docelowej jakimi w tym wypadku są tętnice. Stanowiące znaczącą część układu krwionośnego tętnice składają się z trzech warstw. Najbardziej zewnętrzna warstwa ściany tętnic określana jest mianem Przydanki (ang. adventitia) [204]. Jednym z podstawowych zadań tej struktury jest odpowiednie łączenie tętnic z otaczającymi je tkankami. Zapewnia to połączenie między innymi z nerwami naczyniowymi które będą kontrolowały działanie mięśni gładkich znajdujących się w tętnicach oraz ogólne stabilne umiejscowienie tętnic z jednoczesnym ograniczeniem ich ruchomości co zapewnia efektywny i stabilny tryb ich pracy. Kolejną umiejscowioną głębiej warstwą jest błona środkowa lub warstwa środkowa (ang. media, middle layer; łac. *tunica media*) składająca się w większości z mięśni gładkich posiadających zdolność skurczania i rozkurczania co umożliwia regulację ciśnienia krwi przepływającej przez tętnice [204]. Kolejno kurczące się mięśnie będą prowadziły do zwiększenia ciśnienia i przeciwnie rozkurczając się doprowadzą do zmniejszenia ciśnienia krwi. Ostatnia, znajdująca się najgłębiej warstwa nazywana jest błoną wewnętrzną lub warstwą wewnętrzną (ang. intima, łac. *Tunica intima*). Warstwa wewnętrzna podobnie do warstwy środkowej w swojej budowie zawierać będzie mięśnie gładkie, ale dodatkowo również białko elastynę oraz jednokomórkową warstwę śródbłonna naczyniowego. To właśnie warstwa wewnętrzna tworzy właściwy kanał, przez który to będzie przepływać bogata w tlen krew do odpowiednich miejsc perfuzji [204]. Tak zbudowana tętnica będzie zapewniała wytrzymałe i wolne od przecieków środowisko do transportu krwi.

Mięśnie gładkie budujące tętnice to mięśnie nieprążkowane otaczające naczynie, zapewniające integralność i wsparcie całej tętnicy. Poza rolę strukturalną mięśnie gładkie tak jak już wcześniej wspomniano posiadają zdolność kurczenia i rozkurczania co ma zapewnić dynamiczną zmianę ciśnienia krwi [192, 197, 204]. Do skurczu i rozkurczu mogą przyczyniać się różne bodźce zaczynając od najbardziej podstawowych sygnałów nerwowych układu współczulnego wykorzystującego adrenalinę, która to oddziałuje z receptorami alfa-adrenergicznymi powodując zwężenie tętnicy i wzrost ciśnienia. Inne czynniki wpływające na te procesy to substancje takie jak angiotensyna II czy epinefryna. Innym narządem, który pośrednio może wpływać na procesy

wazodylatacji i wazokonstrykcji są nerki. Nerki uwalniając reninę, proteolityczny enzym pozwalają na tworzenie angiotensyny II, która jest silnym czynnikiem wazokonstrykcyjnym. Podsumowując interakcje układu hormonalnego i nerwowego pozwalają na występowanie zmian zapewniających homeostazę.

W większości ogólnych przypadków krew tętnicza przepływa pod największym ciśnieniem jednak odstępstwem od większości tętnic jest tętnica płucna, w której nienatleniona krew jest transportowana do płuc [192, 197, 204]. Krew w tętnicy płucnej przepływa pod niższym ciśnieniem, ponieważ jej obieg jest napędzany przez skurcze prawej komory serca która jest słabsza od lewej komory uznawanej za najsilniejszą część serca pompującą krew do największej z tętnic nazywanej aortą. Lewa komora i zaopatrywana przez nią w krew aorta, musi pracować z większą siłą, ponieważ jej zadaniem jest doprowadzenie krwi do wielu struktur poprzez rozwidlające się dalej sekcje aorty. Aorta w dalszych swoich częściach rozdziela się na aortę wstępującą, łuki aorty, aortę piersiową zstępującą i aortę brzuszną [192, 197, 204]. Część wstępująca rozciąga się ponad obszar serca i dalej rozdziela się w tętnicy szyjnej zaopatrującej struktury mózgu w krew. Aorta brzuszna przenosi krew do tętnic biodrowych, gdzie dalej zapewnia ukrwienie narządów wewnętrznych w okolicy brzucha. Łuk aorty przenosi krew do obszarów pleców i szyi. Ostatnia część, aorta zstępująca doprowadza krew do mniejszych naczyń w klatce piersiowej i obszarze, gdzie znajdują się żebra.

### **2.3.2. Komórki śródbłonna**

Śródbłonek naczyniowy (łac. *endothelium*) to jednokomórkowa warstwa pokrywająca od wewnątrz ściany naczyń krwionośnych. Posiada ściśle kompleksy połączeń międzykomórkowych prowadzących do wytworzenia komórkowej, selektywnej bariery między tkankami a krwią [197, 204]. Do funkcji endothelium zaliczymy funkcje wykonawcze i czuciowe. Komórki śródbłonna wytwarzają cząsteczki regulujące procesy zapalne, napięcie naczyń, przebudowę naczyń oraz krzepliwość krwi. W przypadku zdrowej tkanki śródbłonna nie powinno dochodzić do wewnątrznaczyniowego wykrzepiania się krwi. W przypadku uszkodzenia lub braku śródbłonna w naczyniu dochodzić będzie do migracji komórek mięśni gładkich a w przypadku regeneracji śródbłonna tego typu zmiany zostają zahamowane. Ważnym



czynnikiem wpływającym na morfologię endothelium będzie siła ścinająca płynu (krwi) [197, 204]. Ta wartość fizyczna różnić się będzie pomiędzy danymi fragmentami układu krwionośnego. W rurkowatych tętnicach charakteryzujących się równomiernym przepływem krwi komórki śródbłonka mają kształt elipsoidalny i ustawiają się zgodnie z kierunkiem przepływu krwi natomiast w przypadku miejsc w których dochodzi do powstawania zakrzywień i rozgałęzień przepływ płynu będzie określany mianem burzliwego co prowadzi do zmiany kształtu komórek śródbłonka na wielokątne bez widocznej definiowanej orientacji. Obszary charakteryzujące się zaburzonym i turbulencyjnym przepływem krwi są narażone na uszkodzenia w warstwie śródbłonka oraz wykazują wzmożoną przepuszczalność dla makrocząsteczek typu LDL [197, 204]. Tak narażone obszary wykazują zwiększoną tendencję do powstawania zmian miażdżycowych.

### **2.3.3. Funkcje wybranych czynników na układ krwionośny i śródbłonek naczyniowy**

W pracy zbadano również czynniki wywierające wpływ na funkcjonowanie układu krwionośnego oraz śródbłonka naczyniowego. Wymienione czynniki to: Angiopoetyna, VEGF (czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego), EGF (naskórkowy czynnik wzrostu), FGF $\alpha$  (czynniki wzrostu fibroblastów alfa), FGF  $\beta$  (czynniki wzrostu fibroblastów beta), IL-6 (interleukina 6), BMPs (białka morfogenetyczne kości) oraz MMPs (metaloproteinazy macierzy).

Angiopoetynę możemy podzielić na 4 podjednostki (Angiopoetyna 1-4). Reprezentują one ważną rodzinę czynników wzrostu w, których działaniu pośredniczą kinazy tyrozynowe Tie1 i Tie2. Do tej pory w literaturze najlepiej scharakteryzowano angiopoetynę 1 (Ang1) i angiopoetynę 2 (Ang2) [214]. Angiopoetyna-1 jest silnym czynnikiem wzrostu przekazującym sygnały przez Tie2. Angiopoetyna-2 wykazuje zależne od kontekstu działanie agonistyczne a dysregulacja jej ekspresji jest charakterystyczna dla wielu chorób. W warunkach fizjologicznych Ang2 działa jako antagonistą w komórkach śródbłonka krwi. Ang2 odgrywa kluczową rolę w chorobach związanych z przepuszczalnością naczyń i angiogenezą [214]. Jego właściwości niszczące naczynia krwionośne ukazano w modelu mysim, gdy transgeniczne myszy z

nadekspresją Ang2 były embrionalnie śmiertelne z powodu słabo uformowanych naczyń krwionośnych. Jeśli chodzi o patologiczną angiogenezę, rola Ang2 była głównie badana w angiogenezie indukowanej przez nowotwór, gdzie jej hamowanie lub nadekspresja odpowiednio zmniejszała lub zwiększała rozmiar guza i skuteczność przerzutów. Zaobserwowano również uczestnictwo Ang2 w kilku niezależnych od raka stanach zapalnych, takich jak choroby autoimmunologiczne, posocznica i ostre uszkodzenie płuc [214].

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) jest głównym regulatorem fizjologicznej i patologicznej angiogenezy [206, 213,]. (VEGF) jest mitogenem specyficznym dla komórek śródbłonna *in vitro* i induktorem angiogennym w różnych modelach *in vivo*. Wykazano, że niedotlenienie jest głównym induktorem transkrypcji genu VEGF. W angiogenezie rozwojowej rola VEGF jest podkreślona przez odkrycie, że utrata pojedynczego allelu VEGF powoduje wadliwe unaczynienie i wczesną śmiertelność zarodków [206, 213]. VEGF ma również kluczowe znaczenie dla angiogenezy rozrodczej i kostnej. Sugeruje się również, że VEGF jest mediatorem patologicznej angiogenezy. Badania hybrydyzacji *in situ* wykazały ekspresję mRNA VEGF w większości ludzkich nowotworów [206, 213]. Przeciwciała monoklonalne anti-VEGF i inne inhibitory VEGF blokują wzrost kilku linii komórek nowotworowych u myszy a przeciwciało monoklonalne anti-VEGF (bevacizumab) zostało zatwierdzone przez FDA jako forma leczenia pierwszego rzutu przerzutowego raka jelita grubego w połączeniu z chemioterapią [206, 213]. Ponadto VEGF bierze udział w neowaskularyzacji wewnątrzgałkowej związanej z retinopatią cukrzycową i zwyrodnieniem plamki żółtej związanym z wiekiem.

Naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) to pojedynczy polipeptyd złożony z 53 reszt aminokwasowych, który bierze udział w regulacji proliferacji komórek [212]. Egf wywiera swoje działanie w komórkach docelowych poprzez wiązanie się z receptorem EGF (EGFR) zlokalizowanym w błonie komórkowej. Receptor EGF jest przezbłonową białkową kinazą tyrozynową [212]. Wiązanie EGF z receptorem powoduje aktywację kinazy, a następnie autofosforylację receptora. Prowadzi to do aktywacji kaskady sygnalizacyjnej, która powoduje: proliferację komórek, zmniejszoną apoptozę i angiogenezę. Przegroda pęcherzykowa, która występuje w życiu embrionalnym, opiera się na obecności EGF [212]. Ściana oskrzeli w przewlekłym zapaleniu oskrzeli

wykazuje nadekspresję EGF i EGFR. Komórki nabłonka oskrzeli w astmie wykazują zwiększoną ekspresję EGFR. Aktywacja EGFR zachodzi w niedrobnokomórkowym raku płuc przez nadekspresję ligandu i/lub receptorów lub przez częściową delecję receptora, co skutkuje aktywacją niezależną od ligandu [212].

Czynniki wzrostu fibroblastów (FGF) tworzą dużą rodzinę polipeptydowych czynników wzrostu, które występują w różnych organizmach, od nicieni po ludzi [211]. Podczas rozwoju embrionalnego FGF odgrywają różne role w regulowaniu proliferacji, migracji i różnicowania komórek [211]. W organizmie dorosłego FGF są czynnikami homeostatycznymi i działają w naprawie tkanek i odpowiedzi na uraz. W przypadku niewłaściwej ekspresji niektóre FGF mogą przyczyniać się do patogenezy raka. Podzbiór rodziny FGF, wyrażany w dorosłej tkance, jest ważny dla transdukcji sygnału neuronalnego w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym [211].

Interleukina-6 (IL-6) jest jedną z cytokin wykazujących działanie plejotropowe, odgrywającą główną rolę w obronie organizmu gospodarza. IL-6 może wywierać działanie indukujące wzrost, hamujące wzrost i indukujące różnicowanie, w zależności od komórek docelowych [209]. Działania te obejmują końcowe różnicowanie (wydzielanie immunoglobulin) w komórkach B oraz promowanie wzrostu różnych komórek B. IL-6 odgrywa rolę w patologii wielu chorób, w tym szpiczaka mnogiego, mezangialnego proliferacyjnego zapalenia kłębuszków nerkowych, reumatoidalnego zapalenia stawów i zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS) [209]. Selektywne hamowanie syntezy lub działania IL-6 może przynosić korzyści terapeutyczne w przypadku chorób związanych z IL-6. Z drugiej strony, IL-6 ma silną aktywność przeciwnowotworową przeciwko niektórym typom nowotworów [209]. Zastosowanie IL-6 jest obiecujące w leczeniu nowotworów, jak również w leczeniu mielosupresji wywołanej promieniowaniem lub chemioterapią.

Białka morfogenetyczne kości (BMPs) to wielofunkcyjne czynniki wzrostu należące do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF $\beta$ ) [208]. Badania na myszach transgenicznym i z knockoutem genu oraz na zwierzętach i ludziach z naturalnie

występującymi mutacjami w BMP i pokrewnych genach wykazały, że sygnalizacja BMP odgrywa kluczową rolę w rozwoju serca, układu nerwowego i chrząstki [208]. Aktywność BMP jest regulowana na różnych poziomach molekularnych [208]. Badania przedkliniczne i kliniczne wykazały, że BMP-2 można stosować w różnych interwencjach terapeutycznych, takich jak ubytki kostne, złamania bez zrostu, zespolenie kręgosłupa, osteoporoza i chirurgia kanałowa.

Metaloproteinazy macierzy (MMPs) to rodzina dziewięciu lub więcej wysoce homologicznych endopeptydaz  $Zn^{++}$ , które wspólnie rozszczepiają większość, jeśli nie wszystkie składniki macierzy pozakomórkowej [207]. Kolagen, elastyna, żelatyna i kazeina to główne składniki rozszczepiane przez MMP. Rozkład tych składników ma zasadnicze znaczenie dla wielu procesów fizjologicznych, takich jak rozwój embrionalny, morfogeneza, reprodukcja oraz resorpcja i przebudowa tkanek [207]. MMP uczestniczą również w procesach patologicznych, takich jak zapalenie stawów, nowotwory, choroby układu krążenia i neurologiczne.

## **2.4. Miażdżycza**

W przypadku wielu chorób jesteśmy w stanie wykryć pierwsze ich przejawy czy występowanie dzięki wielu dostępnym testom diagnostycznym niestety nie we wszystkich chorobach taka możliwość istnieje a swego rodzaju poważny problem sprawiają choroby rozwijające się przez wiele lat co utrudnia wykrycie objawów ich występowania. Problemem w wolno rozwijających się stanach patologicznych jest również zdolność organizmu do adaptacji do zmieniających się warunków. Tego typu zdolności mogą maskować początkowe jak i nawet późne, poważniejsze objawy. Do takich stanów patologicznych możemy zaliczyć miażdżycę tętnic która bardzo często będzie rozwijać się latami a nawet dekadami niekiedy pozostawiając pacjentów w stanie kompletnie asymptomatycznym nawet w sytuacji zwężeń istotnych hemodynamicznie. Miażdżycza tętnic stoi u podstaw około 50% wszystkich zgonów w społeczeństwach zachodnich i jest głównym czynnikiem wywołującym choroby serca i udary.

### **2.4.1. Charakterystyka miażdżycy**

Miażdżycza tętnic to wolno rozwijająca się choroba naczyń tętniczych charakteryzująca się ich zwężeniem. Do głównymi cech zmiany miażdżycowej należą: akumulacja elementów włóknistych oraz lipidowych [221, 225]. W pierwszych etapach rozwoju zmiany miażdżycowej dochodzi głównie do migracji makrofagów bogatych w cholesterol przez śródbłonek naczyniowy wyściełający od wewnątrz daną tętnicę [221, 222]. Tego typu komórki są nazywane komórkami piankowatymi. W wyniku tego typu migracji w ścianach tętnic powstają tak zwane smugi tłuszczowe (ang. fatty streaks), które to mogą być pierwszymi objawami przyszłego zaawansowanego rozwoju choroby, ponieważ odnajdziemy je już w pierwszej dekadzie życia człowieka z tendencją do występowania w dużych naczyniach typu aorta. Same w sobie smugi nie są jeszcze etapem istotnym klinicznie. Z czasem jednak gromadzące się komórki piankowate prowadzą do występowania zaburzeń funkcjonowania śródbłonka naczyniowego. Badania patologiczne sugerują istotną rolę oksydacyjnie zmienionego LDL, który akumuluje się w błonie wewnętrznej ściany tętnicy (łac. intima) a ingerencją monocytów i tworzeniem się komórek piankowatych [221, 223]. Komórki układu odpornościowego posiadające zdolność przenikania przez barierę śródbłonka naczyniowego z czasem w realny sposób wpływać będą na funkcjonowanie naczynia

krwionośnego. Do nasilonej migracji LDL dochodzi w przypadku osób ze zwiększonymi ponad normę poziomami tych cząsteczek. Lipoproteiny mogą dostawać się do ścian naczyń w sposób pasywny. W występujących zmianach naczyniowych dochodzi również do nasilonej retencji oraz transportu LDL [223, 225]. Zgromadzone w ścianie lipoproteiny zawierają apolipoproteinę B która wchodzi w reakcję z proteoglikanami macierzy. Substancje te mogą gromadzić się w błonie wewnętrznej tętnic i promować powstawanie miażdżycy. Do szczególnie pro-miażdżycogennych substancji możemy zaliczyć również lipoproteinę (a) która wywiera wpływ na fibrylizację i rozrost komórek mięśni gładkich. W mysich modelach badawczych zmniejszonej ilości receptorów lipoprotein o niskiej gęstości oraz deficytu apolipoproteiny E obserwuje się wytworzenie zmian naczyniowych po podawaniu bogatej w cholesterol diety. Warto zwrócić uwagę również na fakt, że makrofagi nie wyłapują natywnego LDL w sposób wystarczająco szybki, aby potem mogły zmienić się w komórki piankowate [223, 225]. Aby zaszły dalsze procesy w makrofagach dochodzi do zmodyfikowania LDL poprzez oksydację, lipolizę, agregację oraz proteolizę. Takie zmiany cząsteczki LDL indukują odpowiedź zapalną oraz tworzenie komórek piankowatych. W początkowych etapach modyfikacje oksydacyjne LDL stanowią kluczowy element powstawania zmian naczyniowych. Oksydacyjnie zmienione LDL mają działanie prozapalne a stan zapalny sam w sobie jest jednym z głównych czynników powodujących rozwój miażdżycy. Po etapie migracji LDL oraz tworzenia komórek piankowatych dochodzi do migracji komórek mięśni gładkich z warstwy środkowej (media) do błony wewnętrznej (intima) [223, 225]. Procesem tym zarządzają między innymi: insulinopodobny czynnik wzrostu, czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego oraz angiotensyna II. Dodatkowo swoją rolę w tym etapie rozwoju zmiany wykazują limfocyty pomocnicze TH1 i TH2, interleukina 1, chemokiny MCP-1, CD40- CD40L oraz cząsteczka adhezji komórek naczyń VCAM-1. Migrujące komórki mięśni gładkich odpowiadają za tworzenie blaszki włóknistej wzbogaconej w kolagen. Struktura ta tworzy się pod śródbłonkiem i chroni ścianę naczyń przed pękaniem blaszki. O występowaniu bardziej zaawansowanej formy blaszki miażdżycowej mówi się w późniejszych etapach życia między 55 a 65 rokiem życia. W zaawansowanych formach zmiany może dochodzić do pęknięcia blaszki. Głównym typem zmiany narażonej na pęknięcie będzie typ o niskiej zawartości komórek mięśni gładkich, bogatą w czynnik tkankowy, lipidy i makrofagi [226]. Ten typ zmiany otoczony będzie wokół cienkiej osłonki włóknistej rdzeniem martwiczym, który

zawiera w sobie kryształy cholesterolu, limfocyty T i makrofagi nasycone cholesterolem. Rozwój rdzenia martwiczego jest ważnym etapem w postępie zaawansowania choroby. We wnętrzu zmiany miażdżycowej może dochodzić do powtarzających się krwotoków, które mają wpływ na rozrost rdzenia martwiczego [226]. Dzieje się to, ponieważ czerwone krwinki są wzbogacone o lipidy i są dodatkowym źródłem cholesterolu. Z czasem w blaszce dochodzi do obumierania nagromadzonych makrofagów. W zaawansowanym stadium zwiększa się również ilość mikronaczyń. Łącznie obumieranie makrofagów, śródpłytkowe krwotoki i zaburzony klirens fagocytarny prowadzą do rozwoju rdzenia martwiczego. W obszarze styczności rdzenia oraz czepka włóknistego oddziaływać będą w niekontrolowany sposób enzymy proteolityczne takie jak metaloproteinazy [221, 226]. Metaloproteinazy powodują odsłonięcie błony wewnętrznej i tworzenie zakrzepu poprzez agregację płytek krwi i aktywację czynników tkankowych. Zakrzep tworzyć się będzie do światła tętnicy ograniczając w ten sposób jeszcze bardziej przepływ krwi a sama blaszka będzie podatna na pęknięcia i występowanie zagrażającej życiu zakrzepicy. Do pęknięcia blaszki miażdżycowej dochodzi w obszarze czepka włóknistego w miejscu, w którym zakrzep wchodzi w interakcję z rdzeniem martwiczym. Dokładne powody pęknięcia blaszki miażdżycowej nie są znane, ale podejrzewa się w tym wypadku udział mieloperoksydazy i metaloproteinaz. Ryzyko pęknięcia prawdopodobnie zwiększają również obszary z występującą wysoką siłą ścinającą płynu, miejsca z wysokim ciśnieniem krwi, odkładanie żelaza oraz zwapnienie makrofagów. Postępująca miażdżyca z czasem coraz bardziej zwęża światło tętnicy a dodatkowe wystąpienie pęknięcia z powstaniem zakrzepu może całkowicie zablokować drogę przepływu krwi w miejscu tworzącej się zmiany [221, 226, 227]. Kolejnym ryzykiem będzie ryzyko oderwania się zakrzepu lub jego fragmentów i blokowanie przepływu krwi w innych miejscach układu krwionośnego powodując przykładowo udar niedokrwienny.

## 2.5 Rozpoznawanie i klasyfikacja zwężeń tętnicy szyjnej

Do przesiewowego rozpoznawania zwężenia tętnic szyjnych w gabinecie lekarskim zalecana jest technika osłuchiwania okolicy rozwidlenia tętnicy szyjnej wspólnej. Wysłuchiwany stetoskopem lekarskim szmer w okolicy rozwidlenia tętnicy szyjnej lub w sąsiedztwie kąta żuchwy może wskazywać na występowanie zwężenia gałęzi wewnętrznej lub zewnętrznej tętnicy szyjnej wspólnej. Dane empiryczne wskazują, że zwężenie pomiędzy 50% a 75% indukuje szmer tętniczy wysłuchiwany nad miejscem zwężenia. Jakkolwiek, jest to metoda dość subiektywna i wymagająca określonego doświadczenia od lekarza diagnozującego zwężenia tętnic [228].

Do potwierdzenia lub wykluczenia w dalszym etapie diagnostyki zwężenia tętnic szyjnych konieczne jest użycie metody bardziej obiektywnej i opartej na metodach diagnostyki obrazowej układu krwionośnego.

Do nieinwazyjnej oceny tętnic szyjnych służą następujące metody obrazowe:

- ultrasonografia metodą dopplerowską szyi
- przezczaszkowa ultrasonografia metodą dopplerowską
- angiografia tomografii komputerowej tętnic szyjnych
- angiografia rezonansu magnetycznego tętnic szyjnych

Do inwazyjnej oceny tętnic szyjnych służą następujące metody obrazowe:

- cyfrowa angiografia subtrakcyjna tętnic szyjnych
- ultrasonografia wewnątrznaczyniowa

Badanie angiograficzne zalecane jest przy podejrzeniu zmian miażdżycowych i tętniaków w naczyniach tętniczych. Angiografia tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego mogą służyć do dokładniejszej oceny tętnic szyjnych w ich anatomicznych początkowych odcinkach oraz w odcinkach wewnątrzczaszkowych, do których dostępu nie mają badania oparte na obrazowaniu ultrasonograficznym. Również nieinwazyjnej oceny tętnic szyjnych metodami z użyciem środka kontrastowego dokonuje się w przypadku rozległych zmian miażdżycowych, które są silnie uwapnione i stają się nieprzenikliwe dla fal wykorzystywanych w metodzie ultrasonograficznej. Z kolei badania inwazyjne są zarezerwowane dla postępowania diagnostyczno-



terapeutycznego prowadzonego w jednym etapie, kiedy po wykryciu zwężenia może być ono od razu leczone. Inną sytuacją, w której używane są inwazyjne metody obrazowe, jest niediagnostyczny wynik badań nieinwazyjnych, w efekcie których stopień zwężenia tętnicy jest nadal niedookreślony i wymaga ustalenia jego wielkości.

Techniką obrazową łatwo dostępną, stosunkowo tanią i powszechnie stosowaną do wykrywania zwężenia tętnic szyjnych jest badanie ultrasonograficzne połączone z opcją dopplerowską, dzięki której możliwe jest szczegółowe określenie następujących cech zwężenia tętnic szyjnych:

- stopień drożności naczynia w uwidocznionym w badaniu odcinku
- lokalizacja i wielkość zwężenia w pomiarze bezpośrednim średnicy naczynia wyrażona w procentach
- morfologia ściany naczynia w zwężeniu oraz przed i za zwężeniem.
- grubość kompleksu intima-media dla celów profilaktyki przeciwmiażdżycowej
- rodzaj blaszek miażdżycowych (stabilne vs niestabilne) oraz ich wielkość
- pomiar prędkości przepływu krwi i kształt spektrum przepływu dzięki lokalizacji pod kontrolą wzroku pomiarowej bramki dopplerowskiej w samym środku obserwowanego zwężenia tętnicy

Technika ultrasonograficzna połączone z opcją dopplerowską jest również wykorzystywana w przebiegu diagnozowania innych patologii tętnic szyjnych jak np. do oceny obecności i wielkości rozwarstwienia ściany naczynia tętniczego, procesów zakrzepowo-zapalnych w przebiegu chorób zapalnych naczyń i tętniakowatych poszerzeń oraz innych anomalii naczyniowych. Badanie ultrasonograficzne również pozwala na szczegółowszą ocenę patologicznych zmian okołonaczyniowych, jak np. guzy i nacieki okołotętnicze. Jest to również metoda potwierdzająca podejrzenie zespołu podkradania tętnic podobojczykowych, ze względu na możliwość dokładnego ustalenia kierunku przepływu w badanym naczyniu [229].

Metoda ta ma jednak pewne wady do których należy zaliczyć zależność jakości wyniku od doświadczenia ultrasonografisty, gdyż jest to badanie oparte na subiektywnym ocenianiu uwidocznionych obrazów nieprawidłowych stanów. Powszechnie wiadomym jest, że jakość końcowego wyniku badania USG powiększa się wraz z doświadczeniem

osoby badającej nabywanym w wyniku stałego doskonalenia techniki badania i wraz z pozyskiwaniem kolejnych kwalifikacji przez profesjonalnego ultrasonografistę [230].

Ilościowa ocena wielkości zwężenia tętnicy i określenie jej istotności hemodynamicznej jest podstawą do zakwalifikowania pacjenta do zabiegu endarterektomii tętnicy szyjnej. W badaniu diagnostycznym, które jest rutynowo wykonywane w gabinecie diagnostyki ultrasonograficznej uznaje się maksymalną prędkość skurczową powyżej 220cm/sek za znamienne dla istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej obejmującego przedział od 70% do 99%. Natomiast maksymalną prędkość skurczową powyżej 180cm/sek uznaje się za znamienne dla istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej obejmującego przedział od 50% do 69%. O całkowitej niedrożności tętnicy szyjnej świadczy brak widocznego przepływu w badanym naczyniu oraz wartość „0” maksymalnej prędkości skurczowej określanej za pomocą bramki dopplerowskiej [229]. Ponieważ dokonanie pomiaru maksymalnej prędkości skurczowej w sposób nieinwazyjny podczas badania USG-Doppler tętnic szyjnych jest metodą powtarzalną i aktualnie bardzo dostępną, to stało się ono najbardziej powszechną metodą obrazową podczas kwalifikacji do zabiegu chirurgicznego usunięcia blaszki miażdżycowej z tętnicy [231]. Również przyczyniły się do tego wyniki badań, w których nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy odmiennymi nieinwazyjnymi badaniami obrazowymi tętnic, w tym także tych, w których konieczne jest użycie kontrastu do obrazowania tętnicy celem określenia stopnia zwężenia (tj.angio-TK i angio-MR) [232].

## **2.6 Metody leczenia operacyjnego zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej**

W dotychczasowych badaniach wielokrotnie dowiedziono skuteczności operacyjnej metody eliminacji blaszek miażdżycowych, w przebiegu tzw. zabiegu endarterektomii tętnicy szyjnej (CEA), w zapobieganiu udarom mózgu u pacjentów ze zwężeniem tętnicy szyjnej na tle miażdżycy [233, 234]. Liczne prace badawcze i meta-analizy wykazały, że zabieg CEA poprawia krążenie mózgowie i funkcję mózgu, zwłaszcza w warunkach niewystarczającego krążenia obocznego i w efekcie jest skuteczną formą profilaktyki przeciwudarowej [235, 236]. Operacyjna endarterektomia tętnicy szyjnej jest obecnie standardową terapią rewaskularyzacyjną zwężenia tętnicy szyjnej stosowaną jako metoda lecznicza z wyboru [237, 238].

Obecnie podstawowym wskazaniem do udrożnienia tętnicy szyjnej wewnętrznej jest:

a) zwężenie światła tętnicy określane jako istotne hemodynamicznie ( $\geq 70\%$ ) u chorych po napadzie przemijającego niedokrwienia mózgu (TIA) lub po udarze niepowodującym niesprawności (w takiej sytuacji klinicznej zabieg CEA powinien zostać przeprowadzony w trakcie 2 tygodni od ostatniego pojawienia się objawów) albo jeśli towarzyszy zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej  $\geq 70\%$  po stronie przeciwnej;

b) zwężenie światła tętnicy określane jako nieistotne hemodynamicznie (pomiędzy 50% a 69%) u chorych z objawami niedokrwienia mózgowia lub u których wystąpiły objawy oczne w postaci amaurosis fugax w ciągu 3 miesięcy poprzedzających (zwłaszcza gdy współwystępują czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego, jednak korzyści z operacyjnego zabiegu CEA są mniejsze niż przy zwężeniu istotnym hemodynamicznie);

c) zwężenie  $\geq 70\%$  u chorych objawowych oraz u chorych bezobjawowych kwalifikowanych do operacji tętniaka aorty lub bypassów naczyń wieńcowych serca na tle miażdżycy;

d) zwężenie  $\geq 70\%$  u chorych bezobjawowych, głównie mężczyzn, pod warunkiem, że ryzyko powikłań śródoperacyjnych (udar mózgu lub zgonu) w szpitalu wykonującym takie operacje udrażniające wynosi mniej niż 3% [239].

Leczenie udrażniające tętnicę szyjną jest obarczone określonym ryzykiem śródoperacyjnym i po-operacyjnym. Częstość występowania poważnych powikłań okołooperacyjnych lub wczesnych incydentów do 30 dni po zabiegu, tj. udaru, TIA, lub zgonu została oceniona w dużych badaniach randomizowanych na 3% do 6% [240].

Do rzadszych powikłań procedury CEA zaliczyć należy operacyjne uszkodzenie nerwów czaszkowych, np. błędnego, twarzowego lub podjęzykowego oraz zespół istotnej reperfuzji pooperacyjnej, który może być przyczyną ukrwotoczenia wcześniej istniejącego ogniska niedokrwiennego albo procesów zagrażających przekrwieniem obszaru mózgowia. Powikłania po zabiegu operacyjnym występują częściej u chorych obciążonych znaczącym ryzykiem przedoperacyjnym. Zaobserwowano, że w kohorcie osób należących do grupy dużego ryzyka wystąpienia incydentów pooperacyjnych poważne działania niepożądane, obejmujące udar, zawał lub zgon, wystąpiły nawet u około 20% pacjentów leczonych chirurgicznie z zastosowaniem procedury CEA [241].

Przeciwwskazaniami do operacyjnego udrożnienia tętnicy szyjnej wewnętrznej są zatem ciężkie choroby ogólne, wskazujące czas oczekiwanego przeżycia do mniej niż

jednego roku, niedrożność tętnicy szyjnej oraz bardzo rozległe ognisko niedokrwienne mózgu o istotnie świeżym charakterze. Powszechnie uważa się, że zaawansowany wiek chorego, nie stanowi przeciwwskazania do udrożnienia tętnicy szyjnej wewnętrznej [239]. Choć sam wiek pacjenta może mieć pewne znaczenie w doborze metody chirurgicznej. W badaniu klinicznym, w którym udrażniano istotnie zwężone tętnice szyjne u kobiet bez niedokrwienych objawów neurologicznych wykazano, że korzyści z leczenia operacyjnego są mniej znamienne niż w porównywanej grupie mężczyzn. Wysłunięto na tej podstawie zalecenie, aby wykonywanie endarterektomii proponować generalnie jednak młodszym kobietom, u których nie zdiagnozowano dodatkowego obciążenia chorobami metabolicznymi i kardiologicznymi [242]. W celu dostarczania właściwych wytycznych dla lekarzy prowadzących leczenie operacyjne chorych ze zwężeniem tętnicy szyjnej niezbędne jest stałe analizowanie zbiorczych danych opisujących wczesne i odległe wyniki aktualnego leczenia i porównywanie ich z wynikami wcześniejszych badań. Jest to szczególnie istotne w kontekście pojawienia się nowych leków i innowacyjnych zabiegów wewnątrznacyniowych z zastosowaniem stentów dotętnicznych oraz metod neuroprotekcji śródzabiegowej dla tkanki mózgowej [243, 244]. Ich skuteczność nadal jest jednak celem analiz i dokonania obiektywnej oceny w randomizowanych badaniach klinicznych [245]. Zwłaszcza przeprowadzanie endarterektomii u pacjentów z bezobjawowym zwężeniem tętnicy szyjnej jest aktualnie jednym z bardziej dyskusyjnych problemów klinicznych w dziedzinie chirurgii naczyniowej [246]. Wynika to z odmiennych obserwacji po zakończeniu badań klinicznych, w których z jednej strony wykazano, że zabieg chirurgicznego udrażniania tętnic zmniejsza ryzyko udaru mózgu w porównaniu z nieinwazyjnym leczeniem farmakologicznym. Z drugiej strony, ryzyko potencjalne zgonu lub trwałego kalectwa w przebiegu dokonanego rozległego udaru mózgu jako efekt powikłań po zastosowaniu chirurgicznego udrażniania tętnicy nie może uzasadniać wprowadzenia tej metody do rutynowego postępowania u pacjentów z bezobjawowym zwężeniem tętnicy szyjnej [247, 248]. Dlatego w tej grupie pacjentów wydaje się konieczne poszukiwanie molekularnych metod diagnostycznych oceniających dynamikę rozwoju patologicznych zmian miażdżycowych w naczyniach szyjnych, które mogłyby by stanowić element algorytmu postępowania diagnostyczno-terapeutycznego u pacjentów z rozpoznanym bezobjawowym zwężeniem tętnicy szyjnej i należących do grupy ryzyka rozwoju chorób naczyniowych mózgu lub zaburzeń krążenia.

### **3. Założenia teoretyczne i cele badań**

Schorzenia naczyniowo-mózgowe stanowią znaczący problem medyczny oraz socjologiczny, gdyż są wiodącą przyczyną inwalidztwa i śmiertelności na całym świecie. Wczesne rozpoznanie i właściwe monitorowanie, a także odpowiednio wcześniej podjęte operacyjne leczenie udrażniające zwężenia tętnic szyjnych na tle miażdżycy ma istotne znaczenie w procesie zapobiegania zarówno przemijającym incydentom niedokrwiennym jak i dokonanemu udarowi mózgu, który jest chorobą śmiertelną. Wiodącą przyczyną śmiertelności z powodu udaru mózgu jest współistniejące schorzenie naczyniowo-mózgowe. Także asymptomatyczna stenoza tętnic szyjnych znacznie zwiększa ryzyko udaru mózgu, gdyż hemodynamiczne następstwa istotnych zwężeń miażdżycowych, mogą prowadzić do przewlekłych niedokrwiennych uszkodzeń tkanki mózgowej ze względu na zaburzenia regionalnego przepływu mózgowego. Istnieją również dowody, że u pacjentów poddanych endarterektomii dochodzi do istotnej poprawy przepływu mózgowego.

Pacjenci z istotnym zwężeniem tętnic szyjnych wewnętrznych bez neurologicznych objawów niedokrwienia mózgu, tzw. „pacjenci asymptomatyczni”, są grupą pacjentów, wobec której podejmowana jest dyskusja na temat wskazań i celowości wykonywania zapobiegawczej endarteriektomii tętnicy szyjnej ze względu na określone ryzyko okołoperacyjne. Identyfikacja i równoczesna właściwa ocena ryzyka wystąpienia incydentów niedokrwiennych u pacjentów asymptomatycznych mogłaby zapobiec znaczącej liczbie udarów mózgowych. W tym celu poszukiwane są nowe testy przesiewowe o wysokiej dokładności diagnostycznej, mogące w obiektywny i nieinwazyjny sposób określić dynamikę rozwoju miażdżycy, które mogłyby być oceniane w rutynowej praktyce klinicznej.

Współcześnie w niektórych chorobach człowieka jako nieinwazyjne testy przesiewowe są stosowane badania RNA lub DNA krążącego we krwi obwodowej nazywane również „płynną biopsją“. Te innowacyjne badania molekularne pozwalają odróżnić pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka występowania choroby od pacjentów z grupy bardzo niskiego ryzyka występowania badanej jednostki chorobowej. Aktualnie, testy oparte na „płynnej biopsji” stanowią pomocne narzędzie diagnostyczne wykrywające u mężczyzn np. raka stercza, którego komórki uwalniają do krwioobiegu materiał genetyczny, który jest wykrywany metodami genetycznymi. Znajomość profilu genetycznego

nowotworów pozwala wykryć wolnokrążące DNA nowotworowe we krwi chorego. W efekcie, „płynna biopsja” jako nieinwazyjna metoda diagnostyczna pozwala postawić diagnozę jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby, czyli wtedy, gdy szanse na pełne wyleczenie są największe, tym samym zwiększając przeżywalność pacjentów z chorobami nowotworowymi.

W przypadku detekcji chorób innych niż nowotworowe, również w ich asymptomaticznej fazie, metoda „płynnej biopsji” potencjalnie może być oparta na detekcji zmian molekularnych w subpopulacjach komórek krwi, które podlegają np. dysfunkcjom metabolicznym w przebiegu chorób ogólnoustrojowych albo na detekcji zmiany stężenia substancji biologicznie czynnych rozpuszczonych w osoczu. Należy wykonać szereg badań przedklinicznych i klinicznych potwierdzających skuteczność takiej nieinwazyjnej metody diagnostycznej krwi pacjentów.

Przyjmując, że różne populacje komórek krążących we krwi obwodowej mogą być okresowo rekrutowane do ognisk arteriosklerozy w mechanizmie chemotaksji na tle aktywnego procesu zapalnego w tych ogniskach i mogą uczestniczyć w mechanizmach rozwoju blaszki miażdżycowej biorąc czynny udział w progresji miażdżycowego zwężenia tętnic oraz z drugiej strony poznając coraz dogłębniej właściwości anty-zapalne i anty-oksydacyjne komórek układu krwiotwórczego, indukowane dzięki mechanizmom molekularnym regulowanym wewnątrzkomórkowo przez jednoniciowe cząsteczki RNA, tzw. mikroRNA, zdolne do regulacji ekspresji innych genów w komórkach, ustalono następujące cele badawcze pracy:

1. Ocena względnego poziomu ekspresji wybranych mikroRNA wewnątrzkomórkowych ustalonych na podstawie funkcji regulacyjnej w określonych procesach związanych z:

- a. angiogenezą i metabolizmem śródbłonna oraz niedokrwieniem tkankowym (miR-9-5p, miR-21-3p, miR-23a-3p, miR-126-3p, miR-134-5p, miR-296-5p);
- b. apoptozą, stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym oraz miażdżycą (miR-30b, miR-122-5p, miR-133b, miR-146a, miR-150-5p i miR-155-5p);
- c. proliferacją i cyklem komórkowym (miR-16-5p, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-200c-5p i miR-223-3p);

Detekcji dokonano w komórkach jednojądrzastych z krwi obwodowej pacjentów z bezobjawowym istotnym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej pobranej bezpośrednio przed i w 3 miesiące po zabiegu endarterektomii.

2. Ocena względnego poziomu ekspresji w/w mikroRNA w blaszce miażdżycowej pobranej z tętnicy szyjnej w trakcie zabiegu endarterektomii i porównawczo w niezmięnionej miażdżycowo tętnicy.
3. Ocena stężenia wybranych osoczowych czynników białkowych o właściwościach angio-protekcyjnych i związanych z homeostazą naczyniowej tkanki łącznej (Angiopoetyna-1, BMP-2, BMP-4, EGF, FGFa, FGFb, VEGF, MMP-1, MMP-3, TIMP-1, Kolagen-1-alfa, IL-6).
4. Ocena antyoksydantów enzymatycznych i nieenzymatycznych osobno w erytrocytach i płytkach krwi, obejmującej aktywność reduktazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej, transferazy S-glutationowej, katalazy oraz stężenie glutationu zredukowanego.

## **4. Materiał i metody**

### **4.1. Pacjenci**

Wśród 48 pacjentów zakwalifikowanych do badania było 28 mężczyzn oraz 20 kobiet w przedziale wiekowym od 46 do 75 lat (średnia wieku chorych wynosiła 63,5 lat). Pacjenci byli zakwalifikowani do operacyjnego usunięcia blaszki miażdżycowej podczas zabiegu CEA przeprowadzanego w Klinice Chirurgii Naczyniowej PUM. Wskazaniem do zabiegu operacyjnego była diagnoza bezobjawowego jednostronnego istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej. Jako istotne hemodynamicznie zwężenie uznawano zakres od 70% do 99%. W przypadku całkowitej niedrożności tętnicy szyjnej wewnętrznej pacjentów dyskwalifikowano z zabiegu oraz dalszego badania. Do grupy badanej kwalifikowano wyłącznie pacjentów neurologicznie bezobjawowych, u których nie wykryto w historii choroby przejściowych ani przewlekłych objawów niedokrwiennych w okresie do 4 m-cy przed zabiegiem CEA. U niewielkiego odsetka pacjentów stwierdzono na podstawie badania podmiotowego przebyty udar mózgu w okresie 5 lat przed zabiegiem operacyjnym, jednakże w badaniu neurologicznym zaobserwowano pełne ustąpienie objawów ubytkowych w okresie poprzedzającym zabieg CEA. Z badania wykluczono chorych z chorobami internistycznymi, które mają istotny wpływ na funkcję śródbłonka naczyniowego. Do takich chorób zaliczono przewlekłe choroby metaboliczne, w tym cukrzyca i ogólnoustrojowe schorzenia zapalne, w tym aktywna choroba zwyrodnieniowa stawów, oraz choroby związane z nieprawidłową funkcją tkanki łącznej. Z badania wykluczono również pacjentów po uprzednio wykonanym zabiegu endarteriektomii, zarówno po stronie zwężenia, jak i stronie przeciwległej, a także po przebytej jednostronnej lub obustronnej implantacji stentu do tętnicy szyjnej w trakcie leczenia jej zwężenia.

Dla oceny wielkości zwężenia tętnic szyjnych u każdego pacjenta przeprowadzono ultrasonograficzne badanie USG Doppler obu tętnic szyjnych i kręgowych przy użyciu aparatu USG marki Voluson 730 PRO firmy GE ze Stanów Zjednoczonych (GE Medical Systems, Milwaukee, USA), wyposażonego w sondę liniową o częstotliwości 7,5 MHz, zgodnie z wytycznymi zalecanymi w fachowej literaturze nt. diagnostyki obrazowej tętnic szyjnych. Zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej po stronie zakwalifikowanej do zabiegu endarteriektomii wynosiło  $\geq 70\%$ , natomiast po stronie nieobjętej zabiegiem operacyjnym było mniejsze niż 50%.



W fazie wstępnego badania przesiewowego (tzw. Pre-screening w badaniu) został wykorzystany oddzielny formularz świadomej zgody (ICF) celem zakwalifikowania do grupy badanej na podstawie wyniku badania USG Doppler. Po przejściu wstępnej kwalifikacji na podstawie głównego kryterium włączenia, tj. występowania jednostronnego istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej w przedziale 70-99%, każdy pacjent podlegał następnie pełnemu badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu. Dokładny wywiad chorobowy dotyczył czasu trwania, przebiegu i leczenia choroby podstawowej związanej ze zwężeniem tętnic szyjnych oraz obejmował przewlekłe schorzenia towarzyszące a także listę przyjmowanych leków. Szczególną uwagę zwracano na współistniejące choroby sercowo-naczyniowe, w tym chorobę niedokrwinną serca oraz nadciśnienie tętnicze, a także na występowanie czynników ryzyka związanych ze stylem życia prowadzonego przez pacjenta w minionej dekadzie życia. Dodatkowo, określano dokładny czasokres palenia tytoniu oraz ilość wypalanych paczek papierosów. W celu określenia poziomu natężenia nałogu palenia papierosów u pacjentów palących papierosy obliczono skumulowaną liczbę wypalonych papierosów, którą przedstawiono w wartościach bezwzględnych, tzw. paczkołatach, które wyliczono na podstawie iloczynu okresu palenia w latach i liczby wypalanych papierosów dziennie zadeklarowanej przez pacjenta.

W badaniu wykonywano także pomiar ciśnienia tętniczego krwi wszystkim pacjentom za pomocą naramiennego ciśnieniomierza automatycznego. Na podstawie uzyskanych wyników pomiarowych obliczono średnie ciśnienie tętnicze stosując równanie:  $MAP = \text{rozkurczowe ciśnienie tętnicze} + 1/3 (\text{skurczowe RR} - \text{rozkurczowe RR})$ . Ponadto, na podstawie zmierzonego obwodu bioder oraz talii obliczano wskaźnik WHR, tj. stosunek obwodu talii do bioder (ang. Waist/Hip Ratio) a na podstawie danych morfometrycznych pacjentów takich jak masa ciała i wzrost obliczono aktualny wskaźnik masy ciała (BMI).

W Tabeli nr 1. przedstawiono kliniczną charakterystykę pacjentów zakwalifikowanych do dalszych etapów badania.

Tabela 1. Ocena parametrów klinicznych u pacjentów w badanej kohorcie.

Parametr kliniczny	Grupa Badana
Liczba pacjentów	48
Płeć (Kobiety / Mężczyźni)	15 / 29
Wiek (lata: średnia $\pm$ SD)	62,5 $\pm$ 6,5
WHR (średnia $\pm$ SD)	0,94 $\pm$ 0,11
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] (średnia $\pm$ SD)	27,91 $\pm$ 3,67
MAP [mmHg] (średnia $\pm$ SD)	104,30 $\pm$ 9,87
Paczkolata (średnia $\pm$ SD)	31,05 $\pm$ 30,94
Palący w przeszłości (%)	85,71
Palący obecnie (%)	33,33
Ile lat jest niepalący (średnia $\pm$ SD)	5,36 $\pm$ 6,86
Przewlekła CHNS (%)	35,71
Ostra CHNS w postaci zawału serca (%)	16,67
Nadciśnienie tętnicze (%)	80,95
Nadciśnienie tętnicze w latach (średnia $\pm$ SD)	5,66 $\pm$ 6,06
Tętniak aorty (%)	9,52
Miażdżycza zarostowa tętnic kończyn (%)	23,81
Przebyty dawniej udar mózgu (%)	33,33

#### 4.2. Materiał biologiczny do badań

Próbki do badań uzyskano od 48 pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej u którego podstaw stała zaawansowana miażdżycza tętnic. Z każdym z pacjentów przeprowadzono wywiad oraz uzyskano zgodę na pobranie i użycie próbek materiału biologicznego do badań naukowych. Od każdego z pacjentów pobrano dwie próbki krwi określane mianem próbek A oraz C o objętości około 6 ml. Próbki A pobrano jeden dzień przed planowanym zabiegiem endarteriektomii natomiast próbki C po trzech miesiącach od zabiegu. Uzyskane podczas zabiegu endarteriektomii wycinki tkanek zmienionych w procesach miażdżycowych również zachowano oraz użyto do badań ekspresji miRNA w celach porównawczych do próbek krwi. Wszystkie próbki blaszek przechowywano w zamrażarkach Sanyo MDF-U54 w -80°C.

### 4.3. Procedury laboratoryjne

#### 4.3.1. Izolacja materiału komórkowego

W celu uzyskania materiału genetycznego z komórek krwi obwodowej wcześniej pobrane próbki krwi umieszczono w wirówce i odwirowano przez 10 min w 2000 obrotów. Oddzielone od masy komórkowej osocze odciągnięto pipetą pasterowską. Uzyskaną masę komórkową przelano do próbówki o objętości 15ml i dopełniono do 15 ml lizerem BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer. Lizer rozcieńczono w stosunku 1:9 np.: 5 µl + 45 µl wody dejonizowanej. Całość wstrząsnęto i zmieszano przy użyciu wytrząsarki. Po zmieszaniu próbkę inkubowano przez 15 min w ciemnym miejscu. Po inkubacji mieszaninę wirowano w wirówce przez 5 min w 2000 obrotów. Uzyskany nadsącz zlano z nad peletu komórkowego po czym dodano 5 ml lizera, wstrząsnęto i zmieszano przy użyciu wytrząsarki. Całość ponownie wstawiono do ciemnego miejsca na 15 min inkubację. Po inkubacji całość wirowano przez 5 min w 2000 obrotów. Po wirowaniu zlano nadsącz i do peletu komórkowego dodano 5ml PBS. Całość zmieszano przy użyciu wytrząsarki. Mieszaninę następnie odwirowano przez 5 min w 2000 obrotów. Ponownie odlano nadsącz a do pozostałego peletu komórkowego dodano 1ml PBS a następnie całość zamieszano przy użyciu strzykawki. Z tak uzyskanej zawiesiny komórkowej pobrano do próbówki 10 µl płynu oraz dodano 90 µl płynu Türka. Całość zamieszano przy użyciu wytrząsarki. Następnie mieszaninę komórek i płynu Türka nałożono na komorę Sigma Bright-Line Hemacytometer Cell counting chamber i zliczono podczas obserwacji pod mikroskopem odwróconym Olympus CK40. W kolejnym etapie wyliczono ilość komórek w całej zawieszynie przy użyciu wzoru:

$$\text{ilość komórek} \times 100 \times 1000 \times \text{objętość w jakiej zawieszano komórki}$$

Tak wyliczoną ilość komórek użyto do obliczenia objętości zawiesiny jaką należy pobrać do uzyskania około 3,5 ml komórek wymaganych do izolacji materiału genetycznego. Odpowiednią ilość komórek dodano do próbówki. Całość odwirowano a nadsącz po wirowaniu usunięto. Do peletu komórkowego dodano 600 µl Lysis/Binding solution i zmieszano na wytrząsarce. Następnie dodano 60 µl Homogenate Additive i ponownie zamieszano. Całość inkubowano przez 10 min na lodzie. W kolejnym etapie dodano 600 µl Acid-Phenol:Chloroform i wytrząsano przez 30 sekund. Całość odwirowano przez 5 min w najwyższych obrotach wirówki. Po wirowaniu zebrano

wierzchnią warstwę rozdzielonej mieszaniny, objętość zanotowano. Następnie do zebranej cieczy dodano 100% etanol w objętości 1.25x zebranej wcześniej fazy wodnej. Całość wytrząsano a następnie przeniesiono na złoże krzemionkowe umieszczone w probówce. Całość wirowano przez 30 sekund w maksymalnych obrotach. Po wirowaniu przesącz odrzucono a na złoże nałożono 700 µl Wash Solution 1, całość odwirowano przez 15 sekund w maksymalnych obrotach. Po wirowaniu przesącz odrzucono a na złoże krzemionkowe nałożono 500 µl Wash Solution 2/3, całość odwirowano przez 15 sekund w maksymalnych obrotach. Po wirowaniu przesącz odrzucono i powtórzono etap z Wash Solution 2/3. W kolejnym etapie po pozbyciu się przesączu złoże odwirowano przez 1 min w maksymalnych obrotach w celu dokładnego osuszenia złoża. Następnie złoże włożono do nowej probówki i nałożono na nie 20 µl wcześniej podgrzanego Elution Solution lub wody wolnej od nukleaz, całość odwirowano przez 30 sekund w maksymalnych obrotach. Po wirowaniu złoże odrzucono a zebrany na dnie probówki materiał zmierzono pod względem stężenia materiału genetycznego a następnie odłożono i przechowywano w zamrażarce -80 °C

#### **4.3.2. Izolacja materiału tkankowego**

Izolację materiału genetycznego z blaszek miażdżycowych oraz fragmentów ścian zdrowych tętnic przeprowadzono przy użyciu zestawu Thermo Fisher Scientific Invitrogen mirVana™ miRNA Isolation Kit. Próbkę blaszki miażdżycowej zanurzone w PBS i RNAlater na wstępie wyciągnięto z zamrażarek -80°C i rozmrożono w temperaturze pokojowej. Próbkę blaszki zamrożone metodą Snap freezing od razu użyto do izolacji materiału ze względu na szybkość rozmrażania próbek nie zanurzonych w odczynnikach. Izolację materiału przeprowadzano pod komorą laminarną Thermo Scientific MSC-Advantage. Następnie do probówki o pojemności 2ml ze zwężonym dnem dodano 400µl Lysis/Binding Buffer. Próbkę tkanki blaszek miażdżycowych umieszczone na szalkach Petriego pocięto na niewielkie fragmenty przy użyciu skalpela z pominięciem skalcyfikowanych fragmentów a następnie dodano do probówki z wcześniej nałożonym Lysis/Binding Buffer aż do zapelnienia około 60% pojemności probówki 2ml. W kolejnym etapie fragmenty tkanki rozbito przy użyciu plastikowego móżdżierza. Do rozbitej tkanki dodano 40µl miRNA Homogenate Additive. Zamkniętą probówkę lekko wstrząsnęto w celu łatwiejszego zmieszania substancji a następnie dokładnie zmieszano przy użyciu wytrząsarki Biosan Vortex V-1. Zmieszaną zawiesinę

tkankową umieszczono na lodzie i inkubowano w otoczeniu temperatury pokojowej przez 10 min. Po inkubacji dodano 400  $\mu$ l Acid-Phenol: Chloroform. Całość wstrząsnęto a następnie zmieszano przez 30 sekund na wytrząsarce. Fiolkę z mieszaniną następnie umieszczono w wirówce stołowej Eppendorf Centrifuge 5415 R i wirowano w 10 000 x g przez 5 min. Po wirowaniu zebrano do nowej probówki wierzchnią, przezroczystą warstwę płynu uzyskaną poprzez wirowanie, objętość uzyskaną zanotowano. Do uzyskanego płynu dodano jego 1.25x objętość 100% Etanolu i zmieszano na wytrząsarce. Uzyskaną w ten sposób mieszaninę rozpipetowano do probówki z umieszczonym wcześniej złożem krzemionkowym i wirowano w 10 000 x g przez 15 sekund. Uzyskany przesącz odrzucono i rozpoczęto etap oczyszczania poprzez dodanie 700  $\mu$ l miRNA Wash Solution 1. Całość odwirowano 10 000 x g przez 10 sekund. Ponownie odrzucono przesącz i dodano 500  $\mu$ l Wash Solution 2/3, całość odwirowano. Po odrzuceniu przesącza etap z użyciem Wash Solution 2/3 powtórzono. Po kolejnym odrzuceniu przesącza całość wirowano w 10 000 x g przez 1 min w celu dokładnego osuszenia złoża krzemionkowego. Złoże krzemionkowe następnie przełożono do nowej probówki i dodano bezpośrednio na nie 40  $\mu$ l wcześniej podgrzanego do 95°C w łaźni suchej z blokami grzewczymi Star Lab, Elution Solution i odwirowano w 10 000 x g przez 30 sekund. Po odwirowaniu złoże krzemionkowe usunięto a uzyskany w taki sposób materiał genetyczny odłożono i przechowywano w zamrażarce -80°C.

#### **4.3.3. Badanie stężenia materiału genetycznego**

Uzyskany w procesach izolacji materiał zbadano pod kątem czystości oraz stężenia metodą spektrofotometryczną przy użyciu spektrofotometru BioTek Epoch wyposażonym w płytkę BioTek Take3 na komputerze z zainstalowanym oprogramowaniem producenta w długościach fali 260 (Peak), 280 (Ratio), 320 (Ref.). Wyizolowane próbki materiału po wyciągnięciu z zamrażarek -80°C przełożono do pojemnika z lodem w celu rozmrożenia a następnie utrzymania próbek w niskiej temperaturze. Następnie spektrofotometr przygotowano wstępnie poprzez nałożenie na płytkę Take3 2  $\mu$ l odczynnika, w którym zawieszony został materiał genetyczny w próbkach, w tym wypadku było to Elution Solution z zestawu Thermo Fisher Scientific Invitrogen mirVana™ miRNA Isolation Kit. Po nałożeniu Elution Solution płytkę Take3 włożono do spektrofotometru i uruchomiono funkcję blankowania/zerowania. Po

blankowaniu płytkę wyjęto a nałożone wcześniej Elution Solution wytarto. W kolejnym kroku na płytkę nałożono po 2  $\mu$ l wcześniej zamieszanych przy użyciu wytrząsarki próbek, płytkę włożono do spektrofotometru i dokonano pomiaru stężenia i czystości próbek. Uzyskane wyniki zapisano.

#### **4.3.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji**

Na wstępie z uzyskanych w etapie badania stężenia wyników obliczono ilości potrzebnych odczynników oraz próbek użytych w procesie odwrotnej transkrypcji zgodnie z zaleceniami producenta zestawu użytego do odwrotnej transkrypcji. Do właściwej reakcji odwrotnej transkrypcji użyto zestawu odczynników Quantabio qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit. W pierwszym etapie do próbówki o objętości 0,2 ml naniesiono wyliczone ilości próbek zawierające 100ng materiału genetycznego. Następnie całość dopełniono do 7  $\mu$ l wodą wolną od nukleaz. W kolejnym etapie przygotowano pierwszy mix odczynników wymagany do przeprowadzenia pierwszego etapu odwrotnej transkrypcji. W tym celu w próbówce zmieszano 2  $\mu$ l Poly(A) Tailing Buffer (5x) na każdą z próbek, Poly(A) Polymerase 1  $\mu$ l na każdą z próbek. Po nałożeniu do próbówki odpowiedniej ilości odczynników całość zmieszano przy użyciu wytrząsarki oraz zwirowano w wirówce Eppendorf mini Spin. Uzyskany mix nałożono w ilości 3  $\mu$ l do każdej z próbek a następnie wszystkie próbki zmieszano i zwirowano. Tak uzyskane próbki wstawiono do termocyklera Eppendorf Mastercycler i uruchomiono pierwszy program odwrotnej transkrypcji w postaci Inkubacji w 37°C przez 20 min a następnie inkubacji w 70°C przez 5 min. Po zakończeniu etapu pierwszego przygotowano drugi mix odczynników poprzez zmieszanie w próbówce microRNA cDNA Reaction Mix 9  $\mu$ l na każdą z próbek oraz qScript Reverse Transcriptase 1  $\mu$ l na każdą z próbek, całość wymieszano i zwirowano. Następnie do każdej z próbek dodano 10  $\mu$ l drugiego mixu odczynników. Próbki zamieszano, zwirowano i wstawiono do termocyklera w celu przeprowadzenia drugiego etapu odwrotnej transkrypcji w postaci inkubacji w 42°C przez 20 min a następnie inkubacji w 85°C przez 5 min. Po zakończeniu drugiego etapu odwrotnej transkrypcji gotowe próbki odłożono i przechowywano w lodówce.

#### **4.3.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR**

Materiał i niezbędne odczynniki przygotowano i nakładano pod komorą UVP UV Sterilizing PCR Workstation. Materiał w postaci cDNA otrzymany w procesie

odwrotnej transkrypcji oraz odczynnikami przełożono i trzymano w pojemniku z lodem. Dodatkowo pod komorą umieszczono na statywie chłodzącym płytkę 96 dołkową Bio-Rad Hard-Shell PCR Plates 96-well, thin wall, którą dokładnie opisano w celach identyfikacji. Wcześniej przygotowane próbki zamieszano na wytrząsarce a następnie nałożono po 1 µl do każdego z dołków, każdą z próbek nakładano w dwóch powtórzeniach w celu zwiększenia dokładności wyników, łącznie pozwalało to na jednorazowe nałożenie 48 próbek. Następnie przygotowano mix odczynników w osobnej probówce. W przeliczeniu na jeden dołek zmieszano 3,6 µl wody wolnej od nukleaz, 5 µl Bio-Rad iQ™ SYBR® Green Supermix, 0,2 µl startera forward oraz 0,2 µl startera reverse. Całość zmieszano na wytrząsarce oraz zwirowano w wirówce. Unikalne sekwencje starterów forward podano w tabeli numer 2.

Tabela 2: Sekwencje starterów forward użytych do przeprowadzenia reakcji PCR

Nazwa miRNA	Sekwencja użytego startera forward
9-5p	GCA GTC TTT GGT TAT CTA GCT
93	GCA AAG TGC TGT TCG TG
34a-5p	GTG GCA GTG TCT TAG CTG
30b	GCA GTG TAA ACA TCC TAC ACT CA
296-5p	GGC CCC CCC CTC AAT C
27a-5p	AGG GCT TAG CTG CTT GT
23a-3p	AGA TCA CAT TGC CAG GGA
223-3p	CGC AGT GTC AGT TTG TCA
21-3p	CAG CAA CAC CAG TCG ATG
200c-5p	CGT CTT ACC CAG CAG TG
17-5p	GCA AAG TGC TTA CAG TGC AG
17-3p	CTG CAG TGA AGG CAC TT
16-5p	CAG TAG CAG CAC GTA AAT ATT G
150-5p	CTC CCA ACC CTT GTA CCA
146a	GCA GTG AGA ACT GAA TTC CA
134-5p	TGT GAC TGG TTG ACC AGA
133b	CAG TTT GGT CCC CTT CAA C
133a-5p	GCA GAG CTG GTA AAA TGG A
126-5p	CGC AGC ATT ATT ACT TTT GGT
126-3p	GCA GTC GTA CCG TGA GT
122-5p	GTG GAG TGT GAC AAT GGT G

W kolejnym etapie do każdego z dołków płytki nałożono po 9  $\mu$ l mixu. Po nałożeniu mixu płytkę zaklejono folią Bio-Rad Microseal® `B` seal. Po zaklejeniu całość zamieszano na wytrząsarce i zwirowano w wirówce schłodzonej do 4°C w 2200 obrotów przez 4min. Po etapie wirowania płytkę włożono do termocyklera Bio-Rad c1000 Touch™ Thermal Cycler CFX96™ i przeprowadzono analizę po wcześniejszym ustawieniu programu oraz wprowadzeniu projektu płytki do systemu. Po zakończonych analizach wyniki wstępnie analizowano na oprogramowaniu Bio-Rad CFX Maestro, dołączonym do termocyklerów.

#### **4.3.6. Elektroforeza żelowa**

W celu weryfikacji poprawności wykonania reakcji PCR wykonano elektroforezy żelowe. W pierwszej kolejności wykonano rozcieńczenie dziesięciokrotnie stężonego buforu Thermo scientific 10x TBE Electrophoresis Buffer do stężenia 1x . Stężony bufor TBE w objętości 50 ml wiano do cylindra miarowego. Do 50 ml buforu dodano 450 ml wody ultra pure uzyskanej z systemu oczyszczania wody Merck Millipore Direct-Q3UV. Uzyskany bufor TBE 1x przelano do butelki szklanej. Całą czynność przygotowania powtórzono w celu uzyskania łącznej objętości 1l buforu. W celu przygotowania żelu do zlewki wiano 100 ml wcześniej przygotowanego buforu oraz dodano 4g proszku agarozowego GibcoBRL ultra PURE Agarose odważonej na wadze analitycznej AND GX-2000. Całość zamieszano szklaną bagietką i wstawiono do mikrofalówki. Po wstępnym podgrzaniu zawartość zlewki przemieszano w celu lepszego rozpuszczenia agarozy. Całość ponownie podgrzano w mikrofalówce aż do momentu całkowitego rozpuszczenia agarozy, zaprzestając w momencie pojawienia się pierwszych bąbelków w mieszaninie. Przy wysokiej procentowości żelu należy ograniczyć długość podgrzewania mieszaniny w celu ograniczenia tworzenia się bąbelków które ciężiej usunąć niż w przypadku żeli o niższym stężeniu agarozy. Przygotowaną mieszaninę odstawiono pod wyciąg i poczekano na jej lekkie ostudzenie. Po ostudzeniu mieszaniny dodano 7  $\mu$ l Bromku Etydyny Invitrogen, całość ponownie zamieszano bagietką szklaną. Tak przygotowaną mieszaninę rozlano po szklanej bagietce w celu ograniczenia tworzenia bąbelków powietrza w żelu do formy z zestawu do elektroforezy Bio-Rad Wide Mini-Sub® Cell GT -24/AA/13 z wstawionymi „grzebieniami” mającymi na celu utworzenie dołków na później nakładany materiał.



Zestawiony żel wyciągnięto oraz usunięto grzebień. Żel następnie wstawiono do odpowiedniego naczynia do przeprowadzenia elektroforezy. Żel następnie zalano wcześniej przygotowanym buforem TAE tak aby żel oraz dołki zostały całkowicie przykryte buforem. W następnym etapie przygotowano próbki. Docelowo użyto 0,5 mikrograma materiału genetycznego (wartość właściwa którą należało dodać do próbki wyliczono na podstawie stężenia materiału w próbce) odpowiednio odmierzonego i nałożonego do próbki. Próbkę następnie dopełniono do 8 µl wodą wolną od nukleaz i dodano 2 µl Invitrogen Gel Loading Buffer II. Próbki następnie zamieszano przy użyciu wytrząsarki oraz zwirowano w wirówce. Tak przygotowane próbki nakładano do dołków we wcześniej przygotowanym żelu agarozowym zanurzony w buforze TBE. Następnie pojemnik przykryto wieczkiem, podłączono elektrody i uruchomiono zasilacz Bio-Rad PowerPac™ Basic co rozpoczęło proces elektroforezy. Elektroforezę przeprowadzono z użyciem zasilacza ustawionego na parametry: 130 min, 70 V, 400 mA. Po zakończeniu elektroforezy żel obserwowano, analizowano i fotografowano przy użyciu urządzenia UVP GelDoc-It™ Imaging System.

#### **4.3.7. Typowanie stabilnego miRNA referencyjnego oraz wyliczanie poziomu ekspresji badanych miRNA**

Zarówno typowanie stabilnego miR referencyjnego jak i wyliczenia poziomu ekspresji zostały przeprowadzone przy pomocy oprogramowania Bio-Rad CFX Maestro dołączonego do termocyklera Bio-Rad c1000 Touch™ Thermal Cycler CFX96™. Do wyliczenia ekspresji użyto metody  $\Delta\Delta Cq$ .

#### **4.3.8. Detekcja czynników białkowych za pomocą multipleksowej techniki Luminex**

Poziom stężenia czynników wzrostu (angiopoetyna-1, EGF, FGFa, FGFb, VEGF, BMP-2, BMP-4), cytokin (IL-6) oraz enzymów (MMP-1, MMP-3, TIMP-1) i białek strukturalnych (Kolagen-1-alfa) oceniono w osoczu krwi obwodowej pobranej przed zabiegiem CEA (grupa przed-CEA) oraz w osoczu krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach od operacyjnego usunięcia blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA) za

pomocą komercyjnie dostępnych zestawów: i) R&D Systems Human Angiogenesis A Premixed Mag Luminex Performance Assay oraz ii) R&D Systems Luminex Performance Human High Sensitivity Cytokine Magnetic Panel A (oba zestawy z firmy R&D Systems, Minneapolis, USA). Zestawy przystosowane są do multipleksowej techniki detekcji Luminex®, która umożliwia równoczesną detekcję wielu analitów w pojedynczym dołku analitycznym.

W pierwszym etapie procedury, do właściwych dołków płytki reakcyjnej wypełnionych buforem blokującym, dodawano 30  $\mu$ L odpowiedniego roztworu: prób wzorcowych o ustalonych stężeniach białka, prób „ślepych” oraz prób badanych w eksperymencie, oraz stanowiących wewnętrzną kontrolę zestawu. Następnie, do każdego właściwego dołka dodawano 10  $\mu$ L przeciwciała specyficznie wiążącego dany antygen, który kowalencyjnie związany jest z magnetycznymi mikrosferami. Każda mikrosfera jest wewnętrznie wyznakowana barwnikiem fluorescencyjnym, który stanowi widmowy kod danej mikrokulki i umożliwia detekcję badanego antygeny. Reakcję prowadzono, przez jedną godzinę, prowadząc stałe jej wytrząsanie (850 rpm), w temperaturze pokojowej. Następnie, stosując podstawkę magnetyczną, która zatrzymywała mikrokulki w dołkach, prowadzono trójfazowe płukanie buforem płuczającym. Następnie, do mieszaniny w dołkach płytki dodawano 40  $\mu$ L przeciwciała wyznakowanego biotyną, które specyficznie rozpoznaje wykrywaną substancję białkową. Inkubację nadal przeprowadzano z zachowaniem poprzednich warunków, tj. wytrząsanie (850 rpm) przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej. Wykorzystując właściwości streptawidyny do wiązania biotyny, fluorescencyjną detekcję prowadzono w oparciu o układ streptawidyna-fikoerytryna. Po ponownym trójfazowym płukaniu, mikrokulki w dołkach zawieszano w 100  $\mu$ L buforu i przystępowano do odczytu danych według poniżej przedstawionej procedury.

Odczyt i analizę danych dokonano w oparciu o platformę Luminex® 200™, z wykorzystaniem oprogramowania xPONENT (Luminex Corporation, Austin, USA). Analizator Luminex® 200™ opiera się na technologii znanej uprzednio z technik cytometrii przepływowej, gdzie hybrydowy detektor emituje wiązkę czerwonego światła o długości fali 635 nm, która identyfikuje kod mikrokulki, a tym samym rodzaj badanego czynnika białkowego, oraz wiązkę zielonego światła o długości fali 532 nm, który wzbudza fluorescencję barwnika reporterowego. Uzyskana wartość średniego natężenia fluorescencji fikoerytryny jest proporcjonalna do stężenia badanego czynnika

białkowego związanego z mikrokulkami magnetycznymi. Na podstawie średniego natężenia fluorescencji próbek wzorcowych wykreślono krzywą standardową z wykorzystaniem 5-parametrowej regresji logistycznej.

#### **4.3.9. Aktywność enzymów przeciwutleniających i stężenie glutationu w płytkach krwi i erytrocytach**

Do oznaczenia stężenia zredukowanego glutationu (GSH) wykorzystano metodę spektrofotometryczną. Aktywność enzymatyczną, katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), S-transferazy glutationowej (GST), reduktazy glutationowej (GR) w krwinkach czerwonych i płytkach krwi określono swoistymi metodami kinetycznymi. Pomiarów dokonywano przy użyciu automatycznego spektrofotometru Perkin-Elmer (UV/VIS Lambda 650 Perkin-Elmer, Waltham, USA). W materiale biologicznym pozyskanym z erytrocytów aktywność antyoksydantów enzymatycznych oraz stężenie zredukowanego glutationu, znormalizowano w odniesieniu do stężenia białka natywnego w poszczególnych próbkach uzyskanego za pomocą metody Bradford. W tym celu, przygotowano krzywą kalibracyjną w oparciu o ustalone stężenia albuminy. Następnie, 10  $\mu$ L ekstraktu białkowego inkubowano z odczynnikiem Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Odczytu dokonywano w czytniku mikropłytek, mierząc absorbancję przy długości fali 595 nm (Bio-Tec Instruments, Inc., USA), a następnie na podstawie krzywej kalibracyjnej określano stężenie białka całkowitego w badanej próbce. W materiale biologicznym pozyskanym z trombocytów aktywność antyoksydantów enzymatycznych oraz stężenie zredukowanego glutationu, znormalizowano w odniesieniu do stężenia białka hemoglobiny. Stężenie hemoglobiny w badanych próbkach oznaczano metodą spektrofotometryczną tym samym spektrofotometrem Perkin-Elmer.

**A.** Do oznaczenia stężenia **zredukowanego glutationu (GSH)** w płytkach krwi i erytrocytach zastosowano następującą metodykę:

Rozcieńczony lizat zmieszano w próbce z roztworem wytrącającym o następującym składzie: 1,67 g kwasu metafosforowego, 0,2 g EDTA- $\text{Na}_2$ , 30 g NaCl i 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), inkubowano przez 5 minut w

temperaturze 4°C i odwirowano (550xg przez 10 minut). Supernatant rozcieńczono buforem fosforowym (pH 7,9), dodano DTNB (kwas 5,5'-di-tio-bis-(2-nitrobenzoesowy), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), a następnie mieszaninę inkubowano przez 15 minut w temperaturze 25°C. Długość fali wykrywania wynosiła lambda 412 nm. Stężenie GSH obliczono za pomocą molowego współczynnika absorpcji ( $\epsilon = 13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**B.** Do oceny aktywności **katalazy (CAT)** w płytkach krwi i erytrocytach zastosowano następującą metodykę:

W próbówce rozcieńczono 500-krotnie lizat za pomocą buforu fosforowego (50 mM). Pomiar absorpcji badanej próbki zawierającej lizat i 30 mM roztwór  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) przeprowadzono w ciągu 30 sekund w temperaturze 30°C. Długość fali wykrywania wynosiła lambda 240 nm. Aktywność katalazy określono z krzywej wzorcowej, którą uzyskano w wyniku sporządzenia kilku roztworów o znanym poziomie aktywności katalazy dostępnej handlowo (Oxis Research, Portland, USA).

**C.** Do oceny aktywności **dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)** w płytkach krwi i erytrocytach zastosowano następującą metodykę:

W próbówce sporządzono mieszaninę lizatu, roztworu chloroformu:etanolu (3:5; v/v) i wody destylowanej. Mieszaninę następnie silnie zmieszano, inkubowano przez 5 minut w temperaturze 4°C i odwirowano (3824xg przez 10 minut). Supernatant rozcieńczono buforem wodorowęglanowym (bufor  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ) i dodano roztwór adrenaliny (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), a następnie mieszaninę inkubowano przez 3 minuty w temperaturze 37°C. Długość fali wykrywania wynosiła lambda 320 nm. Absorbancję badanego materiału rejestrowano w ciągu 5 minut w temperaturze 30°C.

**D.** Do oceny aktywności **peroksydazy glutationowej (GPx)** w płytkach krwi i erytrocytach zastosowano następującą metodykę:

W próbówce zmieszano lizat z mieszaniną reakcyjną (bufor fosforowy, reduktaza glutationowa, GSH,  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C. Po inkubacji reakcję inicjowano przez dodanie wodorotlenku tert-butyłu (lub nadtlenu wodoru) i mierzono spadek absorpcji przy lambda 340 nm. Ilość enzymu,

która utleniła 1  $\mu\text{mol}$  GSH ( $0,5 \mu\text{mol}$  NADPH +  $\text{H}^+$ ) w ciągu jednej minuty została zdefiniowana jako jednostka aktywności enzymu.

**E.** Do oceny aktywności **S-transferazy glutationowej (GST)** w płytkach krwi i erytrocytach zastosowano następującą metodykę:

W probówce mieszano lizat z mieszaniną reakcyjną (bufor fosforowy, GSH, CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen)) i mierzono wzrost absorpcji przy  $\lambda$  340 nm. Aktywność transferazy glutationowej określono za pomocą molowego współczynnika absorpcji zsyntetyzowanego koniugatu ( $\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**F.** Do oceny aktywności **reduktazy glutationowej (GR)** w płytkach krwi i erytrocytach zastosowano następującą metodykę:

Rozcieńczony lizat mieszano w probówce z 1 mL rozcieńzonego odczynnika roboczego R-1 (900  $\mu\text{L}$  EDTA i 100  $\mu\text{L}$  R-1 o składzie NADPH<sup>+</sup> +  $\text{H}^+$  rozcieńzonego w roztworze 0,01M NaOH (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 30°C. Następnie dodano odczynnik R-2 (dwusiarczek glutationu (GSSG) rozcieńczony w EDTA; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) i mierzono ekstynkację przy  $\lambda$  340 nm przez 3 minuty w temperaturze 30°C.

#### **4.4. Metoda analizy statystycznej uzyskanych wyników**

Do analizy statystycznej zebranych wyników użyto oprogramowania GraphPad Prism. Zmienne z rozkładem zgodnym z rozkładem normalnym poddano analizie metodami parametrycznymi. W przypadku zmiennych o rozkładzie odbiegającym od rozkładu normalnego dane były analizowane metodami nieparametrycznymi. Dla zmiennych ilościowych stosowano test U Manna Whitneya natomiast dla zmiennych jakościowych stosowano dokładny test Fishera. Wyniki zostały wyrażone jako średnia arytmetyczna  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Uzyskane wyniki przedstawiono przy pomocy wykresów typu box-plot. Za statystycznie istotne uznawano prawdopodobieństwo przy poziomie istotności  $p \leq 0,05$ . W przypadku uzyskania wyników istotnych statystycznie, poziom istotności został każdorazowo określony na wykresie.

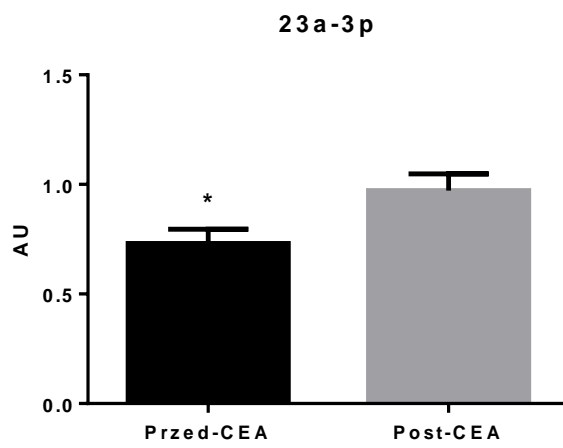
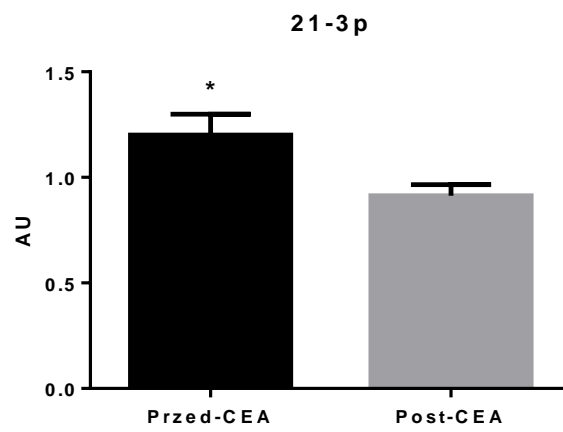
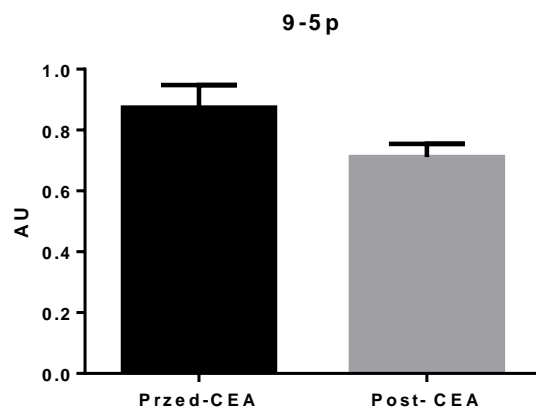
## **5. Wyniki.**

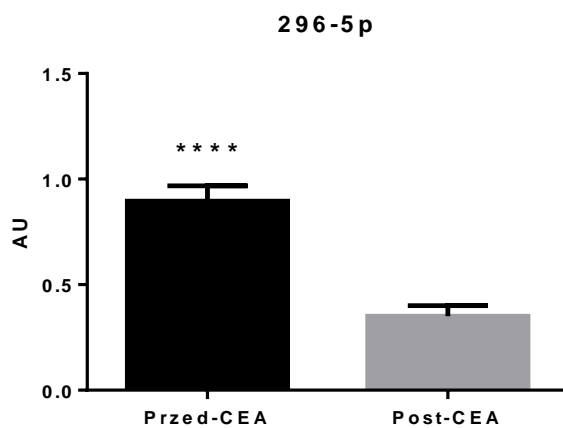
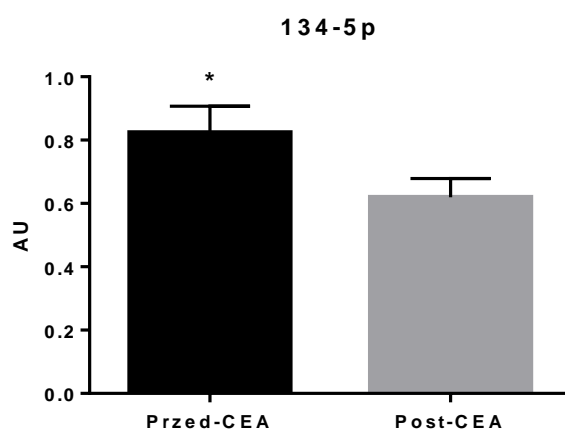
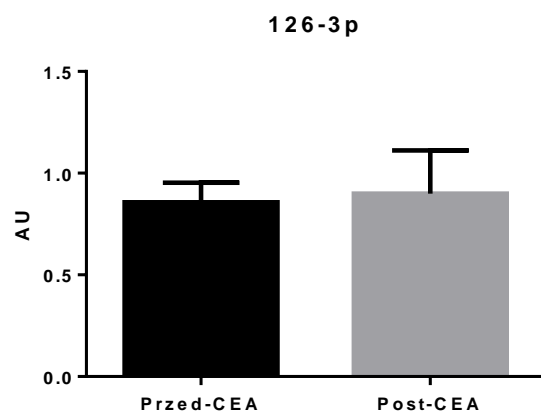
### **5.1. Ekspresja wybranych mikroRNA w komórkach jednojądrzastych z krwi obwodowej.**

Do ilościowej oceny ekspresji wybranych cząstek mikroRNA w komórkach MNC krążących we krwi obwodowej zastosowano metodę PCR w czasie rzeczywistym. Poziomy ekspresji porównano pomiędzy populacją komórek MNC krążących we krwi obwodowej i pozyskanych przed zabiegiem endarterektomii oraz populacją komórek MNC pozyskaną z krwi obwodowej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną.

#### **5.1.1. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłónka oraz stanem niedokrwienia tkankowego.**

Pierwszym etapem badania było określenie poziomów ekspresji mikroRNA dla których wykazano na podstawie danych literaturowych pełnienie istotnej roli w regulacji procesu angiogenezy oraz regulacji metabolizmu śródbłónka i procesu uogólnionego niedokrwienia tkankowego. Wykazano, że komórki MNC pozyskane z krwi obwodowej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) miały istotnie wyższy poziom ekspresji w stosunku do komórek MNC pobranych po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA) następujących mikroRNA: miR-21-3p (32% wzrost,  $p=0,04$ ), miR-134-5p (32% wzrost,  $p=0,03$ ), miR-296-5p (157% wzrost,  $p=0,0001$ ). Wykazano również, że komórki MNC pozyskane z krwi obwodowej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) miały istotnie obniżony poziom ekspresji miR-23a-3p (25% redukcji,  $p=0,03$ ) w stosunku do grupy po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA). Poziom ekspresji miR-9-5p i miR-126-3p nie różnił się istotnie w komórkach MNC krążących we krwi obwodowej zarówno przed zabiegiem usunięcia blaszki miażdżycowej ani w 3 miesiące po zabiegu CEA. Na Ryc. 1 ukazano zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy ekspresji powyższej grupy cząstek mikroRNA o określonej funkcji biologicznej.



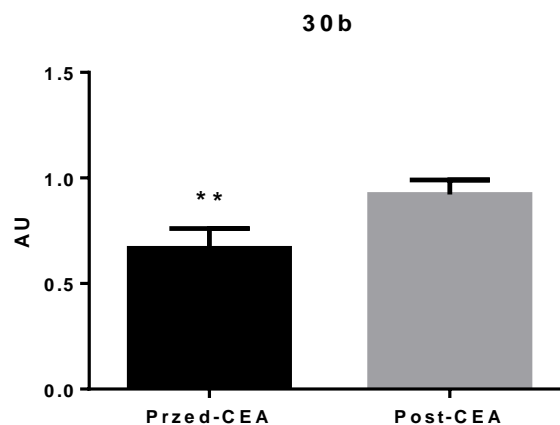


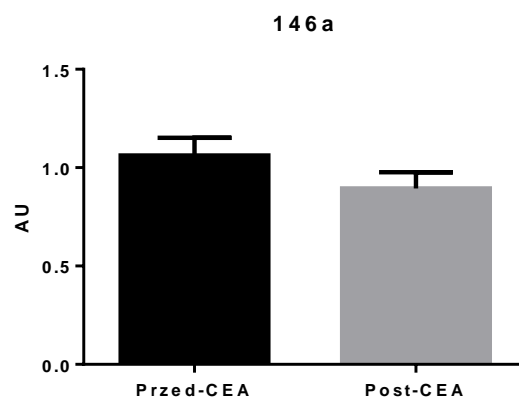
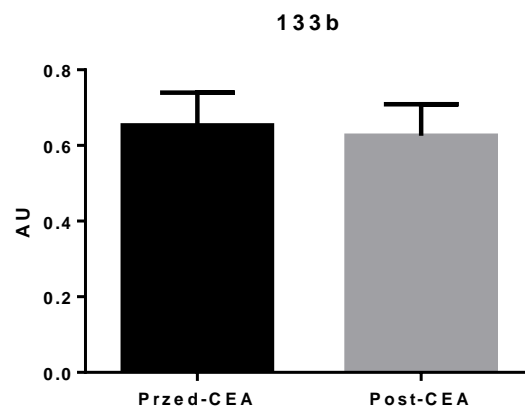
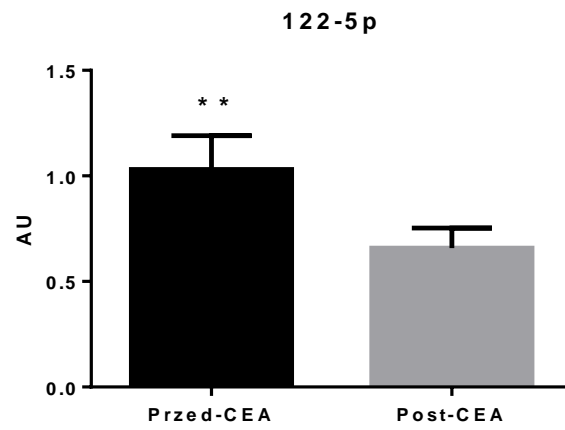
**Rycina 1.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-9-5p, miR-21-3p, miR-23a-3p, miR-126-3p, miR-134-5p i miR-296-5p) związanych z regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłónka oraz stanem niedokrwienia tkankowego analizowane w komórkach krwi obwodowej w badanych grupach pacjentów. Wyniki zostały wyrażone w jednostkach względnych [ $x \pm SD$ , \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ]

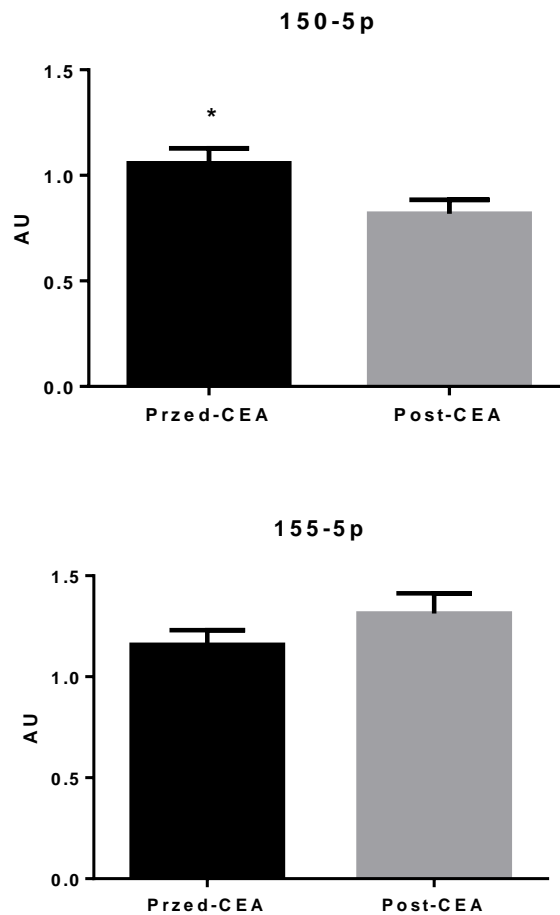


### 5.1.2. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego.

Następnym etapem badania było określenie poziomów ekspresji mikroRNA dla których wykazano na podstawie danych literaturowych pełnienie istotnej roli w regulacji stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego. Wykazano, że komórki MNC pozyskane z krwi obwodowej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) miały istotnie wyższy poziom ekspresji w stosunku do komórek MNC pobranych po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA) następujących mikroRNA: miR-122-5p (58% wzrost,  $p=0,007$ ) oraz miR-150-5p (29% wzrost,  $p=0,03$ ). Wykazano również, że komórki MNC pozyskane z krwi obwodowej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) miały istotnie obniżony poziom ekspresji miR-30b (27% redukcji,  $p=0,005$ ) w stosunku do grupy po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA). Poziom ekspresji miR-133b, miR-146a i miR-155-5p nie różnił się istotnie w komórkach MNC krążących we krwi obwodowej zarówno przed zabiegiem usunięcia blaszki miażdżycowej ani w 3 miesiące po zabiegu CEA. Na Ryc. 2 ukazano zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy ekspresji powyższej grupy wybranych cząstek mikroRNA o określonej funkcji biologicznej.





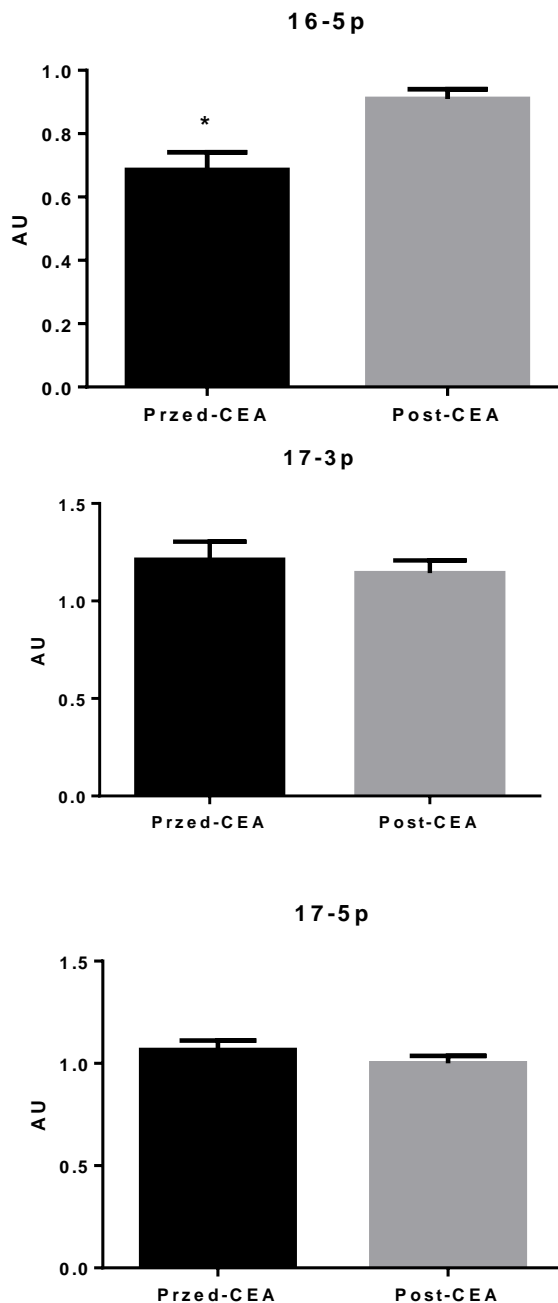


**Rycina 2.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-30b, miR-122-5p, miR-133b, miR-146a, miR-150-5p i miR-155-5p) związanych z regulacją stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz uogólnionego procesu miażdżycowego, analizowane w komórkach krwi jednojądrzastych obwodowej w badanych grupach pacjentów. Wyniki zostały wyrażone w jednostkach względnych [ $x \pm SD$ , \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ]

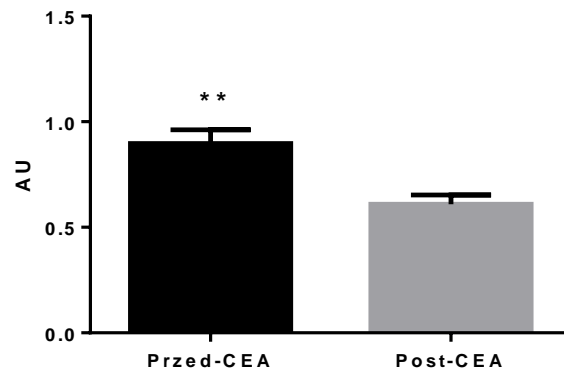
### **5.1.3. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek**

Kolejnym etapem badania było określenie poziomów ekspresji mikroRNA dla których wykazano na podstawie danych literaturowych pełnienie istotnej roli w regulacji cyklu komórkowego i proliferacji komórek. Wykazano, że komórki MNC pozyskane z krwi obwodowej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) miały istotnie wyższy poziom ekspresji w stosunku do komórek MNC pobranych po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA) następujących mikroRNA: miR-27a-

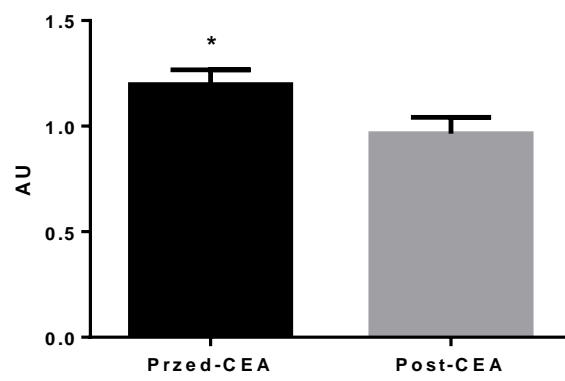
5p (50% wzrost,  $p=0,004$ ), miR-34-5p (25% wzrost,  $p=0,01$ ) oraz miR-223-3p (17% wzrost,  $p=0,03$ ). Wykazano również, że komórki MNC pozyskane z krwi obwodowej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) miały istotnie obniżony poziom ekspresji miR-16-5p (25% redukcji,  $p=0,02$ ) w stosunku do grupy po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA). Poziom ekspresji miR-17-3p, miR-17-5p i miR-200c-5p nie różnił się istotnie w komórkach MNC krążących we krwi obwodowej zarówno przed zabiegiem usunięcia blaszki miażdżycowej ani w 3 miesiące po zabiegu CEA. Na Ryc. 3 ukazano zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy ekspresji powyższej grupy wybranych cząstek mikroRNA o określonej funkcji biologicznej.



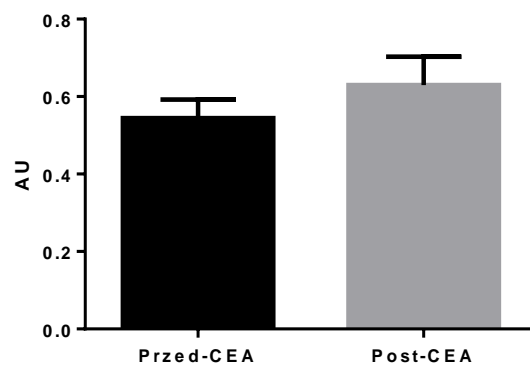
27a-5p

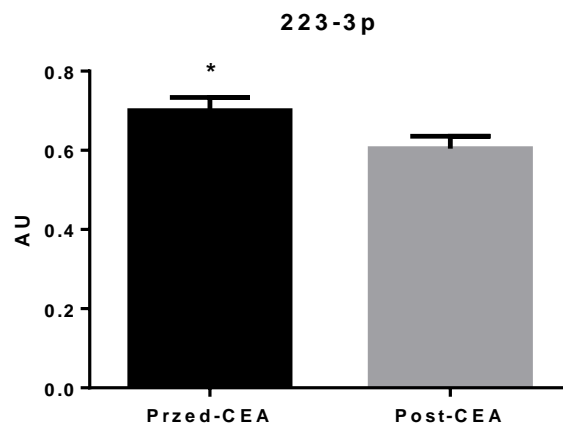


34-5p



200c-5p





**Rycina 3.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-16-5p, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-200c-5p i miR-223-3p) związanych z wewnątrzkomórkową regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek, analizowane w komórkach krwi jednojądrzastych obwodowej w badanych grupach pacjentów. Wyniki zostały wyrażone w jednostkach względnych [ $x \pm SD$ , \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ].

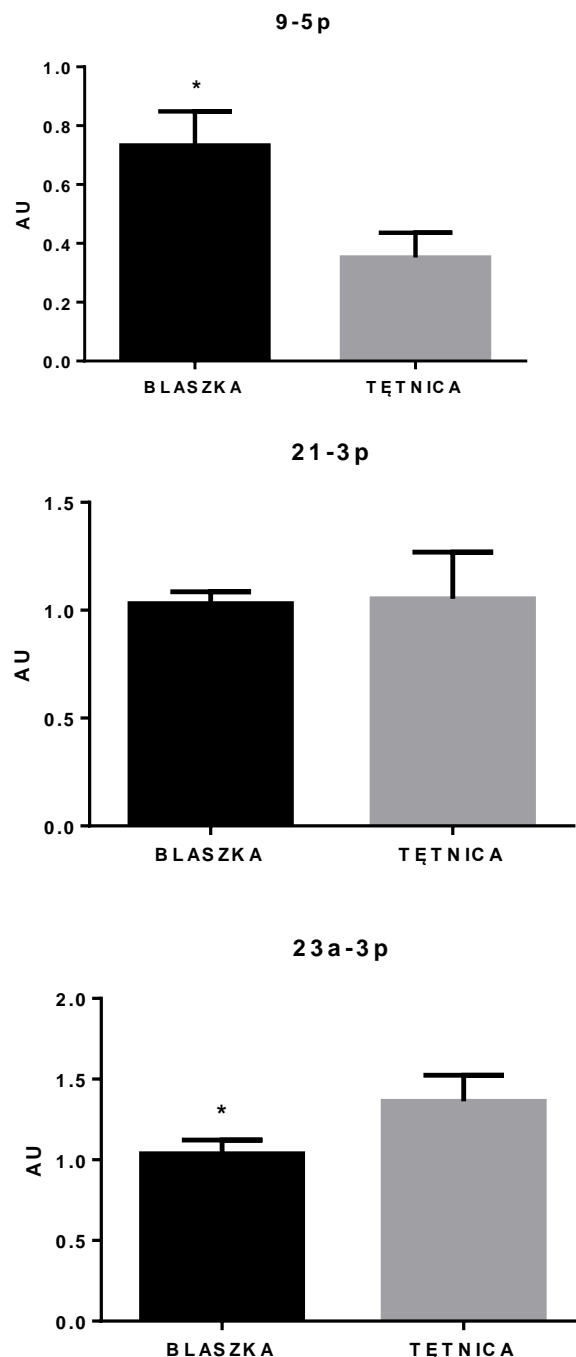
## **5.2. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA w blaszce miażdżycowej i tkance niezmięnionej miażdżycowo tętnicy.**

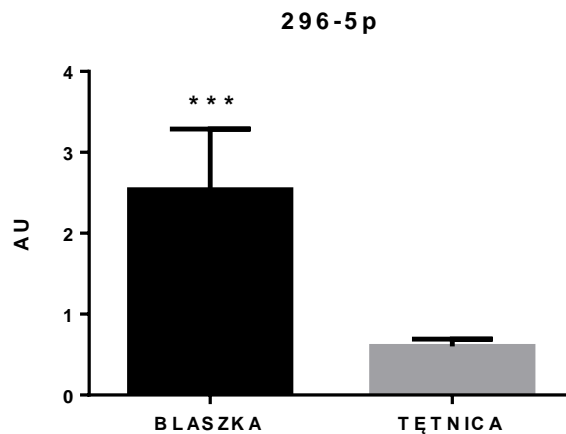
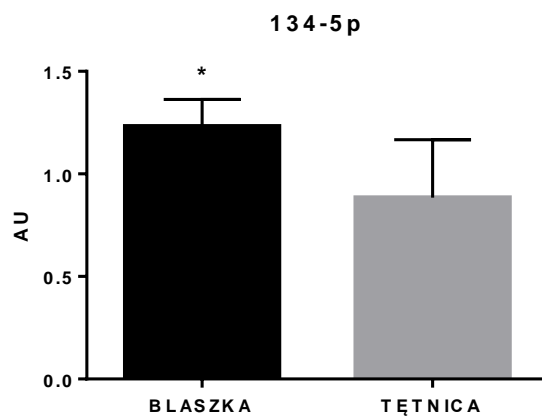
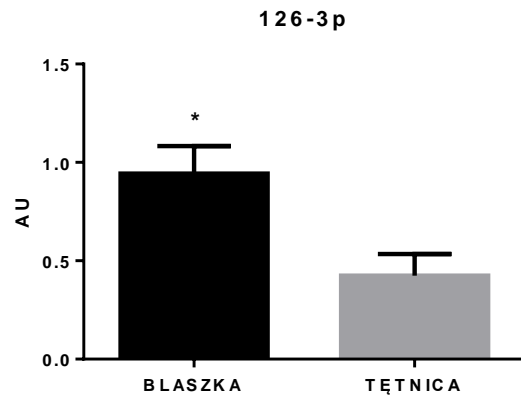
Wyniki przeprowadzonych analiz molekularnych mających na celu ocenę ekspresji wybranych mikroRNA w blaszkach miażdżycowych pozyskanych od pacjentów zrekrutowanych do badania oraz porównanych do poziomów ekspresji w niezmięnionej miażdżycowo tętnicy przedstawiono w kolejnych trzech podrozdziałach pracy.

### **5.2.1. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłonka oraz stanem niedokrwienia tkankowego.**

Pierwszym etapem tej analizy było określenie poziomów ekspresji mikroRNA, dla których wykazano na podstawie danych literaturowych pełnienie istotnej roli w regulacji procesu angiogenezy oraz regulacji metabolizmu śródbłonka i procesu uogólnionego niedokrwienia tkankowego. Wykazano, że blaszki miażdżycowe (grupa „BLASZKA”) miały istotnie podwyższony poziom ekspresji w stosunku do

niezmienionej miażdżycowo ściany tętnicy (grupa „TĘTNICA”) następujących mikroRNA: miR-9-5p (109% wzrost,  $p=0,04$ ), miR-126-3p (124% wzrost,  $p=0,01$ ), miR-134-5p (40% wzrost,  $p=0,04$ ) i miR-296-5p (323% wzrost,  $p=0,0005$ ). Wykazano również, że blaszki miażdżycowe pozyskane z rozwidlenia tętnic szyjnych wspólnych miały istotnie niższy poziom ekspresji miR-23a-3p (24% redukcji,  $p=0,01$ ) w stosunku do niezmienionej miażdżycowo ściany tętnicy. Poziom ekspresji miR-21-3p nie różnił się istotnie w puli mikroRNA wyizolowanego z blaszki miażdżycowej oraz z niezmienionej miażdżycowo tętnicy. Na Ryc. 4 ukazano zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy statystycznej ekspresji powyższej grupy cząstek mikroRNA o określonej funkcji biologicznej.



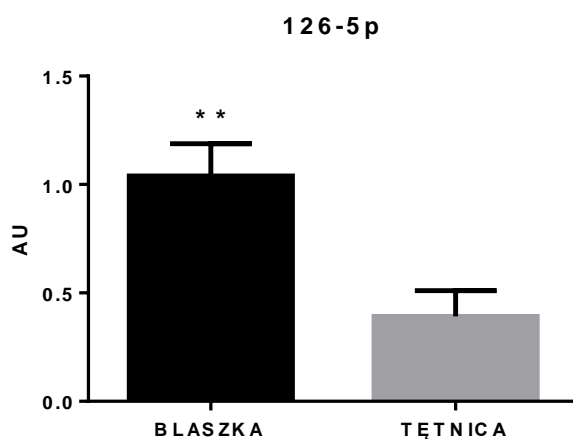
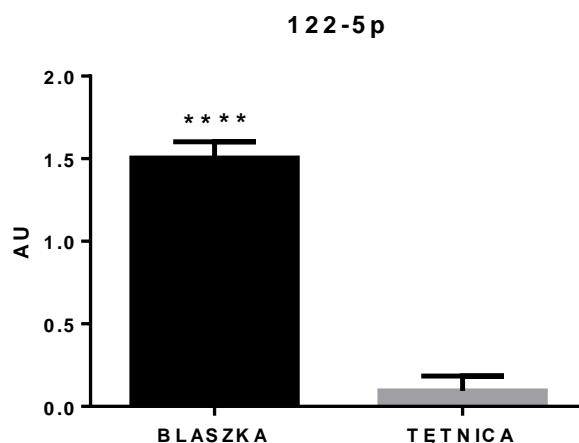


**Rycina 4.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-9-5p, miR-21-3p, miR-23a-3p, miR-126-3p, miR-134-5p i miR-296-5p) związanych z wewnątrzkomórkową regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłonka oraz stanem niedokrwienia tkankowego analizowany w blaszkach miażdżycowych pozyskanych od pacjentów zrekrutowanych do badania oraz w niezmienionej miażdżycowo tętnicy. Wyniki zostały wyrażone w jednostkach względnych [ $\bar{x} \pm SD$ , \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ]

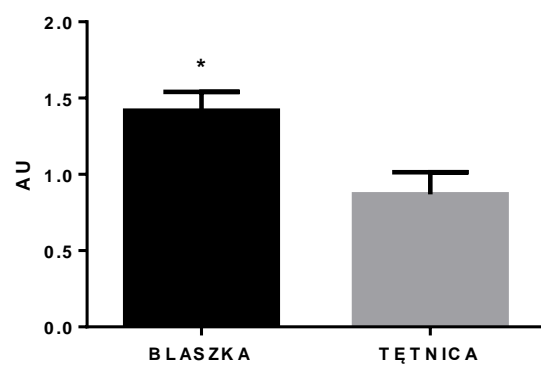


### 5.2.2. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z regulacją stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego.

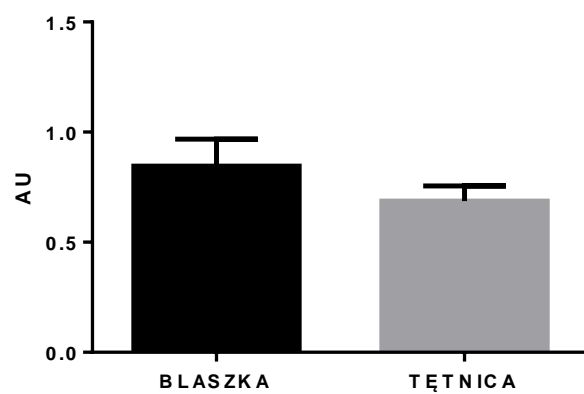
Następnym etapem tej analizy było określenie poziomów ekspresji mikroRNA, dla których wykazano na podstawie danych literaturowych pełnienie istotnej roli w regulacji stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego. Wykazano, że blaszki miażdżycowe (grupa „BLASZKA”) miały istotnie podwyższony poziom ekspresji w stosunku do niezmienionej miażdżycowo ściany tętnicy (grupa „TĘTNICA”) następujących mikroRNA: miR-122-5p (1566% wzrost,  $p=0,0001$ ), miR-126-5p (166% wzrost,  $p=0,002$ ), miR-133b (63% wzrost,  $p=0,03$ ) i miR-150-5p (62% wzrost,  $p=0,04$ ). Poziom ekspresji dwóch analizowanych cząstek mikroRNA, tj. miR-146a i miR-155-5p nie różnił się istotnie w puli mikroRNA wyizolowanego z blaszki miażdżycowej oraz ze ściany niezmienionej miażdżycowo tętnicy. Na Ryc. 5 ukazano zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy statystycznej ekspresji powyższej grupy cząstek mikroRNA o określonej funkcji biologicznej.



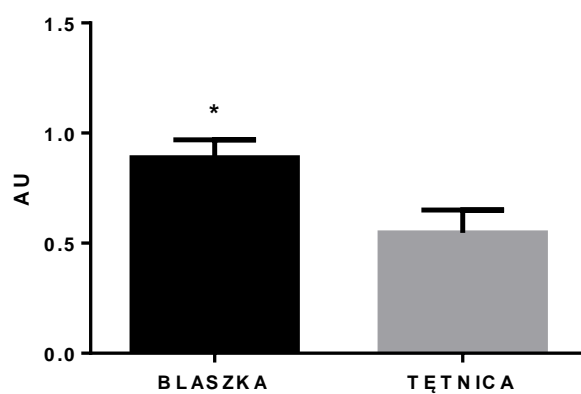
133 b

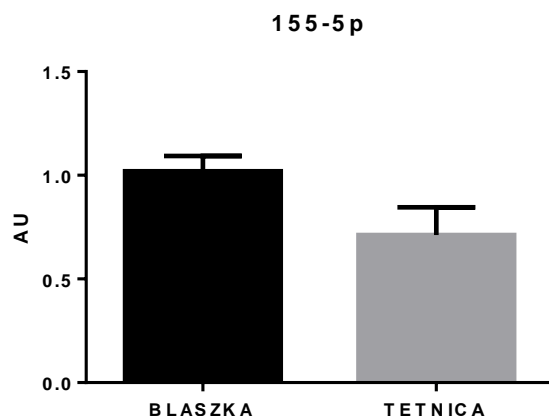


146 a



150-5p

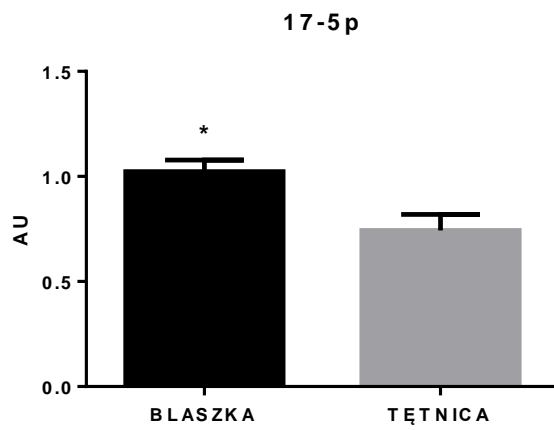
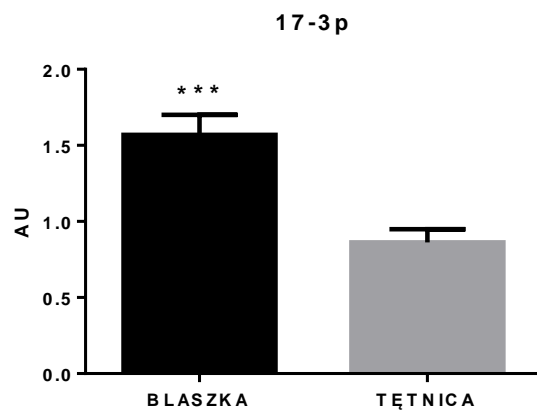
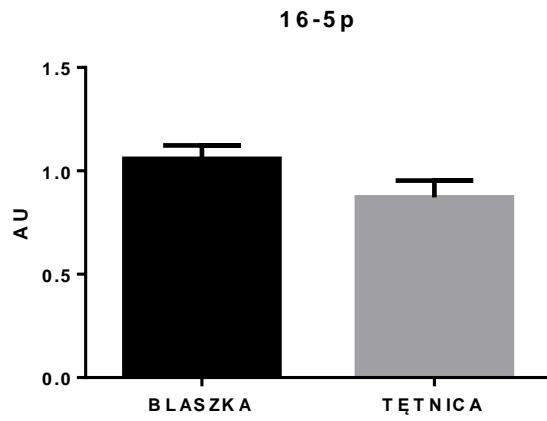


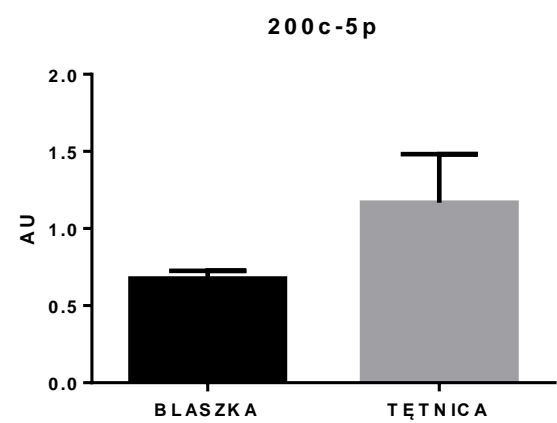
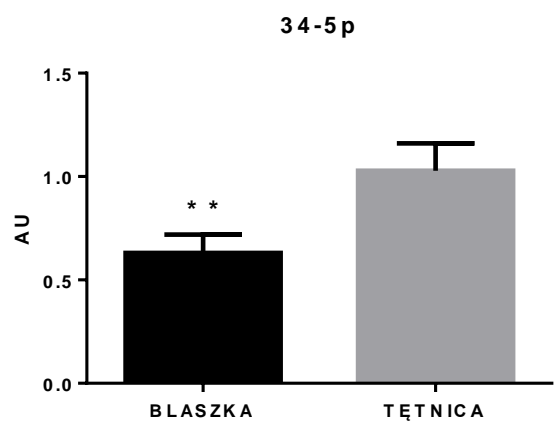
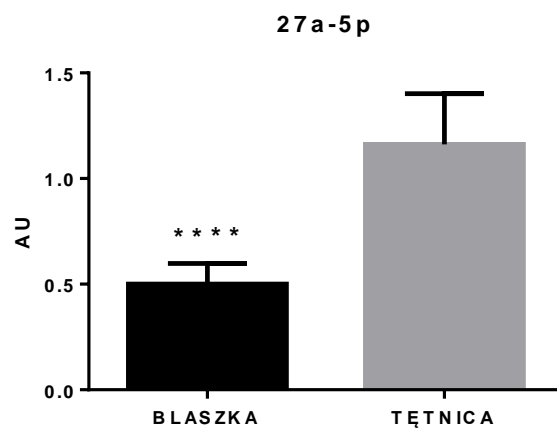


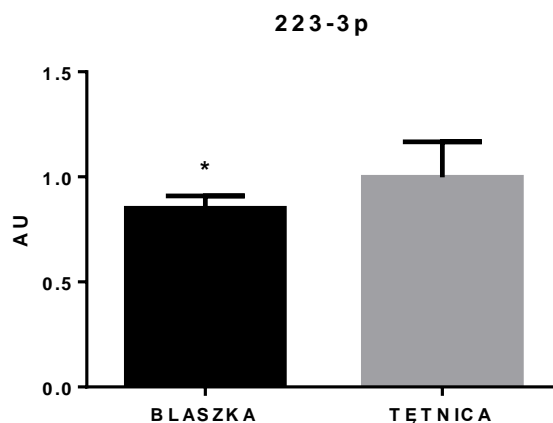
**Rycina 5.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-30b, miR-122-5p, miR-133b, miR-146a, miR-150-5p i miR-155-5p) związanych z wewnątrzkomórkową regulacją stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego, analizowany w blaszkach miażdżycowych pozyskanych od pacjentów zrekrutowanych do badania oraz w niezmienionej miażdżycowo tętnicy. Wyniki zostały wyrażone w jednostkach względnych [ $\bar{x} \pm SD$ , \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ]

### 5.2.3. Ocena ekspresji wybranych mikroRNA związanych z wewnątrzkomórkową regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek.

Kolejnym etapem tej analizy było określenie poziomów ekspresji mikroRNA, dla których wykazano na podstawie danych literaturowych pełnienie istotnej roli w regulacji procesu angiogenezy oraz regulacji metabolizmu śródbłonna i procesu uogólnionego niedokrwienia tkankowego. Wykazano, że blaszki miażdżycowe (grupa „BLASZKA”) miały istotnie podwyższony poziom ekspresji w stosunku do niezmienionej miażdżycowo ściany tętnicy (grupa „TĘTNICA”) następujących sekwencji mikroRNA: miR-17-3p (83% wzrost,  $p=0,0002$ ) i miR-17-5p (38% wzrost,  $p=0,01$ ). Wykazano również, że blaszki miażdżycowe pozyskane z rozwidlenia tętnic szyjnych wspólnych miały istotnie niższy poziom ekspresji cząstek: miR-27a-5p (57% redukcji,  $p=0,0001$ ), miR-34-5p (39% redukcji,  $p=0,002$ ) i miR-223-3p (15% redukcji,  $p=0,03$ ) w stosunku do niezmienionej miażdżycowo ściany tętnicy. Poziom ekspresji dwóch cząstek: miR-16-5p i miR-200c-5p nie różnił się istotnie w puli mikroRNA wyizolowanego z blaszki miażdżycowej oraz z niezmienionej miażdżycowo tętnicy. Na Ryc. 6 ukazano zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy statystycznej ekspresji powyższej grupy cząstek mikroRNA o określonej funkcji biologicznej







**Rycina 6.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-16-5p, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-200c-5p i miR-223-3p) związanych z wewnątrzkomórkową regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek, analizowany w blaszkach miażdżycowych pozyskanych od pacjentów zrekrutowanych do badania oraz w niezmienionej miażdżycowo tętnicy. Wyniki zostały wyrażone w jednostkach względnych [ $x \pm SD$ , \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ]

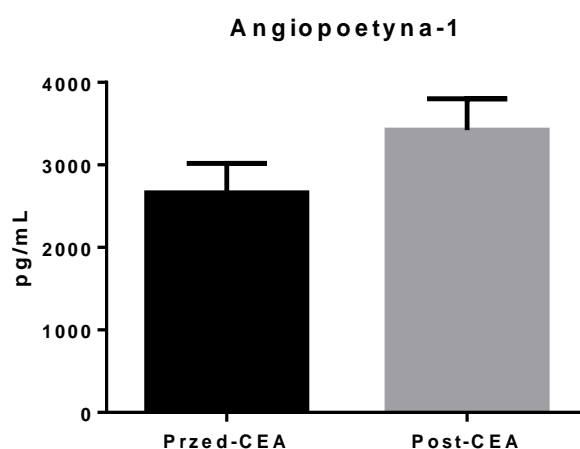
### **5.3. Ocena osoczowego stężenia wybranych czynników białkowych uczestniczących w metabolizmie tkanki łącznej, w tym w procesach syntezy i degradacji składników włóknistych ściany tętnic.**

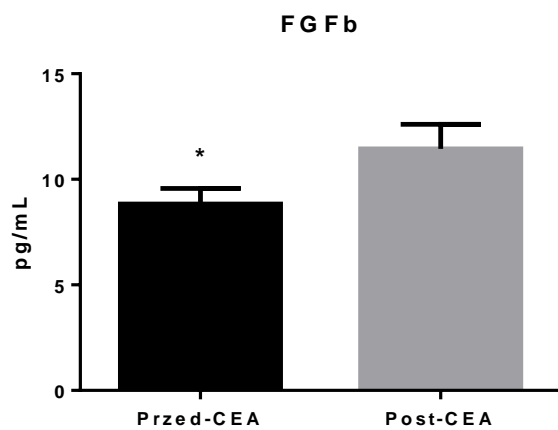
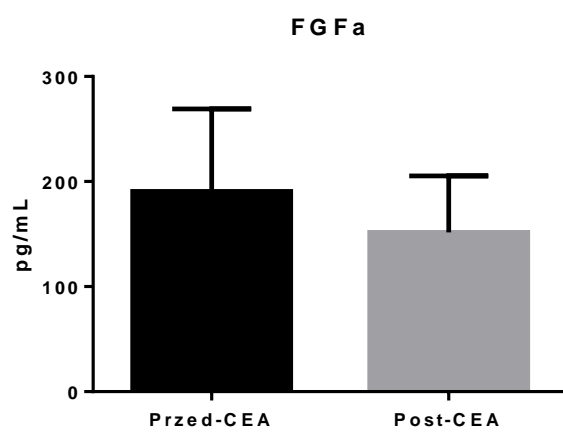
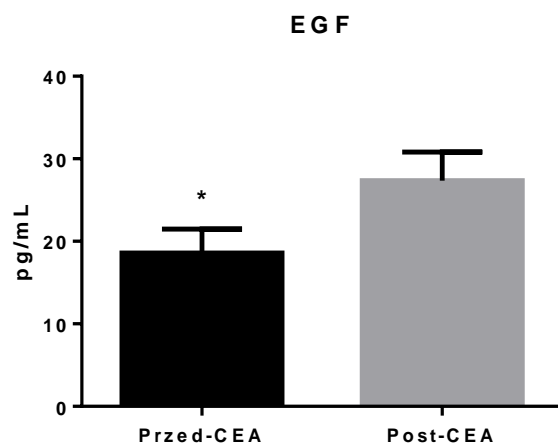
W celu rozszerzenia i uzupełnienia przeprowadzonych dotychczas badań nt. ekspresji mikroRNA związanego z wewnątrzkomórkową regulacją podstawowych procesów biologicznych w komórkach krwi obwodowej u pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej, postanowiono dokonać oceny produkcji i aktywnej sekrecji do krwi obwodowej białek o charakterze ochronnym dla komórek śródbłonna, reprezentujących tzw. grupę czynników angioprotekcyjnych i wykazujących właściwości pro-proliferacyjne i anty-apoptotyczne w komórkach układu krwionośnego. W tej grupie badanych substancji białkowych znalazły się czynniki wzrostu: angiopoetyna-1, EGF, FGFa, FGFb, VEGF oraz cytokina IL-6. Równolegle oceniono także stężenia czynników białkowych mających wpływ na regulację procesów anabolicznych i katabolicznych warunkujących metabolizm tkanki łącznej i jej patofizjologię w warunkach aktywnego procesu miażdżycowego ustalonego w obrębie tętnic domózgowych u pacjentów zrekrutowanych do badania. W tej grupie badanych substancji białkowych znalazły się czynniki wzrostu: BMP-2 i BMP-4, należące do

nadrodziny transformujących czynników wzrostowych TGF-beta, Metaloproteinazy macierzy (MMP-1 i MMP-3) należące do grupy enzymów proteolitycznych a także swoisty tkankowy inhibitor metaloproteinaz (TIMP-1) oraz białko strukturalne ściany naczyniowej – Kolagen-1-alfa. Pomiaru stężenia dokonano w osoczu krwi obwodowej pozyskanej przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz w osoczu krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną (grupa „post-CEA”).

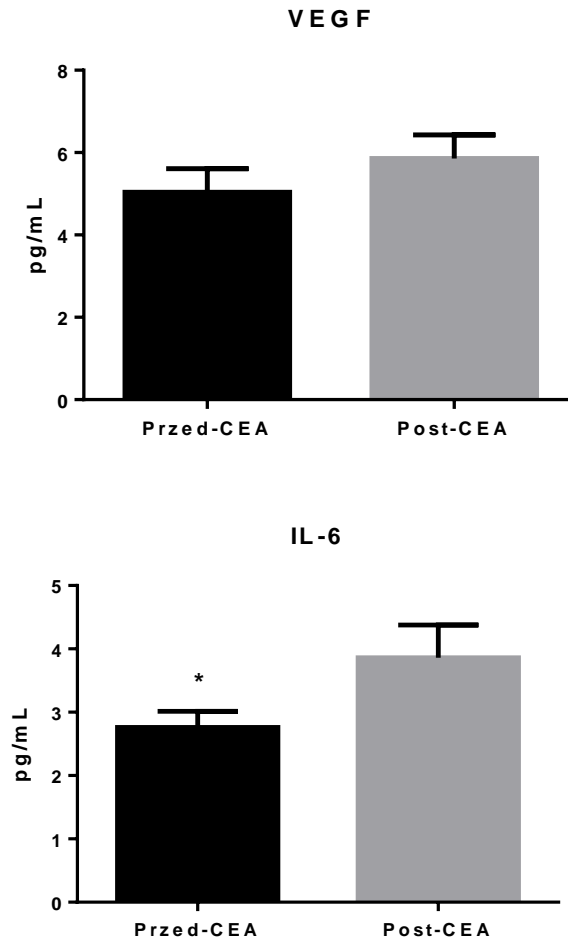
### 5.3.1. Ocena stężenia wybranych czynników wzrostu i cytokin o właściwościach angio-protekcyjnych.

Wykazano, że w osoczu krwi obwodowej pobranej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) jest istotnie obniżony poziom takich czynników wzrostu oraz cytokin jak: EGF (32% redukcji,  $p=0,05$ ), FGFb (23% redukcji,  $p=0,05$ ) oraz IL-6 (28% redukcji,  $p=0,04$ ) w stosunku do poziomu stężenia ocenionego we krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach po usunięciu blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA). Osoczowe stężenie angiopoetyny-1, FGFa oraz VEGF nie różniło się istotnie we krwi obwodowej zarówno przed zabiegiem usunięcia blaszki miażdżycowej ani w 3 miesiące po zabiegu CEA. Na Ryc. 7 przedstawiono zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy statystycznej poziomu stężeń wybranych substancji biologicznie czynnych obejmujących czynniki wzrostu i cytokiny o określonej funkcji biologicznej w układzie krwionośnym, w tym roli ochronnej dla komórek śródbłonna.







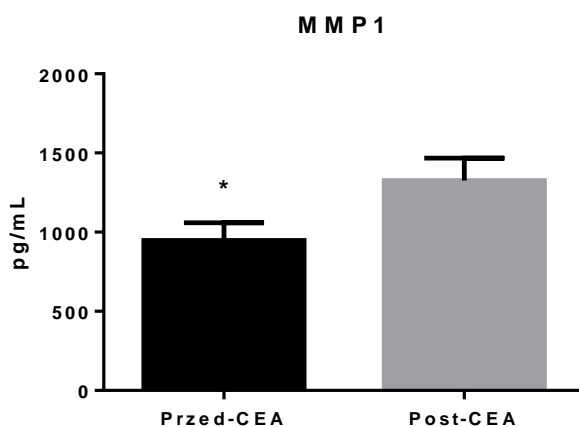
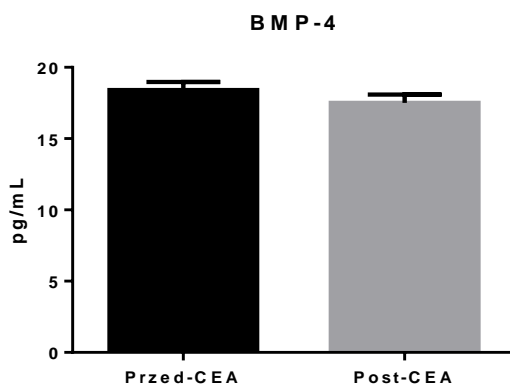
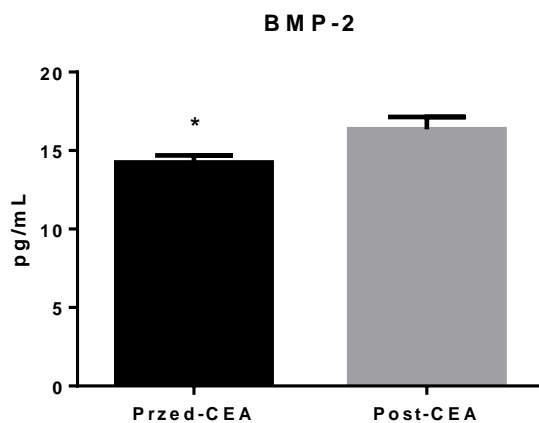


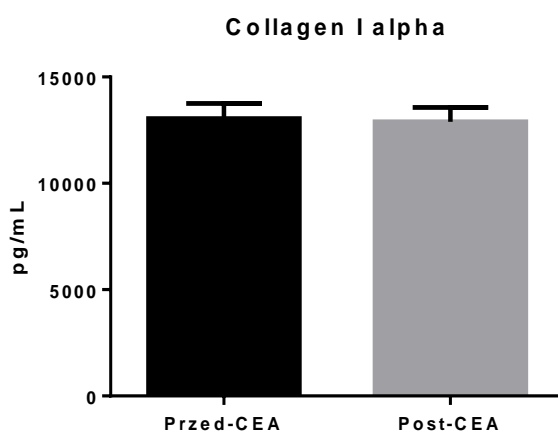
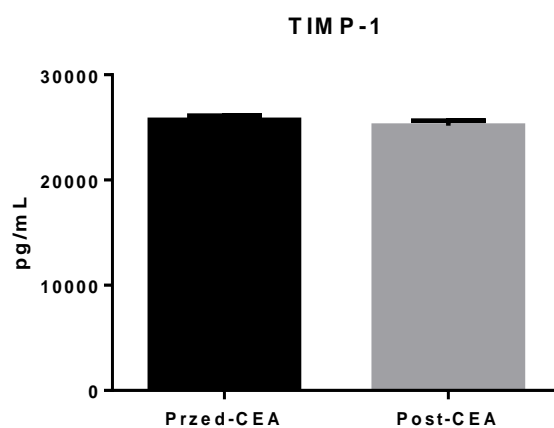
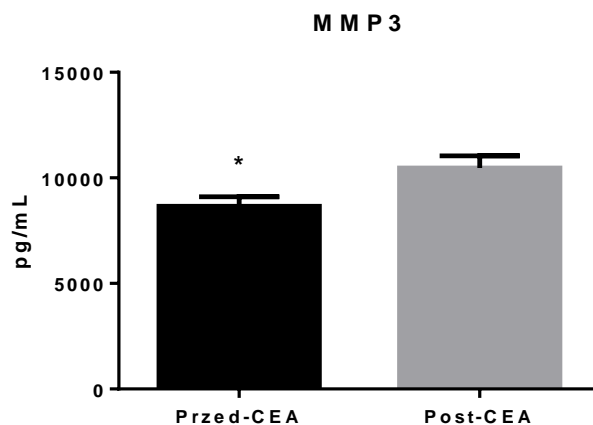
**Rycina 7.** Detekcja i ocena stężenia wybranych czynników wzrostu (angiopoetyna-1, EGF, FGfA, FGfB, VEGF) oraz cytokin (IL-6) w osoczu krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz w osoczu krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną (grupa „post-CEA”). Wyniki zostały wyrażone w jednostkach bezwzględnych (pg/mL) [ $x \pm SD$ , \* $p < 0,05$ ]

### 5.3.2. Ocena stężenia wybranych czynników białkowych, w tym enzymów, które zapewniają integralność naczyń krwionośnych.

Wykazano, że w osoczu krwi obwodowej pobranej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) jest istotnie obniżony poziom takich czynników wzrostu pełniących istotną funkcję w rozwoju naczyń krwionośnych jak BMP-2 (13% redukcji,  $p=0,02$ ) oraz enzymów, tj. MMP-1 (30% redukcji,  $p=0,03$ ) oraz MMP-3 (20% redukcji,  $p=0,01$ ) w stosunku do poziomu stężenia ocenionego we krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach po usunięciu blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA). Osoczowe stężenie substancji biologicznie czynnych jak: BMP-4 i TIMP-1 oraz białka strukturalnego Kolagenu-1-alfa nie różniło się istotnie we krwi obwodowej zarówno przed zabiegiem usunięcia blaszki miażdżycowej ani w 3 miesiące po zabiegu CEA. Na Ryc. 8 przedstawiono zbiorczo

wyniki uzyskane w trakcie analizy poziomu stężeń wybranych substancji biologicznie czynnych obejmujących czynniki wzrostu, enzymy oraz białka strukturalne istotne dla patofizjologii ściany naczyniowej, w tym w warunkach aktywnego procesu miażdżycowego.





**Rycina 8.** Detekcja i ocena stężenia wybranych czynników białkowych (BMP-2, BMP-4, MMP-1, MMP-3, TIMP-1 oraz Kolagen-1-alfa), w tym enzymów, które zapewniają integralność naczyń krwionośnych w osoczu krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz w osoczu krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną (grupa „post-CEA”). Wyniki zostały wyrażone w jednostkach bezwzględnych (pg/mL) [ $x \pm SD$ ,  $*p < 0,05$ ].

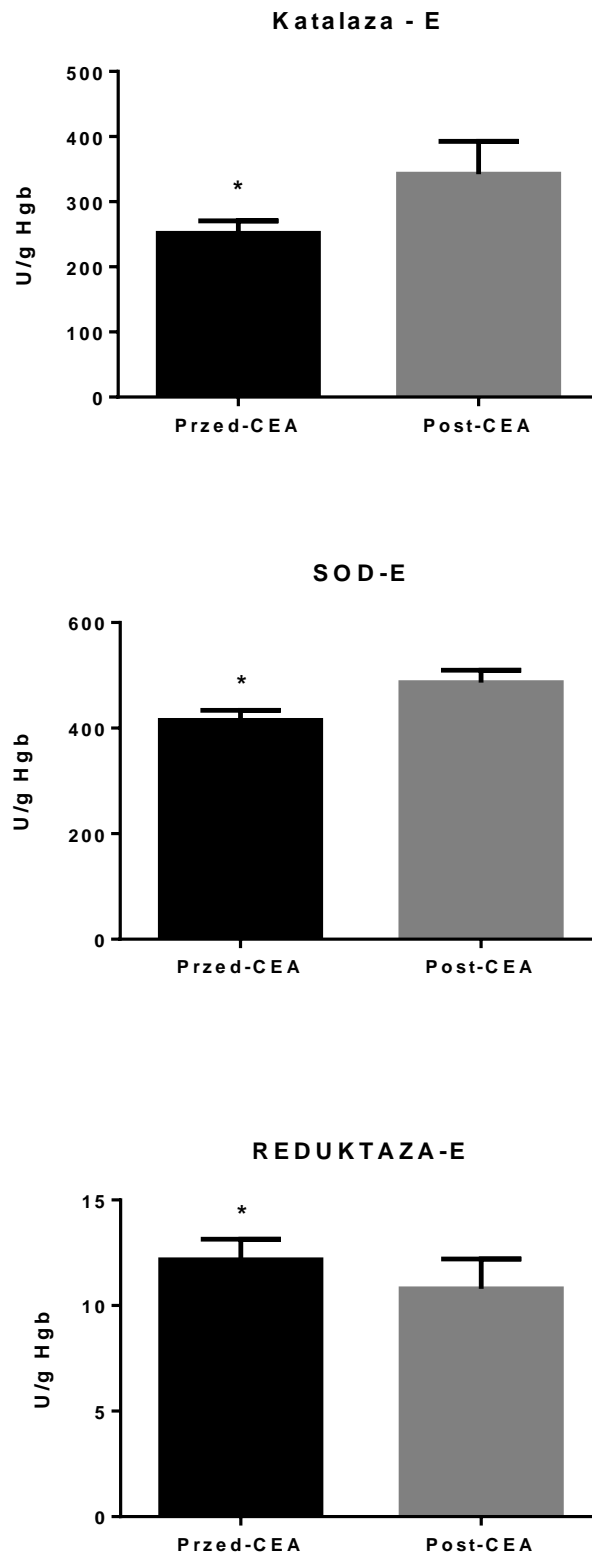
#### **5.4. Ocena patofizjologicznych mechanizmów ochrony składników ścian naczyń przed uszkodzeniami oksydacyjnymi**

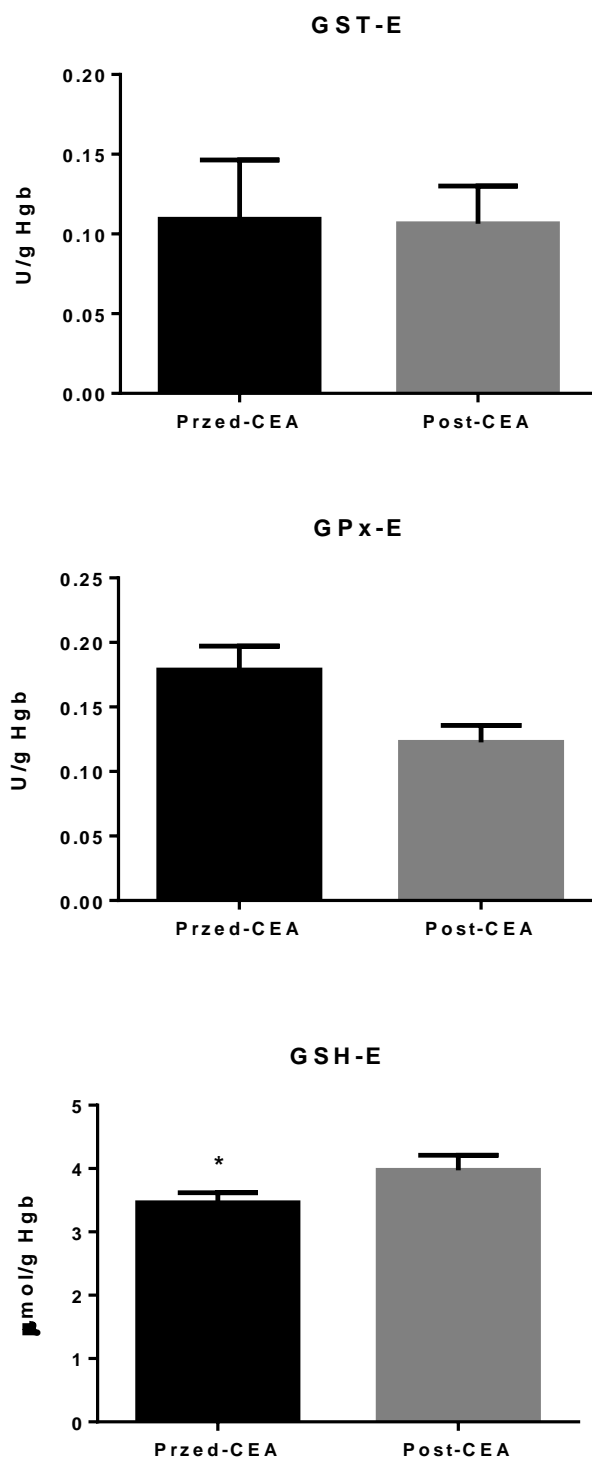
Ostatnim etapem pracy badawczej było określenie poziomu składników systemu obrony antyoksydacyjnej organizmu przed czynnikami stresu oksydacyjnego, głównie w postaci reaktywnych form tlenu. Do tej analizy substancji biologicznie czynnych o właściwościach antyoksydacyjnych wybrano enzymy wewnątrzkomórkowe, tzw. antyoksydanty enzymatyczne, tj. katalazę (CAT), dysmutazę ponadtlenkową (SOD), peroksydazę glutationową (GPx), S-transferazę glutationową (GST) i reduktazę glutationową (GR). Dodatkowo, do analiz molekularnych włączono także niskocząsteczkowe związki organiczne, nazywane „wymiataczami” wolnych rodników, tzw. nieenzymatyczne antyoksydanty hydrofilowe, tj. zredukowany glutation (GSH). Pomiarów poziomu aktywności enzymatycznej oraz oceny stężenia GSH dokonano oddzielnie w dwóch populacjach komórkowych pozyskanych z krwi obwodowej w badanej grupie pacjentów, tj. w erytrocytach i płytkach krwi.

##### **5.4.1. Parametry obrony antyoksydacyjnej oceniane w erytrocytach krwi obwodowej u pacjentów z istotnym zwężeniem tętnicy szyjnej**

Wykazano, że w erytrocytach krążących we krwi obwodowej pobranej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) jest istotnie obniżony poziom aktywności takich antyoksydantów jak: CAT (27% redukcji,  $p=0,04$ ) oraz SOD (15% redukcji,  $p=0,02$ ), a także stężenie GSH (13% redukcji,  $p=0,04$ ), w stosunku do poziomu ocenionego w erytrocytach we krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach po usunięciu blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA). Wykazano również, że erytrocyty pozyskane z krwi obwodowej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) miały istotnie wyższy poziom aktywności enzymatycznej Reduktazy glutationowej (13% redukcji,  $p=0,03$ ) w stosunku do grupy po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA). Ponadto, ustalono, że poziomy aktywności takich antyoksydantów enzymatycznych jak GST i GPx nie różniły się istotnie w erytrocytach we krwi obwodowej zarówno przed zabiegiem usunięcia blaszki miażdżycowej ani w 3 miesiące po zabiegu CEA, choć w tym ostatnim przypadku zaobserwowano tendencję do wzrostu stężenia GPx w grupie przed-CEA, jednakże była ona nieznamienne statystycznie. Na

Ryc. 9 przedstawiono zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy poziomów wybranych antyoksydantów, obejmujących enzymatyczne i nieenzymatyczne składniki systemu obrony antyoksydacyjnej w erytrocytach.

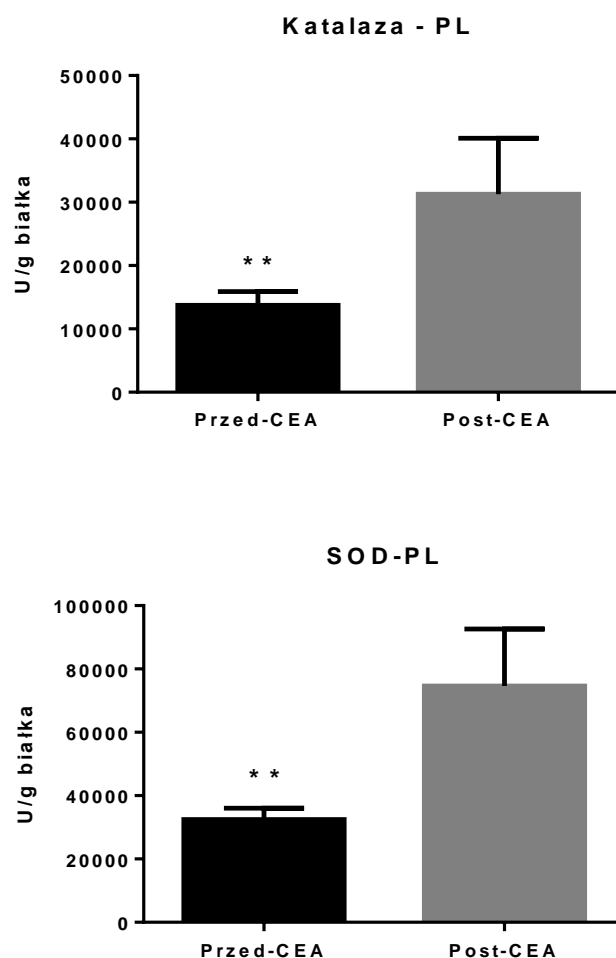


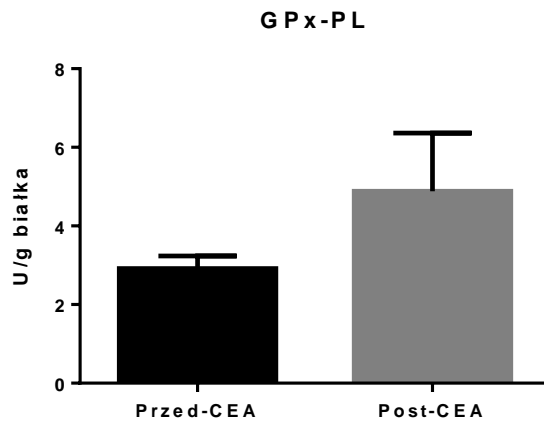
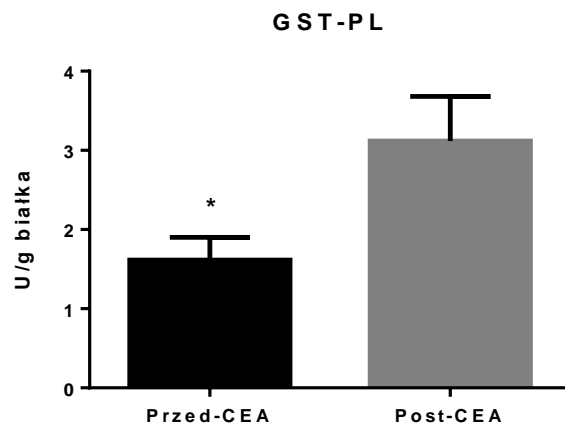
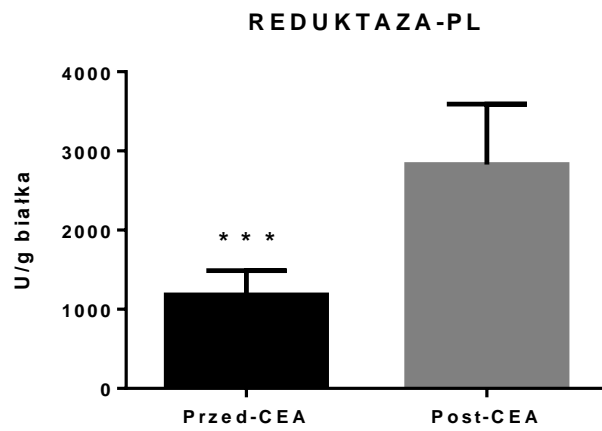


**Rycina 9.** Ocena aktywności wybranych enzymów wewnątrzkomórkowych (CAT, SOD, GST, GPx, GR) oraz stężenia glutationu o właściwościach endogennych antyoksydantów w erytrocytach krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną (grupa „post-CEA”). Końcowe wartości aktywności badanych enzymów oraz stężenia glutationu znormalizowano w odniesieniu do stężenia białka hemoglobiny dla poszczególnych próbek. Wyniki zostały wyrażone jako średnia  $\pm$  SD. E - erytrocyty.

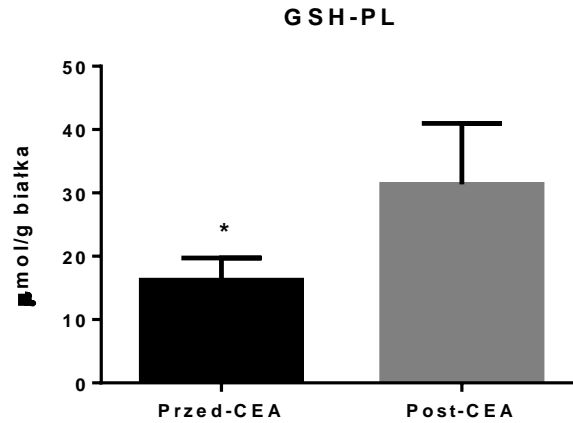
#### 5.4.2. Parametry obrony antyoksydacyjnej oceniane w płytkach krwi obwodowej u pacjentów z istotnym zwężeniem tętnicy szyjnej.

Wykazano, że w płytkach krwi krążących we krwi obwodowej pobranej przed zabiegiem operacyjnym (grupa przed-CEA) jest istotnie obniżony poziom aktywności takich antyoksydantów jak: CAT (55% redukcji,  $p=0,008$ ), SOD (55% redukcji,  $p=0,001$ ), Reduktaza (58% redukcji,  $p=0,0003$ ) oraz GST (48% redukcji,  $p=0,04$ ), a także stężenie GSH (48% redukcji,  $p=0,03$ ), w stosunku do poziomu ocenionego w płytkach krwi krążących we krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach po usunięciu blaszki miażdżycowej (grupa post-CEA). Ponadto, ustalono, że poziomy aktywności enzymatycznej GPx nie różniły się istotnie w płytkach krwi pozyskanych z krwi obwodowej zarówno przed zabiegiem usunięcia blaszki miażdżycowej ani w 3 miesiące po zabiegu CEA, choć zaobserwowano tendencję do spadku aktywności GPx w grupie przed-CEA, podobnie jak innych badanych antyoksydantów, jednakże różnica ta była nieznamienista statystycznie. Na Ryc. 10 przedstawiono zbiorczo wyniki uzyskane w trakcie analizy poziomów wybranych antyoksydantów, obejmujących enzymatyczne i nieenzymatyczne składniki systemu obrony antyoksydacyjnej w płytkach krwi.









**Rycina 10.** Ocena aktywności wybranych enzymów wewnątrzkomórkowych (CAT, SOD, GST, GPx, GR) oraz stężenia glutationu o właściwościach endogennych antyoksydantów w płytkach krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną (grupa „post-CEA”). Końcowe wartości aktywności badanych enzymów oraz stężenia glutationu znormalizowano w odniesieniu do stężenia białka całkowitego dla poszczególnych próbek. Wyniki zostały wyrażone jako średnia  $\pm$  SD. PL - płytki krwi.

## 6. Dyskusja.

Udar niedokrwienny mózgu współwystępuje ze zmianami miażdżycowymi w tętnicach domózgowych, najczęściej powodującymi zwężenie początkowego odcinka tętnicy szyjnej wewnętrznej [249]. Zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej może przebiegać w sposób objawowy obejmujący różnorodny neurologiczny obraz kliniczny. Z piśmiennictwa wiadomo, że zmiany miażdżycowe w tętnicach szyjnych są przyczyną udaru u około 40% chorych [250]. Dodatkowo, częstym objawem neurologicznym są przemijające okresy niedokrwienia OUN, tzw. incydenty niedokrwienne TIA (ang. *Transient Ischemic Attacks*), które często przyjmują wśród pacjentów postać krótkotrwałej utraty przytomności. W praktyce klinicznej również często obserwuje się brak związku między drożnością oraz wielkością zwężenia przeciwległej tętnicy szyjnej wewnętrznej i nasileniem neurologicznych objawów klinicznych, wynikających z niedokrwienia struktur mózgu. Przyczyna obserwowanych różnic jest wysoce indywidualna i bardzo często może wynikać ze zmiennej osobniczo wydolności mózgowego krążenia obocznego. Do innych częstych czynników ryzyka, predysponujących do udaru niedokrwiennego mózgu, należy zaliczyć schorzenia ogólne jak nadciśnienie tętnicze, wcześniej przebyty zawał serca oraz przewlekła choroba niedokrwienna serca, a także cukrzyca i uprzednio przebyty udar mózgu, który w badanej w tym projekcie kohorcie pacjentów występował u 33% chorych. Równolegle, znaczna część udarów może również wystąpić bez objawów ostrzegawczych, co każe położyć nacisk na potrzebę starannej obserwacji pacjentów, zwłaszcza w wymienionych powyżej grupach zwiększonego ryzyka rozwoju udaru. W tym w grupie chorych ze zwężeniem tętnicy szyjnej, o charakterze zarówno objawowym i bezobjawowym [251].

Interesujący jest fakt, że częstość występowania oraz umieralność na udar niedokrwienny mózgu aktualnie zmniejsza się stopniowo w krajach wysoko i bardzo wysoko rozwiniętych. Powszechnie uważa się, że przyczyn tej obserwacji należy upatrywać w stosunkowo wczesnym rozpoznawaniu i właściwym oraz skutecznym leczeniu nadciśnienia tętniczego krwi, zmianie sposobów żywienia i nawyków żywieniowych oraz ogólną zmianą stylu życia na bardziej prozdrowotny, który jest promowany zwłaszcza przez przedstawicieli służby zdrowia oraz rozpowszechniany przez media społecznościowe. Wpływ na to ma także wczesne wdrażanie leczenia przeciwkrzepliwego i antypłytkowego w profilaktyce pierwotnej i wtórnej stanów niedokrwienych, zarówno serca jak i mózgowia. Zadaniem współczesnego leczenia

farmakologicznego jest zmniejszanie postępu choroby i ochrona przed wystąpieniem udaru mózgu. Wykazano, że leki przeciwplatekcyjne zmniejszają zachorowalność na udar mózgu, a statyny mają działanie stabilizujące blaszkę miażdżycową. Niestety, dynamika progresji zwężenia tętnicy szyjnej jest nieprzewidywalna, choroba może postępować szybko lub wolno albo utrzymywać się na stabilnym poziomie przez wiele lat. Z tego powodu wczesne rozpoznanie i monitorowanie oraz leczenie zwężenia tętnic szyjnych wewnętrznych ma również istotne znaczenie w procesie zapobiegania zarówno przemijającym incydentom niedokrwinnym jak i dokonanemu udarowi mózgu [252]. Zwężenia tętnicy szyjnej kwalifikujące się do rewaskularyzacji odpowiadają za 5–12% pierwszorazowych przypadków udarów mózgu [253]. Dowiedziono skuteczności endarterektomii tętnicy szyjnej (CEA) w zapobieganiu udarom mózgu u pacjentów ze zwężeniem tętnicy szyjnej [250]. Aktualnie, zabieg CEA jest standardowym leczeniem rewaskularyzacyjnym tętnic szyjnych wewnętrznych w przebiegu miażdżycy [239]. Zabieg ten jest wykonywany u pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnic powyżej 70%.

Główną przyczyną zwężeń tętnic szyjnych jest miażdżycy, która stanowi 90% przypadków zwężenia. Znacznie rzadszymi przyczynami są procesy zakrzepowe na podłożu zmian zapalnych, np. różnych postaci zapalenia naczyń o charakterze vasculitis. Do innych rzadkich przyczyn zaliczyć należy także zatory, które zwężają światło tętnicy od wewnątrz oraz urazy, nowotwory lub powiększone węzły chłonne szyi, które zwężają światło naczyń od zewnątrz. Do czynników zwiększających ryzyko zwężenia tętnic szyjnych należą wiek powyżej 60 lat, płeć męska, nikotynizm, alkoholizm, występowanie nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca, cukrzycy i zaburzeń lipidowych, zwłaszcza hipercholesterolemii. Ustalono, że zmiany patologiczne tętnic szyjnych najczęściej rozwijają się w rozwidleniu tętnicy szyjnej wspólnej oraz początkowym odcinku tętnicy szyjnej wewnętrznej. Objawy kliniczne zaburzenia drożności tętnicy szyjnej wewnętrznej zależą od kilku czynników, do których zaliczyć należy lokalizację i stopień zwężenia oraz szybkość rozwoju zwężenia. Zwężenie miażdżycowe może następować stopniowo na skutek powolnego wzrostu blaszek miażdżycowych albo może być dynamiczne w wyniku krwawienia z wrzodziejącej blaszki miażdżycowej. Za zwężenie istotne hemodynamicznie w tętnicy szyjnej wewnętrznej ustalono zwężenie powyżej 70% powierzchni przekroju naczynia tętniczego, gdyż powoduje ono znaczny spadek przepływu krwi przez zwężenie oraz ciśnienia krwi. Jak wspomniano powyżej, upośledzenie drożności tętnicy szyjnej

wewnętrznej prowadzi do różnorodnego obrazu klinicznego, mogącego obejmować różne objawy neurologiczne. Jednakże duża grupa osób z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej nie wykazuje żadnych objawów niedokrwienia mózgowia. Ta grupa chorych określana jest jako pacjenci z bezobjawowym, istotnym hemodynamicznie i jednostronnym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej.

Znaczącym problemem w aktualnej praktyce klinicznej jest sytuacja, gdy istotne hemodynamicznie zwężenie tętnic szyjnych przebiega bez objawów klinicznych. U tej części chorych kliniczny obraz neurologiczny jest najczęściej prawidłowy. Dlatego w niniejszej pracy postanowiono ocenić czy można eksperymentalnie określić molekularne biomarkery istotnego hemodynamicznie zwężenia tętnic szyjnych wewnętrznych, które możnaby oceniać w sposób nieinwazyjny za pomocą ich rutynowej analizy we krwi obwodowej. Ustalenie takich potencjalnych markerów biologicznych mogłoby stanowić pomocny parametr diagnostyczny dla lekarzy kwalifikujących w ośrodkach zajmujących się leczeniem rewaskularyzacyjnym chorób zewnątrzczaszkowych odcinków tętnic szyjnych, który może mieć znaczenie dla właściwej kwalifikacji do zabiegu endarterektomii pacjentów z bezobjawowym zwężeniem tętnicy szyjnej oraz może przyczynić się dalszego trwałego zmniejszania ryzyka pacjentów w przypadku niewłaściwej kwalifikacji do CEA. Dodatkowo, ustalenie panelu biomarkerów może przyczynić się do rozwoju narzędzi diagnostycznych, służących do oceny korzyści terapeutycznych w wybranych punktach czasowych po przeprowadzonym leczeniu operacyjnym zwężenia tętnic szyjnych. Wydaje się, że określenie nowych nieinwazyjnych biomarkerów, mających potencjalny związek z aktywnością i stabilnością blaszki miażdżycowej, może stanowić wkład specjalistów z innych dziedzin, zajmujących się tą chorobą, co w następstwie może przynieść duże korzyści wszystkim pracownikom opieki zdrowotnej, chirurgom naczyniowym oraz całemu światowemu społeczeństwu.

Wśród substancji biologicznie czynnych o charakterze potencjalnych biomarkerów zakwalifikowano do zbadania w niniejszej pracy doktorskiej 3 grupy związków organicznych, zarówno o charakterze wewnątrzkomórkowym jak i zewnątrzkomórkowym: i) mikroRNA, ii) substancje białkowe o właściwościach angioprotekcyjnych oraz regulacyjnych dla metabolizmu ściany tętnic, oraz iii) antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne. O wyborze powyższych grup związków biologicznych zdecydowały wcześniejsze badania własnej grupy badawczej z Zakładu Patologii Ogólnej PUM w Szczecinie, które wykazały, że analiza profilu

ekspresji wybranych mikroRNA w populacji komórek jądrzastych krążących we krwi obwodowej może mieć związek z uogólnionymi zaburzeniami metabolicznymi i stanami patologicznymi w badanych organizmach. Uprzednia analiza wybranych mikroRNA związanych z aktywnością biologiczną śródbłónka naczyniowego i określanych w literaturze jako „angio-miRNAs” wykazała, że poziom ekspresji wielu cząstek badanego mikroRNA był znamienne obniżony w komórkach jądrzastych krwi obwodowej u pacjentów z endogennym hyperkortyzolizmem, u których również stwierdzono podwyższone stężenie endoteliny-1, co wskazywało na utrwaloną dysfunkcję śródbłónka u tych pacjentów i mogło tłumaczyć określone istotne zmiany ekspresji „angiogennych mikroRNA” [254]. „Angiogenne mikroRNA” okazały się być również ważnymi biomarkerami patologii związanych z zaburzoną angiogenezą nie tylko w grupie dorosłych pacjentów zacytowanej powyżej, ale także w grupie noworodków przedwcześnie urodzonych. I w tym wypadku, poziom ekspresji wielu cząstek „angio-miR-ów” był znamienne obniżony w komórkach jądrzastych krwi pępowinowej pozyskanej zaraz po urodzeniu „wczesniaków” względem poziomów ekspresji analizowanych w komórkach jądrzastych krwi pępowinowej pozyskanej po porodzie noworodków z ciąży donoszonych prawidłowo. Interesujący jest fakt, że w badanej krwi pępowinowej z grupy „wczesniaków” również stężenie 5 na 8 badanych białkowych czynników angiogennych było istotnie zmniejszone (tj. VEGF, Angiopoetyna-1, PDGF-AA, FGF-alfa i FGF-beta) [255]. Badania te były pionierskimi badaniami w literaturze światowej, które mogły przyczynić się do lepszego poznania roli wewnątrzkomórkowych mikroRNA potencjalnie zaangażowanych w kontrolę angiogenezy u „wczesniaków”. W celu zbadania mechanizmów regulujących proces zapalny w przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem, zespół badawczy z PUM przeanalizował osoczowe poziomy ogólnoustrojowych czynników pro-zapalnych i ekspresję wybranych wewnątrzkomórkowych mikroRNA, które regulują szlaki sygnałowe potencjalnie zaangażowane w patogenezę dwóch odmiennych klinicznych postaci zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (AMD), tj. pro-zapalnej postaci „wysiękowej” oraz postaci „suchej” AMD. W każdej subgrupie pacjentów zaobserwowano odmienne profile ekspresji wybranych mikroRNA, które korelowały ze zmianami poziomów stężeń osoczowych czynników zapalnych [256]. W obszarze analizy zmian ekspresji mikroRNA w przewlekłej chorobie neurologicznej, której objawy są wynikiem globalnego uszkodzenia motoneuronów rdzenia kręgowego, tj. stwardnienia zanikowego bocznego (ALS)

znaczącym sukcesem zespołu badawczego z PUM, było pierwszorazowe w świecie zastosowanie analizy ekspresji mikroRNA związanych z metabolizmem mięśni (tj. miRNA-1, miRNA-133a i miRNA-206) oraz angiogenezą i zapaleniem (tj. miRNA-155 i miRNA-378) w celu oceny uogólnionej odpowiedzi organizmu na poziomie krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego po przeszczepie komórek macierzystych jako terapii wspomagającej u pacjentów z ALS. W tym przypadku również kilka analizowanych mikroRNA istotnie zmieniło poziomy ekspresji w płynie mózgowo-rdzeniowym i osoczu po terapeutycznym podaniu komórek macierzystych do kanału kręgowego pacjentów z przewlekłą postacią ALS [257]. Na podstawie własnych wyników przedstawionych w powyższych wcześniejszych publikacjach ustalono, że możliwe jest wykazanie zmiany aktywności podstawowych mechanizmów regulacyjnych o charakterze wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym, przebiegających ze zmianą ekspresji mikroRNA oraz białkowych substancji biologicznie czynnych w wielu stanach patofizjologicznych, jakie są indukowane przez procesy chorobowe, w tym o podłożu zapalnym, podobnie jak w miażdżycy.

Choć profil ekspresji mikroRNA oraz profil oksydacyjny w różnych subpopulacjach komórek krwi był już uprzednio przedmiotem badań molekularnych prowadzonych przez inne zespoły badawcze [258, 259, 260, 261] oraz były proponowane jako potencjalne biomarkery dla pierwotnej detekcji [262] i oceny progresji [263] wybranych chorób, niewiele jest publikacji, w których opisano wyniki badań prowadzonych nad potencjalnymi biomarkerami asymptomatycznych pacjentów z istotnym hemodynamicznie zwężeniem tętnicy szyjnej [264, 265, 266, 267, 268]. W badaniach tych dominuje główna rola markerów biologicznych jako predyktorów ryzyko wystąpienia zdarzeń niedokrwiennych mózgu u tych pacjentów w okresie od 2 do 5 lat. Natomiast wyniki z badań porównujących poziomy ekspresji mikroRNA oraz substancji biologicznie czynnych przed zabiegiem i po zabiegu udrażniającym tętnice szyjne zwężone istotnie hemodynamicznie w grupie pacjentów asymptomatycznych najprawdopodobniej nie zostały do chwili obecnej ogłoszone na forum nauki światowej.

Do badania włączono 48 pacjentów w wieku 50-75 lat z bezobjawowym istotnym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (70-99%) bez klinicznych objawów procesu niedokrwiennego w ośrodkowym układzie nerwowym i zakwalifikowanych do zabiegu jednostronnej endarterektomii chirurgicznej na podstawie wyniku badania USG-Doppler zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Chirurgii

Naczyniowej (ESVS) do oceny stopnia zwężenia tętnic szyjnych. Stopień zwężenia oceniano na podstawie badania ultrasonograficznego tętnic szyjnych i kręgowych.

Kryteria włączenia stanowiły następujące parametry kliniczne i morfometryczne: 1. wiek między 50 i 75 lat; 2. zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej  $\geq 70\%$  po stronie zakwalifikowanej do zabiegu chirurgicznego i  $< 50\%$  po stronie nie objętej leczeniem chirurgicznym u pacjentów bez klinicznych objawów niedokrwienia mózgu; 3. Brak chorób internistycznych (z wyjątkiem nadciśnienia tętniczego i poza chorobami o charakterze niedokrwieniowym w sercu oraz w układzie nerwowym ośrodkowym i obwodowym). Wywiad chorobowy dotyczył przebiegu, okresu trwania oraz stosowanego leczenia choroby podstawowej związanej ze zwężeniem tętnic szyjnych oraz innych schorzeń towarzyszących. Szczególną uwagę poświęcono historii palenia papierosów oraz chorób układu krążenia (tj. nadciśnienie tętnicze, choroby serca i naczyń obwodowych czy przebyty wcześniej udar mózgu).

U wszystkich osób biorących udział w badaniu dokonano pomiaru takich parametrów jak WHR, BMI i MAP a także pobierano krew obwodową w dwóch punktach czasowych: i) przed rozpoczęciem interwencji chirurgicznej na tętnicy szyjnej wewnętrznej oraz ii) w 3. miesiącu po zabiegu endarterektomii w celu oceny parametrów hematologicznych krwi obwodowej oraz odrębnej izolacji komórek jednojądrzastych, krwinek czerwonych oraz płytek krwi, które poddawano następnie analizie molekularnej odpowiednio w kierunku ekspresji wybranych mikroRNA w przypadku komórek jednojądrzastych oraz mechanizmów obronnych przeciwko procesowi stresu oksydacyjnego w przypadku erytrocytów i trombocytów. Ocenie podlegała ekspresja wybranych mikroRNA związanych z

a) regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłonna oraz stanem niedokrwienia tkankowego (miR-9-5p, miR-21-3p, miR-23a-3p, miR-126-3p, miR-134-5p i miR-296-5p);

b) regulacją apoptozy, stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego (miR-30b, miR-122-5p, miR-133b, miR-146a, miR-150-5p i miR-155-5p);

c) regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek (miR-16-5p, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-200c-5p i miR-223-3p).

Izolowane osobno krwinki czerwone oraz płytki krwi poddano równolegle kompleksowej ocenie antyoksydantów enzymatycznych i nieenzymatycznych w erytrocytach i płytkach krwi obejmującej: a) aktywność reduktazy glutationowej; b)

aktywność dysmutazy ponadtlenkowej; c) aktywność peroksydazy glutationowej, d) aktywność transferazy S-glutationowej, e) aktywność katalazy oraz f) stężenie glutationu zredukowanego.

Natomiast w osoczu pozyskanym od zrekrutowanych do badania pacjentów analizowano stężenie wybranych ludzkich czynników wzrostu związanych z metabolizmem tkanki, tj. Angiopoetyna-1, BMP-2, BMP-4, EGF, FGF-alfa, FGF-beta i VEGF, czynników związanych z regulacją aktywności naczyniowej tkanki łącznej, takimi jak MMP-1, MMP-3 i TIMP-1 oraz Kolagen-1-alfa, a także zbadano istotną dla angiogenezy i regulacji stanu zapalnego cytokinę IL-6. Wybrane czynniki mierzono na poziomie białka w próbkach osocza za pomocą multipleksowych testów immunologicznych opartych na kulkach fluorescencyjnych.

Na podstawie całokształtu uzyskanych wstępnych wyników wyciągnięto wnioski:

- 1) Ekspresja licznych sekwencji mikroRNA regulujących poziom aktywności transkrypcyjnej wielu genów w populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej jest istotnie zależna od stenozy tętnic szyjnych w okresie bezobjawowym choroby miażdżycowej.
- 2) Asymptomatyczne zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej jest związane głównie ze znamienym obniżaniem poziomów osoczowych czynników angio-rotekcyjnych 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.

Podsumowując, zdolność mikroRNA do regulowania wielu genów, świadczy o ich zaangażowaniu w skomplikowanej sieci oddziaływań w ludzkim organizmie. Zrozumienie pełnej roli mikroRNA w funkcjach wewnątrzkomórkowych oraz zewnątrzkomórkowych procesach patologicznych, jak również zbadanie udziału czynników modulujących ich ekspresję stanowi podstawę do poznania etiopatogenezy chorób i rozwoju molekularnej diagnostyki tych chorób zarówno do detekcji jak do oceny progresji choroby. Ograniczenia finansowe i czasowe nie pozwoliły niestety na identyfikację pełnego szlaku zależności pomiędzy badanymi mikroRNA i ich możliwą wartością predykcyjną w diagnostyce asymptomatycznych zwężeń tętnic szyjnych. Jednak, z całą pewnością, uzyskane wyniki inspirują do kontynuacji rozpoczętych badań.



## 7. Streszczenie w języku polskim

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 stenozы 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 asymptomatycznej 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 asymptomatycznych 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 asymptomatyczną 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 tożsamyh sekwencji mikroRNA w pobranych blaszkach miażdżycowych oraz porównawczo w niezmienionej miażdżycowo tętnicy; c) poziomy ekspresji osoczowych czynników białkowych o właściwościach angio-protেকcyjnych 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 niezmięnionej miażdżycowo 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-rotekcyjnych wykazała że zwężenie tętnicy szyjnej wewnętrznej związane było ze znamienym 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 udroźnienia tętnicy szyjnej wewnętrznej. Żaden z osoczowych czynników angio-rotekcyjnych 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 stenozy 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 stenozą 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.

## **8. Streszczenie w języku angielskim**

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.



## 9. Bibliografia

### 2.1 Mikro RNA.

1. Haase, A. D. *et al.* TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* **6**, 961–967 (2005).
2. Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W. & Hannon, G. J. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* **465**, 584–589 (2010).
3. Hansen, T. B. *et al.* Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun* **7**, (2016).
4. Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E. C. Mammalian Mirtron Genes. *Mol Cell* **28**, 328–336 (2007).
5. Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M. & Lai, E. C. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**, 89–100 (2007).
6. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science (1979)* **303**, 95–98 (2004).
7. Knight, S. W. & Bass, B. L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science (1979)* **293**, 2269–2271 (2001).
8. Grishok, A. *et al.* Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23–34 (2001).
9. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366 (2001).
10. MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V. & Doudna, J. A. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 512–517 (2008).
11. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744 (2005).
12. Zampetaki, A. *et al.* Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* **107**, 810–817 (2010).
13. Iorio, M. V. & Croce, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* **4**, 143–159 (2012).

14. Novák, J., Kružliak, P., Bienertová-Vaškü, J., Slabý, O. & Novák, M. MicroRNA-206: A promising theranostic marker. *Theranostics* **4**, 119–133 (2014).
15. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**, 92 (2009).
16. Catalanotto, C., Cogoni, C. & Zardo, G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms17101712> (2016).

### 2.1.2 Biogeneza.

17. Meijer, H. A. *et al.* Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science (1979)* **340**, 82–85 (2013).
18. Höck, J. *et al.* Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* **8**, 1052–1060 (2007).
19. Fabian, M. R. & Sonenberg, N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: A look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 586–593 (2012).
20. Liu, J. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (1979)* **305**, 1437–1441 (2004).
21. Meister, G. *et al.* Identification of novel argonaute-associated proteins. *Current Biology* **15**, 2149–2155 (2005).
22. Chi, S. W., Hannon, G. J. & Darnell, R. B. An alternative mode of microRNA target recognition. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 321–327 (2012).
23. Lee, I. *et al.* New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* **19**, 1175–1183 (2009).
24. Forman, J. J. & Collier, H. A. The code within the code: MicroRNAs target coding regions. *Cell Cycle* **9**, 1533–1541 (2010).
25. Lytle, J. R., Yario, T. A. & Steitz, J. A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9667–9672 (2007).
26. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
27. Haase, A. D. *et al.* TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* **6**, 961–967 (2005).

28. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343–349 (2004).
29. Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W. & Hannon, G. J. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* **465**, 584–589 (2010).
30. Hansen, T. B. *et al.* Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun* **7**, (2016).
31. Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E. C. Mammalian Mirtron Genes. *Mol Cell* **28**, 328–336 (2007).
32. Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M. & Lai, E. C. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**, 89–100 (2007).
33. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science (1979)* **303**, 95–98 (2004).
34. Grishok, A. *et al.* Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23–34 (2001).
35. Knight, S. W. & Bass, B. L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science (1979)* **293**, 2269–2271 (2001).
36. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366 (2001).
37. MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V. & Doudna, J. A. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 512–517 (2008).
38. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744 (2005).
39. Zampetaki, A. *et al.* Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* **107**, 810–817 (2010).
40. Iorio, M. V. & Croce, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* **4**, 143–159 (2012).
41. Novák, J., Kružliak, P., Bienertová-Vaškü, J., Slabý, O. & Novák, M. MicroRNA-206: A promising theranostic marker. *Theranostics* **4**, 119–133 (2014).
42. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* **19**, 92–105 (2009).

43. Catalanotto, C., Cogoni, C. & Zardo, G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).

#### **2.1.4. Funkcje biologiczne wybranych miRNA i ich aktywność regulacyjna w organizmie człowieka**

44. Wu, Y. Z. *et al.* The miR-223/nuclear factor I-A axis regulates inflammation and cellular functions in intestinal tissues with necrotizing enterocolitis. *FEBS Open Bio* **11**, 1907 (2021).
45. Xi, L., Zhang, Y., Kong, S. & Liang, W. miR-34 inhibits growth and promotes apoptosis of osteosarcoma in nude mice through targetly regulating TGIF2 expression. *Biosci Rep* **38**, (2018).
46. Córdova-Rivas, S. *et al.* 5p and 3p Strands of miR-34 Family Members Have Differential Effects in Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
47. Wang, H. *et al.* MiR-223 regulates autophagy associated with cisplatin resistance by targeting FBXW7 in human non-small cell lung cancer. *Cancer Cell Int* **20**, (2020).
48. Jiao, P. *et al.* miR-223: An Effective Regulator of Immune Cell Differentiation and Inflammation. *Int J Biol Sci* **17**, 2308 (2021).
49. Lozano-Velasco, E., Galiano-Torres, J., Jodar-Garcia, A., Aranega, A. E. & Franco, D. miR-27 and miR-125 Distinctly Regulate Muscle-Enriched Transcription Factors in Cardiac and Skeletal Myocytes. *Biomed Res Int* **2015**, (2015).
50. Sweat, Y. *et al.* miR-17 acts as a tumor suppressor by negatively regulating the miR-17-92 cluster. *Mol Ther Nucleic Acids* **26**, 1148 (2021).
51. Du, K. Y., Qadir, J., Yang, B. B., Yee, A. J. & Yang, W. Tracking miR-17-5p Levels following Expression of Seven Reported Target mRNAs. *Cancers (Basel)* **14**, (2022).
52. Xiong, B., Nie, Y., Yu, Y., Wang, S. & Zuo, X. Reduced miR-16 levels are associated with VEGF upregulation in high-risk myelodysplastic syndromes. *J Cancer* **12**, 1967 (2021).
53. Tang, X. *et al.* miR-126 Controls the Apoptosis and Proliferation of Immature Porcine Sertoli Cells by Targeting the PIK3R2 Gene through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Animals (Basel)* **11**, (2021).
54. Meng, Y. C. *et al.* miR-122 Exerts Inhibitory Effects on Osteoblast Proliferation/Differentiation in Osteoporosis by Activating the PCP4-Mediated JNK Pathway. *Mol Ther Nucleic Acids* **20**, 345 (2020).

55. Guess, M. G., Barthel, K. K. B., Harrison, B. C. & Leinwand, L. A. miR-30 Family microRNAs Regulate Myogenic Differentiation and Provide Negative Feedback on the microRNA Pathway. *PLoS One* **10**, (2015).
56. He, Z. *et al.* miR-296 inhibits the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer by targeting S100A4. *BMC Cancer* **17**, (2017).
57. Di, Y., Zhang, D., Hu, T. & Li, D. miR-23 regulate the pathogenesis of patients with coronary artery disease. *Int J Clin Exp Med* **8**, 11759 (2015).
58. Jin, H. *et al.* Local Delivery of miR-21 Stabilizes Fibrous Caps in Vulnerable Atherosclerotic Lesions. *Molecular Therapy* **26**, 1040 (2018).

### 2.2.1 Apoptoza.

59. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95–99 (2001).
60. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans* - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10197583/>.
61. Paweletz, N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 72–75 (2001).
62. Fadok, V. A., De Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M. & Bratton, D. L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 1071–1077 (2001).
63. Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M. & Basu, J. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* **280**, 39460–39467 (2005).
64. Ferraro-Peyret, C., Quemeneur, L., Flacher, M., Revillard, J.-P. & Genestier, L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol* **169**, 4805–4810 (2002).
65. Bratton, D. L. *et al.* Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* **272**, 26159–26165 (1997).
66. Kothakota, S. *et al.* Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294–298 (1997).
67. Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 7320–7326 (2001).
68. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1 - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10949025/>.

69. Meyer, N., Kim, S. S. & Penn, L. Z. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* **16**, 275–287 (2006).
70. Oda, E. *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053–1058 (2000).
71. Liu, F. T., Newland, A. C. & Jia, L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 956–962 (2003).
72. Newmeyer, D. D. *et al.* Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ* **7**, 402–407 (2000).
73. Yang, E. *et al.* Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285–291 (1995).
74. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619–628 (1996).
75. Esposti, M. D. The roles of Bid. *Apoptosis* **7**, 433–440 (2002).
76. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491–501 (1998).
77. Schuler, M. & Green, D. R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **29**, 684 (2001).
78. Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647–656 (2002).
79. Enari, M. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43–50 (1998).
80. Susin, S. A. *et al.* Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**, 571–579 (2000).
81. Joza, N. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549–554 (2001).
82. Ekert, P. G. & Vaux, D. L. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* **17**, 626–630 (2005).
83. Schimmer, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* **64**, 7183–7190 (2004).
84. van Loo, G. *et al.* The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* **9**, 20–26 (2002).
85. Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M. & Martin, S. J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* **23**, 2134–2145 (2004).

86. Chinnaiyan, A. M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* **1**, 5–15 (1999).
87. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33–42 (2000).
88. Saelens, X. *et al.* Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**, 2861–2874 (2004).
89. Lieberman, J. & Fan, Z. Nuclear war: The granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* **15**, 553–559 (2003).
90. Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. & Lieberman, J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein set is its inhibitor. *Cell* **112**, 659–672 (2003).
91. Devadas, S. *et al.* Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* **25**, 237–247 (2006).
92. Goping, I. S. *et al.* Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* **18**, 355–365 (2003).
93. Russell, J. H. & Ley, T. J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323–370 (2002).
94. Barry, M. & Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**, 401–409 (2002).
95. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96–99 (1998).
96. Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2**, 735–747 (2002).
97. Brunner, T. *et al.* Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* **15**, 167–176 (2003).
98. Martinvalet, D., Zhu, P. & Lieberman, J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* **22**, 355–370 (2005).
99. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**, 277–288 (2002).
100. Zeiss, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* **40**, 481–495 (2003).
101. Hirsch, T. *et al.* The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* **15**, 1573–1581 (1997).

102. Norbury, C. J. & Hickson, I. D. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 367–401 (2001).
103. Debnath, J., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* **1**, 66–74 (2005).
104. Sperandio, S., De Belle, I. & Bredesen, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14376–14381 (2000).
105. Papucci, L. *et al.* Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on c-myc and bcl-2 expression. *Cell Tissue Res* **316**, 197–209 (2004).
106. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239 (1972).
107. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death - PMC.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/>.
108. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**, 495 (2007).

### 2.2.2 Stan zapalny

109. Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**, 771–776 (2010).
110. Hendrayani, S. F., Al-Harbi, B., Al-Ansari, M. M., Silva, G. & Aboussekhra, A. The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF- $\kappa$ B positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget* **7**, 41974–41985 (2016).
111. Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Drexler, H., Heusch, G. & Schulz, R. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther* **120**, 172–185 (2008).
112. O’Shea, J. J. *et al.* The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* **66**, 311–328 (2015).
113. Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Dérjard, B. & Davis, R. J. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **16**, 1247–1255 (1996).
114. Sabio, G. & Davis, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol* **26**, 237–245 (2014).
115. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279–3290 (2007).



116. Kim, E. K. & Choi, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 396–405 (2010).
117. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153–183 (2001).
118. Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 253–262 (2005).
119. Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* **26**, 203–234 (2012).
120. Kadhim, H. *et al.* Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* **56**, 1278–1284 (2001).
121. Basak, S. *et al.* A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* **128**, 369–381 (2007).
122. Pasparakis, M., Luedde, T. & Schmidt-Supprian, M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* **13**, 861–872 (2006).
123. Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**, 6706–6716 (2006).
124. Moynagh, P. N. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* **118**, 4589–4592 (2005).
125. Girard, S. *et al.* Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatr Neurol* **40**, 168–174 (2009).
126. Henríquez-Olguín, C. *et al.* Altered ROS production, NF- $\kappa$ B activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 1410–1419 (2015).
127. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807–869 (2001).
128. Hendrayani, S. F., Al-Harbi, B., Al-Ansari, M. M., Silva, G. & Aboussekhra, A. The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF- $\kappa$ B positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget* **7**, 41974–41985 (2016).
129. Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 253–262 (2005).
130. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675–680 (2001).
131. Rubartelli, A. & Lotze, M. T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* **28**, 429–436 (2007).

132. Adib-Conquy, M. & Cavaillon, J. M. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett* **581**, 3723–3733 (2007).
133. Czerkies, M., Kwiatkowska, K. & Płytycz, B. Toll-like receptors and their contribution to innate immunity: Focus on TLR4 activation by lipopolysaccharide. *Adv Cell Biol* **4**, 1–23 (2014).
134. Takeda, K. & Yamamoto, M. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract* **2010**, (2010).
135. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197–216 (2002).
136. Ozinsky, A. *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766–13771 (2000).
137. Seong, S. Y. & Matzinger, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **4**, 469–478 (2004).
138. Gudkov, A. V. & Komarova, E. A. p53 and the Carcinogenicity of Chronic Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, (2016).
139. Brusselle, G. & Bracke, K. Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc* **11 Suppl 5**, S322–S328 (2014).
140. Libby, P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* **65**, (2007).
141. Lawrence, T. The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, (2009).
142. Jabbour, H. N., Sales, K. J., Catalano, R. D. & Norman, J. E. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction* **138**, 903–919 (2009).
143. Chertov, O., Yang, D., Zack Howard, O. M. & Oppenheim, J. J. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev* **177**, 68–78 (2000).
144. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
145. Zhou, Y., Hong, Y. & Huang, H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Kidney Blood Press Res* **41**, 901–910 (2016).
146. Nathan, C. & Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).
147. Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S. & Girardin, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clin Exp Immunol* **147**, 227 (2007).

148. Takeda, K. & Yamamoto, M. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract* (2010) doi:10.1155/2010/240365.
149. Gudkov, A. V. & Komarova, E. A. p53 and the carcinogenicity of chronic inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, (2016).
150. Chen, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204 (2018).
151. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, (2009).
152. What is an inflammation? - InformedHealth.org - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279298/>.

### 2.2.3 Proliferacja komórek

153. Oshima, J. & Campisi, J. SYMPOSIUM: MAMMARY CELL PROLIFERATION AND MORPHOGENESIS Fundamentals of Cell Proliferation: Control of the Cell Cycle. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78458-0.

### 2.2.4 Stres oksydacyjny

154. Sadeg, N., Huy, C. P., Martin, C., Warnet, J. M. & Claude, J. R. Effect of cyclosporin a and its metabolites and analogs on lipid peroxidation in rabbit renal microsomes. *Drug Chem Toxicol* **16**, 165–174 (1993).
155. Walston, J. *et al.* Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. *Am J Epidemiol* **163**, 18–26 (2006).
156. Hoshino, Y. & Mishima, M. Redox-based therapeutics for lung diseases. *Antioxid Redox Signal* **10**, 701–704 (2008).
157. Guo, R. F. & Ward, P. A. Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid Redox Signal* **9**, 1991–2002 (2007).
158. Pizzino, G. *et al.* Oxidative stress and DNA repair and detoxification gene expression in adolescents exposed to heavy metals living in the Milazzo-Valle del Mela area (Sicily, Italy). *Redox Biol* **2**, 686–693 (2014).
159. Ceriello, A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, (2008).
160. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K. & Loridas, S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health* **10**, 3886–3907 (2013).

161. Yasui, M. *et al.* Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair (Amst)* **15**, 11–20 (2014).
162. Nishida, N. *et al.* Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. *Digestive Diseases* **31**, 459–466 (2013).
163. Hansen, J. M., Go, Y. M. & Jones, D. P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 215–234 (2006).
164. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1–40 (2006).
165. Sato, H. *et al.* Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. *Neuroscience* **248**, 345–358 (2013).
166. Harwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **35**, 1147–1150 (2007).
167. Wu, J. Q., Kosten, T. R. & Zhang, X. Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **46**, 200–206 (2013).
168. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47–95 (2002).
169. Genestra, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* **19**, 1807–1819 (2007).
170. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**, 315–424 (2007).
171. Glasauer, A. & Chandel, N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* **92**, 90–101 (2014).
172. Al-Gubory, K. H., Garrel, C., Faure, P. & Sugino, N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reprod Biomed Online* **25**, 551–560 (2012).
173. Willcox, J. K., Ash, S. L. & Catignani, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44**, 275–295 (2004).
174. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**, 44–84 (2007).
175. Kumar, S. & Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal* **2013**, (2013).
176. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1830**, 3217–3266 (2013).

177. Rajendran, P. *et al.* Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta* **436**, 332–347 (2014).
178. Taniyama, Y. & Griendling, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension* **42**, 1075–1081 (2003).
179. Navarro-Yepes, J. *et al.* Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacol Ther* **142**, 206–230 (2014).
180. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, (2017).

#### **2.2.4.1. Rola wybranych enzymów i substancji o charakterze ochronnym przed stresem oksydacyjnym**

181. Couto, N., Wood, J. & Barber, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radic Biol Med* **95**, 27–42 (2016).
182. Townsend, D. M. & Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**, 7369–7375 (2003).
183. Thao, N. T. M. *et al.* Antioxidant Nanozymes: Mechanisms, Activity Manipulation, and Applications. *Micromachines* **2023**, Vol. 14, Page 1017 **14**, 1017 (2023).
184. Younus, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)* **12**, 88 (2018).

#### **2.3 Układ krwionośny**

185. Von Ardenne, M. MESSUNGEN DES ARTERIELLEN O<sub>2</sub>-PARTIALDRUCKES OHNE UND MIT O<sub>2</sub>-INHALATION NACH LUNGENSCHADIGUNG DURCH RAUCH. *Z Erkr Atmungsorgane* **159**, 166–182 (1982).
186. Regulation of Tissue Oxygenation - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21634070/>.
187. Granger, H. J., Goodman, A. H. & Cook, B. H. Metabolic models of microcirculatory regulation. *Fed Proc* **34**, 2025–2030 (1975).
188. Granger, H. J. & Nyhof, R. A. Dynamics of intestinal oxygenation: Interactions between oxygen supply and uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **6**, (1982).

189. Jürgens, K. D. & Gros, G. Phylogenese der gasaustauschsysteme. *Anesthesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie* **37**, 185–198 (2002).
190. Pittman, R. N. Oxygen supply to contracting skeletal muscle at the microcirculatory level: Diffusion vs. convection. *Acta Physiol Scand* **168**, 593–602 (2000).
191. Pittman, R. N. Regulation of Tissue Oxygenation. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* **3**, 1–100 (2011).

### 2.3.1 Tętnice.

192. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233 (2000).
193. Wentzel, A., Malan, L., von Känel, R., Smith, W. & Malan, N. T. Heart rate variability, the dynamic nature of the retinal microvasculature and cardiac stress: providing insight into the brain-retina-heart link: the SABPA study. *Eye (Lond)* **34**, 835–846 (2020).
194. Sjöberg, R. L. *et al.* Role of monoamine-oxidase-A-gene variation in the development of glioblastoma in males: a case control study. *J Neurooncol* **145**, 287–294 (2019).
195. El Shahawy, M. S., Shady, Z. M. & Gaafar, A. The Efficacy of Argon Plasma Coagulation versus Carvedilol for Treatment of Portal Hypertensive Gastropathy. *Digestion* **101**, 651–658 (2020).
196. Lu, Q. *et al.* PKC $\delta$  Mediates Mineralocorticoid Receptor Activation by Angiotensin II to Modulate Smooth Muscle Cell Function. *Endocrinology* **160**, 2101–2114 (2019).
197. Stannov, S. U., Brasen, J. C., Salomonsson, M., Holstein-Rathlou, N. H. & Sorensen, C. M. Interactions between renal vascular resistance and endothelium-derived hyperpolarization in hypertensive rats in vivo. *Physiol Rep* **7**, (2019).
198. Peter, I., Oladele, D., Kefas, G., Kayode, O. & Iseko, I. Challenges with Managing Delayed Presentation of Persistent Truncus Arteriosus with Torrential Pulmonary Blood Flow in a Resource-Limited Setting. *J Cardiovasc Echogr* **29**, 75–77 (2019).
199. Yan, G. W. *et al.* Iatrogenic arteriovenous fistula of the iliac artery after lumbar discectomy surgery: a systematic review of the last 18 years. *Quant Imaging Med Surg* **9**, 1163–1175 (2019).
200. Furuta, A., Morimoto, H., Mukai, S., Futagami, D. & Okubo, S. Valve-sparing partial root repair for aortic dissection limited to the right coronary sinus of Valsalva. *J Card Surg* **34**, 1133–1136 (2019).

201. Valbusa, F. *et al.* Increased aortic stiffness in adults with chronic indeterminate Chagas disease. *PLoS One* **14**, (2019).
202. Yeh, H. C. *et al.* Variability of red blood cell size predicts all-cause mortality, but not progression to dialysis, in patients with chronic kidney disease: A 13-year pre-ESRD registry-based cohort. *Clin Chim Acta* **497**, 163–171 (2019).
203. The physiology of mucus and sputum production in the respiratory system - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12838653/>.
204. Mercadante, A. A. & Raja, A. Anatomy, Arteries. *StatPearls* (2023).

### **2.3.3. Funkcje wybranych czynników na układ krwionośny i śródbłonek naczyniowy**

205. Birkedal-Hansen, H. *et al.* Matrix Metalloproteinases: A Review. <http://dx.doi.org/10.1177/10454411930040020401> **4**, 197–250 (1993).
206. Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev* **25**, 581–611 (2004).
207. Zitka, O. *et al.* Matrix Metalloproteinases. *Curr Med Chem* **17**, 3751–3768 (2010).
208. Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. R. Bone Morphogenetic Proteins. <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890> **22**, 233–241 (2009).
209. Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. Interleukin-6 in Biology and Medicine. *Adv Immunol* **54**, 1–78 (1993).
210. Ornitz, D. M. & Itoh, N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* **2001 2:3 2**, 1–12 (2001).
211. Pache, J. C. EPIDERMAL GROWTH FACTORS. *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set* 129–133 (2006) doi:10.1016/B0-12-370879-6/00138-1.
212. Boonstra, J. *et al.* The epidermal growth factor. *Cell Biol Int* **19**, 413–430 (1995).
213. Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 789–791 (2009).
214. Akwii, R. G., Sajib, S., Zahra, F. T. & Mikelis, C. M. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* **8**, (2019).

## 2.4 Miażdżycyca

215. Shafi, S., Ansari, H. R., Bahitham, W. & Aouabdi, S. The Impact of Natural Antioxidants on the Regenerative Potential of Vascular Cells. *Front Cardiovasc Med* **6**, (2019).
216. Reiss, A. B. *et al.* Adenosine and the Cardiovascular System. *Am J Cardiovasc Drugs* **19**, 449–464 (2019).
217. Paul, S., Lancaster, G. I. & Meikle, P. J. Plasmalogens: A potential therapeutic target for neurodegenerative and cardiometabolic disease. *Prog Lipid Res* **74**, 186–195 (2019).
218. Mohd Nor, N. S., Al-Khateeb, A. M., Chua, Y. A., Mohd Kasim, N. A. & Mohd Nawawi, H. Heterozygous familial hypercholesterolaemia in a pair of identical twins: a case report and updated review. *BMC Pediatr* **19**, (2019).
219. Lee, Y. Y. & Rhee, M. H. Atherosclerosis. *Recent Advancements in Microbial Diversity: Macrophages and their Role in Inflammation* 265–275 (2022) doi:10.1016/B978-0-12-822368-0.00012-8.
220. Dichgans, M., Pulit, S. L. & Rosand, J. Stroke genetics: discovery, biology, and clinical applications. *Lancet Neurol* **18**, 587–599 (2019).
221. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233 (2000).
222. Doodnauth, S. A., Grinstein, S. & Maxson, M. E. Constitutive and stimulated macropinocytosis in macrophages: roles in immunity and in the pathogenesis of atherosclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **374**, (2019).
223. Ala-Korpela, M. The culprit is the carrier, not the loads: cholesterol, triglycerides and apolipoprotein B in atherosclerosis and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* **48**, 1389–1392 (2019).
224. Watson, M. *et al.* Relation Between Cigarette Smoking and Heart Failure (from the Multiethnic Study of Atherosclerosis). *Am J Cardiol* **123**, 1972–1977 (2019).
225. Whelton, S. P. *et al.* Associations between lipids and subclinical coronary atherosclerosis. *AIDS* **33**, 1053–1061 (2019).
226. Carmona, F. D., López-Mejías, R., Márquez, A., Martín, J. & González-Gay, M. A. Genetic Basis of Vasculitides with Neurologic Involvement. *Neurol Clin* **37**, 219–234 (2019).
227. Yu, F. *et al.* Decreased miR-150 in obesity-associated type 2 diabetic mice increases intraocular inflammation and exacerbates retinal dysfunction. *BMJ Open Diabetes Res Care* **8**, 1446 (2020).



## **2.5 Rozpoznawanie i klasyfikacja zwężeń tętnicy szyjnej**

228. Liapis, C. D. *et al.* Wytyczne Europejskiego Towarzystwa Chirurgii Naczyniowej (ESVS). Leczenie inwazyjne zwężenia tętnicy szyjnej: wskazania, metody postępowania. *Acta Angiol.* **16**, 190–215 (2010).

229. Kozera G. *et al.* Zastosowanie badań ultrasonograficznych w profilaktyce udaru mózgu. *Forum Medycyny Rodzinnej*; **2**, 267-276 (2008).

230. Migdalski A., Jawień A.: Ograniczenia badania ultrasonograficznego z przepływem kodowanym kolorem (duplex scan) w wysokim obustronnym zwężeniu tętnic szyjnych wewnętrznych. *Acta Angiol.* **14**, 66-71 (2008).

231. Wardlaw J.M. *et al.* Accurate, practical and cost-effective assessment of carotid stenosis in the UK. *Health Technol. Assess.* **10**, 1–182 (2006).

232. Saba L. *et al.* A comparison between NASCET and ECST methods in the study of carotids: evaluation using Multi-Detector-Row CT angiography. *Eur J Radiol.* **76**, 42-7 (2010).

## **2.6 Metody leczenia operacyjnego zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej**

233. Mozaffarian D. & AHASCaSS Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **131**, e29-322 (2015).

234. Nowacki P. *et al.* Profilaktyka wtórna niedokrwienego udaru mózgu w świetle medycyny opartej na dowodach. *Pol. Prz. Neurol.* **4**, 147-152 (2008).

235. Lunn S. *et al.* Impact of carotid endarterectomy upon cognitive functioning. A systematic review of the literature. *Cerebrovasc Dis.* **9**, 74-81 (1999).

236. Barnett H.J. & NASCETN collaborators. The appropriate use of carotid endarterectomy. *CMAJ* **166**, 1169-1179 (2002).

237. Toutounch S. *et al.* Endartrektomia szyjna u chorych z niedrożnością przeciwstronnej tętnicy szyjnej wewnętrznej, *Blok Operacyjny.* **2**, 73-76 (1999).

238. Wiszniewska M. *et al.* Postępowanie w udarze mózgu. *Pol. Prz. Neurol.* **8**, 161-175 (2012).

239. Naylor R. *et al.* European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2023 Clinical Practice Guidelines on the Management of Atherosclerotic Carotid and Vertebral Artery Disease *Eur J Vasc Endovasc Surg* **65**, 7e111 (2023).
240. Kolkert J.L. *et al.* Endarterectomy or carotid artery stenting: the quest continues part two. *Am J Surg*. **209**, 403-12 (2015).
241. Yadav J.S. *et al.* Stenting and Angioplasty with Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy Investigators.: Protected carotid-artery stenting versus endarterectomy in high-risk patients. *N Engl J Med*. **351**, 1493-1501 (2004)
242. Eckstein H.H. *et al.* Results of the Stent-Protected Angioplasty versus Carotid Endarterectomy (SPACE) study to treat symptomatic stenoses at 2 years: a multinational, prospective, randomised trial. *Lancet Neurol*. **7**, 893-902 (2008).
243. Błażejewska-Hyżorek B. *et al.* Postępowanie w udarze mózgu. Wytyczne Grupy Ekspertów Sekcji Chorób Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Neurologicznego *Neurol Neurochir Pol*. **46** (suppl. 1) (2012).
244. Lewszuk A. *et al.* Ocena aktywności płytek krwi i częstości występowania oporności na przeciwplatekowe działanie kwasu ASA w prewencji zakrzepowej chorych po endarterektomii tętnic szyjnych. *Acta Angiol*. **18**, 68-78 (2012).
245. Halliday A. *et al.* Second asymptomatic carotid surgery trial (ACST-2): a randomised comparison of carotid artery stenting versus carotid endarterectomy. *Lancet*; **398**, 1065–73 (2021).
246. Paraskevas K. *et al.* How to identify which patients with asymptomatic carotid stenosis could benefit from endarterectomy or stenting. *Stroke and Vascular Neurology* **3**, e000129 (2018).
247. Kim H.W. *et al.* Asymptomatic carotid artery stenosis: a summary of current state of evidence for revascularization and emerging high-risk features *J NeuroIntervent Surg*. **15**, 717–722 (2023).
248. Tulamo R. *et al.* Intervention for asymptomatic carotid artery stenosis. *Lancet* **398**, 1025-1027 (2021)

## **6. Dyskusja**

249. Iskra T. Unaczynienie mózgowia. W: Szczudlik A., Członkowska A., Kwieciński H., Słowik A. (red). Udar mózgu. WUJ, Kraków; 3–25 (2007).
250. Rothwell P.M. *et al.* Carotid Endarterectomy Trialists' Collaboration. Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet*. **361**, 107–116 (2003).
251. Halliday A. *et al.* MRC Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet*, **363**: 1491–1502 (2004).
252. The European Carotid Surgery Trialists Collaborative Group: Risk of stroke in the distribution of an asymptomatic carotid artery. *Lancet*. **345**, 209–212 (1995).
253. Barnett H.J. *et al.* Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. *N Engl J Med*. **339**, 1415–1425 (1998).
254. Kawa M.P. *et al.* Expression of selected angiogenesis-related small microRNAs in patients with abnormally increased secretion of glucocorticoids *Endokrynol Pol*. **70**, 489-495 (2019).
255. Gródecka-Szwajkiewicz D. *et al.* Differential Secretion of Angiopoietic Factors and Expression of MicroRNA in Umbilical Cord Blood from Healthy Appropriate-For-Gestational-Age Preterm and Term Newborns - in Search of Biomarkers of Angiogenesis-Related Processes in Preterm Birth. *Int. J. Mol. Sci*. **21**, 1305 (2020).
256. Litwińska Z. *et al.* The Interplay Between Systemic Inflammatory Factors and MicroRNAs in Age-Related Macular Degeneration. *Front Aging Neurosci*. **11**, 286 (2019).
257. Sobuś A. *et al.* Safety and Feasibility of Lin- Cells Administration to ALS Patients: A Novel View on Humoral Factors and miRNA Profiles. *Int. J. Mol. Sci*. **19**, 1312 (2018).
258. Cecerska-Heryć E. *et al.* Activity of erythrocyte antioxidant enzymes in healthy women depends on age, BMI, physical activity, and diet. *J Health Popul Nutr*. **41**, 35 (2022).

259. Budkowska M. *et al.* The Influence of Circadian Rhythm on the Activity of Oxidative Stress Enzymes. *Int J Mol Sci.* **23**, 14275 (2022).
260. Stępniewska J. *et al.* The activity of antioxidant enzymes in blood platelets in different types of renal replacement therapy: a cross-sectional study. *Int Urol Nephrol.* **48**, 593–599 (2016).
261. Augustyniak A. *et al.* Antioxidant abilities in an aging body. *Postepy Hig Med Dosw.* **58**, 194–201 (2004).
262. Mehterov N. *et al.* Salivary miR-30c-5p as Potential Biomarker for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicines.* **9**, 1079 (2021).
263. Wróblewska J.P. *et al.* MiRNAs from serum-derived extracellular vesicles as biomarkers for uveal melanoma progression. *Front Cell Dev Biol.* **10**, 1008901 (2022).
264. Dolz S. *et al.* Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers of Stenosis Progression in Asymptomatic Carotid Stenosis. *Stroke.* **48**, 10-16 (2017).
265. Zhang T. *et al.* Circulating miR-106b-5p serves as a diagnostic biomarker for asymptomatic carotid artery stenosis and predicts the occurrence of cerebral ischemic events. *Vasc Med.* **25**, 436-442 (2020).
266. Lv W. *et al.* Diagnostic value of miR-186-5p for carotid artery stenosis and its predictive significance for future cerebral ischemic event. *Diagn Pathol.* **15**, 101 (2020).
267. Li R. *et al.* Aberrant expression of miR-483-5p in patients with asymptomatic carotid artery stenosis and its predictive value for cerebrovascular event occurrence. *Exp Ther Med.* **22**, 1101 (2021).
268. Li D. *et al.* Diagnostic and Prognostic Value Analysis of miR-206 in Asymptomatic Carotid Artery Stenosis. *Br J Biomed Sci.* **79**, 10592 (2022).

## **10. Spis tabel**

**Tabela 1.** Ocena parametrów klinicznych u pacjentów w badanej kohorcie.....58

**Tabela 2:** Sekwencje starterów forward użytych do przeprowadzenia reakcji PCR...63

## 11. Spis rycin

- Rycina 1.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-9-5p, miR-21-3p, miR-23a-3p, miR-126-3p, miR-134-5p i miR-296-5p) związanych z regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłonna oraz stanem niedokrwienia tkankowego, analizowane w komórkach krwi jednojądrzastych obwodowej.....72
- Rycina 2.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-30b, miR-122-5p, miR-133b, miR-146a, miR-150-5p i miR-155-5p) związanych z regulacją stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz uogólnionego procesu miażdżycowego, analizowane w komórkach krwi jednojądrzastych obwodowej.....75
- Rycina 3.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-16-5p, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-200c-5p i miR-223-3p) związanych z wewnątrzkomórkową regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek, analizowane w komórkach krwi jednojądrzastych obwodowej .....78
- Rycina 4.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-9-5p, miR-21-3p, miR-23a-3p, miR-126-3p, miR-134-5p i miR-296-5p) związanych z wewnątrzkomórkową regulacją angiogenezy i metabolizmu komórek śródbłonna oraz stanem niedokrwienia tkankowego analizowany w blaszkach miażdżycowych.....80
- Rycina 5.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-30b, miR-122-5p, miR-133b, miR-146a, miR-150-5p i miR-155-5p) związanych z wewnątrzkomórkową regulacją stanu zapalnego, apoptozy i stresu oksydacyjnego oraz procesu miażdżycowego, analizowany w blaszkach miażdżycowych.....83
- Rycina 6.** Względny poziom ekspresji wybranych mikroRNA (miR-16-5p, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-27a-5p, miR-34-5p, miR-200c-5p i miR-223-3p) związanych z wewnątrzkomórkową regulacją cyklu komórkowego i proliferacji komórek, analizowany w blaszkach miażdżycowych.....86
- Rycina 7.** Detekcja i ocena stężenia wybranych czynników wzrostu (angiopoetyna-1, EGF, FGFa, FGFb, VEGF) oraz cytokin (IL-6) w osoczu krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz w osoczu krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną.....89

<b>Rycina 8.</b> Detekcja i ocena stężenia wybranych czynników białkowych (BMP-2, BMP-4, MMP-1, MMP-3, TIMP-1 oraz Kolagen-1-alfa), w tym enzymów, które zapewniają integralność naczyń krwionośnych w osoczu krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz w osoczu krwi obwodowej pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną.....	91
<b>Rycina 9.</b> Ocena aktywności wybranych enzymów wewnątrzkomórkowych (CAT, SOD, GST, GPx, GR) oraz stężenia glutationu o właściwościach endogennych antyoksydantów w erytrocytach krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną (grupa „post-CEA”) .....	94
<b>Rycina 10.</b> Ocena aktywności wybranych enzymów wewnątrzkomórkowych (CAT, SOD, GST, GPx, GR) oraz stężenia glutationu o właściwościach endogennych antyoksydantów w płytkach krwi obwodowej pozyskanej od pacjentów przed zabiegiem endarterektomii (grupa „przed-CEA”) oraz pobranej po 3 miesiącach od usunięcia blaszki miażdżycowej istotnie zwężającej tętnicę szyjną (grupa „post-CEA”) .....	97