



ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE



INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ  
„NICOLAE SIMIONESCU” AL ACADEMIEI ROMÂNE

## TEZĂ DE DOCTORAT

**Identificarea și analiza microARN asociați lipoproteinelor  
serice; corelații cu parametrii clinici și biochimici ai  
pacienților cu boli cardiovasculare**

### REZUMAT

**Conducător științific:**

**Acad. ANCA V. SIMA**

**Doctorand:**

**NATALIA SIMIONESCU**

**BUCUREȘTI**

**2017**

## CUPRINS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CUVÂNT ÎNAINTE</b>   | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCERE ȘI OBIECTIVE</b>   | <b>3</b>  |
| <b>LISTĂ ABREVIERI</b>  | <b>6</b>  |
| <br>  |           |
| <b>PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR</b>   |           |
| <b>I.1. ATEROSCLEROZA ARTERELOR CORONARE</b>  | <b>8</b>  |
| Structura inimii  | 8         |
| Fiziologia inimii   | 10        |
| Circulația coronariană  | 11        |
| Formarea plăcii aterosclerotice   | 12        |
| Ateroscleroza arterelor coronare  | 15        |
| Boala coronariană stabilă   | 17        |
| Sindromul coronarian acut   | 18        |
| <br>  |           |
| <b>I.2. LIPOPROTEINE SERICE</b>   | <b>19</b> |
| Proprietățile și compoziția principalelor lipoproteine serice umane                         | 19        |
| Metabolismul lipoproteinelor serice   | 23        |
| Lipoproteine pro-aterogene  | 28        |
| Lipoproteine anti-aterogene – HDL   | 29        |
| <br>  |           |
| <b>I.3. MICRO-ARN PREZENȚI ÎN CIRCULAȚIA SANGVINĂ</b>                                       | <b>32</b> |
| Nomenclatura miRNA  | 33        |
| Organizarea genomică a microARN   | 34        |
| Biosinteza microARN   | 34        |
| MicroARN implicați în metabolismul LDL  | 38        |
| MicroARN implicați în metabolismul HDL  | 39        |
| MicroARN ce influențează evoluția plăcii aterosclerotice                                    | 40        |
| MicroARN circulanți   | 42        |
| MicroARN în circulația sangvină a pacienților cu boli cardiovasculare și patologii asociate | 44        |
| Problematica investigării miRNA prezenți în circulația sangvină                             | 46        |

## PARTEA II – CONTRIBUȚII ORIGINALE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>OBIECTIVELE GENERALE ALE PROIECTULUI</b>   | <b>48</b> |
| <b>II.1. IDENTIFICAREA ȘI ANALIZA MICRO-ARN ÎN SERURI ȘI LIPOPROTEINE IZOLATE DE LA PACIENȚI HIPERLIPIDEMICI ȘI/SAU HIPERGLICEMICI</b>        | <b>49</b> |
| <b>Introducere și obiective</b>   | <b>49</b> |
| <b>Protocoale experimentale și metode de analiză</b>  | <b>50</b> |
| Selecția pacienților și încadrarea în grupe   | 50        |
| Metode de analiză a parametrilor lipidici și inflamatori în serul pacienților   | 51        |
| Izolarea lipoproteinelor prin ultracentrifugare în gradient de densitate  | 54        |
| Izolarea microARN din ser și lipoproteine   | 55        |
| Realizarea profilului microARN serici (screening)   | 56        |
| Revers-transcrierea microARN și real time-PCR cantitativ  | 57        |
| Analiza statistică a datelor  | 58        |
| <b>Rezultate</b>  | <b>59</b> |
| Parametrii serici lipidici și inflamatori   | 59        |
| Profilul microARN în seruri hiperlipidemice și/sau hiperglicemice   | 59        |
| Analiza microARN selectați în serurile individuale  | 67        |
| Corelarea nivelurilor de microARN serici cu parametrii lipidici și inflamatori  | 70        |
| Asocierea microARN cu lipoproteinele serice   | 73        |
| <b>Discuții și concluzii</b>  | <b>74</b> |
| <b>II.2. IDENTIFICAREA ȘI ANALIZA MOLECULELOR DE MICRO-ARN SERICE SAU ASOCIATE CU LIPOPROTEINE IZOLATE DE LA PACIENȚI CU BOLI CORONARIENE</b> | <b>78</b> |
| <b>Introducere și obiective</b>   | <b>78</b> |
| <b>Protocoale experimentale și metode de analiză</b>  | <b>79</b> |
| Selecția pacienților cu boală coronariană (CAD); criteriile clinice   | 79        |
| Metode de analiză a parametrilor serici lipidici și inflamatori   | 82        |
| Protocoale de izolare și caracterizare a lipoproteinelor serice   | 83        |
| Izolarea microARN din seruri și lipoproteine  | 84        |
| Analiza profilului seric al unor microARN asociați cu CAD   | 84        |

|   |            |
|---|------------|
| Revers-transcrierea microARN și real time-PCR cantitativ  | 85         |
| Analiza statistică a datelor  | 86         |
| <b>Rezultate</b>  | <b>87</b>  |
| Parametrii serici și caracteristicile clinice ale pacienților   | 87         |
| Profilul microARN în serurile pacienților CAD   | 90         |
| Analiza microARN selectați în serurile pacienților CAD  | 95         |
| Distribuția microARN în lipoproteine de la pacienți CAD   | 97         |
| Distribuția microARN în lipoproteine izolate de la pacienți CAD după 12 luni de la includerea în studiu | 100        |
| <b>Discuții și concluzii</b>  | <b>102</b> |

### **II.3. EFECTUL HIPERGLICEMIEI ASUPRA MICRO-ARN CIRCULANȚI ȘI STIMULAREA PRODUCȚIEI DE MICRO-ARN ÎN MACROFAGE UMANE ÎN CULTURĂ DE CĂTRE SERURILE HIPERGLICEMICE DE LA PACIENȚI CU BOLI CORONARIENE**

|  |            |
|--|------------|
| <b>Introducere și obiective</b>  | <b>105</b> |
| <b>Protocoale experimentale și metode de analiză</b>   | <b>106</b> |
| Selectia pacienților; criterii clinice   | 106        |
| Metode de analiză a parametrilor serici  | 107        |
| Izolarea și caracterizarea lipoproteinelor serice  | 108        |
| Analiza miRNA în seruri și lipoproteine  | 108        |
| Culturi celulare și model experimental   | 108        |
| Analiza miRNA și a expresiei genice în macrofagele THP-1   | 109        |
| Analiza statistică   | 111        |
| <b>Rezultate</b>   | <b>111</b> |
| Caracteristicile clinice și parametrii serici ale pacienților  | 111        |
| Analiza microARN în serurile pacienților CAD normoglicemici și hiperglicemici  | 113        |
| Analiza microARN în HDL izolate din serurile pacienților CAD normoglicemici și hiperglicemici                              | 117        |
| Serurile ACS induc creșterea expresiei genice a proteinelor mașinării de procesare și producția miRNA în macrofagele umane | 120        |
| Concentrațiile crescute de glucoză cresc producția miRNA în macrofage umane expuse la serurile pacienților CAD             | 122        |
| <b>Discuții și concluzii</b>   | <b>124</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>III. CONCLUZII GENERALE</b>   | <b>127</b> |
| <b>PERSPECTIVE</b>   | <b>127</b> |
| <b>IV. BIBLIOGRAFIE</b>  | <b>128</b> |
| <b>Lucrări publicate în cadrul tezei de doctorat</b>   | <b>154</b> |
| <b>Rezumate ale lucrărilor prezentate la manifestări științifice</b>                                 | <b>155</b> |
| <b>Specializări și cursuri efectuate</b>   | <b>158</b> |
| <b>Premii naționale obținute</b>   | <b>159</b> |
| <b>Burse câștigate prin competiție pentru participarea la manifestări științifice internaționale</b> | <b>159</b> |
| <b>Finanțarea cercetărilor</b>   | <b>160</b> |

**Cuvinte cheie:** ateroscleroză, microARN, hiperlipidemie, hiperglicemie, boală coronariană, angină stabilă, sindrom coronarian acut, lipoproteine, model regresie logistică, biostatistică, monocite/macrofage.

Număr total pagini – 160

Număr de figuri în partea I - 15

Număr de tabele în partea I - 2

Număr de figuri în partea II - 16

Număr de tabele în partea II - 17

Indicații bibliografice - 335

Lucrări publicate în reviste internaționale cotate ISI – 3 (3 autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 5 (1 autor principal)

Lucrări publicate în reviste BDI – 1 (autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate BDI – 1

Lucrări în pregătire – 2

Comunicări orale la manifestări științifice internaționale – 4

Postere la manifestări științifice internaționale – 10

Postere la manifestări științifice naționale – 2

Specializări și cursuri efectuate – 11

Premii naționale – 4

Burse câștigate prin competiție pentru participarea la manifestări științifice internaționale – 2 (FEBS, EAS)

Participarea la proiecte de cercetare naționale – 4

Bolile cardiovasculare (CVD) sunt cauza principală de morbiditate și mortalitate în lume, în ciuda cercetărilor ample și a terapiilor aflate în continuă îmbunătățire. Ateroscleroza și complicațiile sale sunt responsabile de inițierea și evoluția a mare parte din bolile cardiovasculare. Ateroscleroza este o boală cronică inflamatorie, generată sau agravată de dereglări ale metabolismului lipidelor și al glucozei [1-3].

Boala arterelor coronare (*coronary artery disease*, CAD) este rezultatul dezvoltării plăcilor aterosclerotice în peretele arterelor coronare. În primele stadii de formare a plăcii, celulele endoteliale se activează și virează către un fenotip secretor, ducând la dezvoltarea unei lamine bazale hiperplazice și la expresia de molecule chemoattractante ce duc la recrutarea celulelor inflamatoare din sânge [4]. Monocitele circulante aderă la endoteliu, pătrund în subendoteliu și se diferențiază în macrofage, devenind actorii principali în evoluția plăcii aterosclerotice [5]. Proteinele serice, lipoproteinele aterogene (LDL) și lipoproteinele anti-aterogene (HDL) ajung în subendoteliu prin transcitoză *via* celulele endoteliale [6]. Lipoproteinele se acumulează în lamina bazală hiperplazică și în matricea extracelulară, suferă modificări și interacționează cu macrofagele, ducând la încărcarea acestora cu lipide și formarea celulelor spumoase [4].

Progresul și stabilitatea plăcii aterosclerotice sunt dificil de evaluat și de aceea este importantă găsirea unor metode neinvazive pentru a urmări evoluția CAD și, în special, a sindromului coronarian acut (ACS). De asemenea, un aspect important este diagnosticul timpuriu și identificarea unor noi ținte moleculare ce pot ajuta la o intervenție terapeutică rapidă, care poate îmbunătăți prognosticul.

Din întregul genom, secvențele care codează sinteza proteinelor reprezintă mai puțin de 3%, în timp ce restul genomului este alcătuit din secvențe necodante, care produc molecule de ARN active funcțional, cu roluri importante în reglarea homeostaziei tisulare și a condițiilor patofiziologice.

MicroARN (miRNA) sunt molecule de ARN mici (18-25 nucleotide), monocatenare, necodante, ce reglează post-transcripțional expresia genică prin inhibiția translației și/sau promovarea degradării ARN mesager (ARNm), datorate împerecherii parțiale sau complete cu regiunile 3'-UTR ale ARNm [7, 8]. Împreună cu alte mecanisme moleculare, miRNA sunt reglatori genici post-transcripționali puternici [9].

În nucleu, miRNA sunt transcriși de către ARN polimeraza II ca pri-miRNA [10] și procesați mai departe în pre-miRNA de către complexul microprocesor alcătuit din RNaza III Drosha împreună cu subunitatea sa reglatoare DGCR8 [11, 12]. Pre-miRNA sunt apoi transportați activ în citoplasmă de către Exportina-5 [13], unde sunt clivați în intermediari miRNA de tip duplex de către RNaza III Dicer [14]. Apoi,

catena miRNA conducătoare este selectată și încărcată în complexul de silențiere indus de miRNA (miRISC) ce reglează expresia genelor țintă [14].

MiRNA pot fi exportați în spațiul extracelular și pot circula în fluxul sangvin asociați cu microparticule, exozomi, lipoproteine sau complexe proteice, putând acționa ca mesageri extracelulari la distanță mare [15-18].

MicroARN au roluri importante în patologie, fiind molecule de răspuns la stres și având expresii modificate în cursul evoluției bolilor [19, 20]. Expresia celulară modificată a miRNA și profilul alterat al miRNA circulanți au fost asociate cu diferite tulburări, incluzând diferite tipuri de cancer, bolile neuro-degenerative, ateroscleroza, obezitatea, diabetul sau boala coronariană [21-25]. Profilul miRNA circulanți poate reflecta modificarea expresiei tisulare sau a comunicării intercelulare, sugerând posibila utilizare a lor ca biomarkeri [26].

Evoluția bolii aterosclerotice este influențată de prezența factorilor de risc cum ar fi dislipidemia (în special hipercolesterolemia), hipertensiunea și diabetul [27]. Studiile realizate până la ora actuală arată rolul major al microARN în modularea căilor metabolice implicate în aceste afecțiuni.

**Prima parte** a tezei de doctorat reprezintă **stadiul actual al cunoștințelor** și este structurată în 3 capitole ce abordează noțiuni teoretice despre ateroscleroza arterelor coronare, lipoproteinele serice și biologia microARN.

**Partea a doua** a tezei prezintă **rezultatele originale obținute în cadrul studiilor doctorale** și este structurată pe 3 capitole, primele 2 reprezentând studii *in vivo* pe grupuri de pacienți cu hiperlipidemie/hiperglicemie sau boli coronariene, iar al 3-lea capitol abordând în plus și experimente *in vitro* pe modele de culturi celulare.

Astfel, lucrarea de față a avut 3 **obiective specifice**:

**Obiectiv 1.** Identificarea și analiza microARN în seruri și lipoproteine izolate de la pacienți hiperlipidemici și/sau hiperglicemici.

**Obiectiv 2.** Identificarea și analiza microARN serici și a celor asociați cu lipoproteine izolate de la pacienți cu boală coronariană.

**Obiectiv 3.** Evaluarea modulării producției de microARN în macrofage umane în cultură de către serurile de la pacienți cu boli coronariene.

Pentru atingerea acestor obiective am utilizat tehnici de biochimie, biologie moleculară și biologie celulară, dintre care am adaptat **unele metode noi** în laborator. Astfel, am adaptat **metoda ELISA** pentru cuantificarea apolipoproteinelor A-I, B100 și E și a interleukinei 1 $\beta$  în serul pacienților investigați, pornind de la un kit ELISA de dezvoltare de metodă. Astfel, am redus consumul de reactivi și de probă utilizați pentru măsurătoare.

Pentru **izolarea miRNA din lipoproteine**, am adaptat în laborator metoda descrisă de producător pentru izolarea miRNA cu kitul miRNeasy pentru ser/plasmă (Qiagen, Dusseldorf, Germany), utilizând 300 µL lipoproteine izolate (corespunzând la 120 µg proteină totală) și mimic sintetic cel-miR-39 ca miRNA de referință pentru normalizarea conținutului de miRNA în biofluide.

Am optimizat metoda descrisă de producător pentru **revers-transcrierea miRNA**, utilizând un amestec de amorse stem-loop specifice și realizând o singură reacție de revers-transcriere per probă pentru toate miRNA. Astfel, am reușit să reducem semnificativ consumul de reactivi fără a compromite valoarea datelor obținute.

Am pus la punct un **protocol nou de revers-transcriere duală a ARN** celular (izolat din macrofage umane în cultură), utilizând kit-ul de revers-transcriere High Capacity cDNA Reverse Transcription, amorse pentru revers-transcriere cu secvență aleatorie (*random primers*) și un amestec de amorse TaqMan stem-loop miRNA-specifice (toate de la Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), pe un sistem PCR Veriti. Astfel, am redus consumul de reactivi și de probă, realizând o singură reacție de revers-transcriere per probă, cu rezultate optime.

Am elaborat **modele de regresie logistică binară** pentru estimarea riscului de evenimente coronariene, folosind programul SPSS for Windows v21.

În **primul capitol** de rezultate originale, am detaliat un studiu pe un grup de pacienți cu hiperlipidemie și/sau hiperglicemie și ne-am propus să evaluăm asocierea unui set de molecule de microARN din circulația sangvină cu hiperlipidemia și/sau hiperglicemia. Studiul a cuprins 30 subiecți recrutați din populația generală din București, România, împărțiți în patru grupuri: subiecți sănătoși (C), pacienți cu hiperlipidemie (HL), pacienți cu hiperglicemie (HG) și hiperlipidemici-hiperglicemici (HLG), în funcție de nivelurile serice de lipide și glucoză *à jeun*.

Exista kituri comerciale pentru analiza distribuției microARN în celule, țesuturi sau lichide biologice, ce utilizează amorse specifice pentru detectarea anumitor microARN implicați în diferite patologii (boli cardiovasculare, diabet, cancer etc.). Deoarece nu există un kit comercial specific care să conțină un set de miRNA pentru metabolismul lipidic și al glucozei, am utilizat un PCR array specific pentru miRNA implicați în CVD (*Pathway-focused Human Cardiovascular Disease*) pentru determinarea profilului miRNA în seruri de la pacienți hiperlipidemici (HL) și/sau hiperglicemici (HLG). Selecția miRNA pentru analiza individuală s-a bazat pe mărimea creșterii nivelului seric detectată în urma analizei profilului miRNA în ser și pe datele disponibile în literatură. Astfel, am selectat și analizat individual un set de opt miRNA (miR-122, miR-125a, miR-486, miR-92a, miR-146a, miR-10a, miR-21 și miR-33a) în seruri de la pacienți și de la subiecți sănătoși.



Mai departe, am analizat corelațiile dintre nivelurile miRNA selectați și unii parametri lipidici și inflamatori serici. Pentru a determina distribuția acestor miRNA în clasele de lipoproteine, am izolat lipoproteine de joasă densitate (LDL) și lipoproteine de înaltă densitate (HDL) din seruri hiperlipidemice și/sau hiperglicemice și am identificat prezența miRNA selectați.

Rezultatele arată că profilul miRNA din serurile HLG prezintă niveluri crescute de miR-122, miR-125a, miR-486 și miR-92a. De asemenea, nivelurile miR-122, miR-125a, miR-146a, miR-10a, miR-21 și miR-33a măsurate individual sunt crescute în serurile HL și se corelează pozitiv cu principalii parametri lipidici și inflamatori, în timp ce miR-92a și miR-486 sunt creșcuți doar în serurile de la pacienți HG. Toți miRNA selectați sunt prezenți predominant în HDL, doar miR-33a se regăsește în cantități similare atât în HDL, cât și în LDL. În plus, toți miRNA analizați au niveluri crescute în HDL izolate din seruri hiperlipidemice (HL și HLG).

Până la ora actuală, aceasta este primul studiu care identifică niveluri cuantificabile de miR-33a în LDL. Până la publicarea acestor rezultate (în *Molecular Biology Reports* și *Annals of the Romanian Society of Cell Biology*), nu existau date în literatură care să descrie distribuția miR-125a și miR-10a circulanți în serurile pacienților hiperlipidemici și/sau hiperglicemici.

Aceste date originale au fost publicate în *Molecular Biology Reports* (revistă indexată ISI cu factor de impact 1,828, având în prezent **13 citări**) și în *Annals of the Romanian Society of Cell Biology* (revistă indexată BDI, având în prezent **1 citare**) și au fost comunicate la două manifestări științifice cu participare internațională sub forma unei **comunicări orale** și a unui **poster**.

Cel de-al doilea capitol de rezultate originale prezintă de asemenea un studiu clinic în care ne-am propus să identificăm miRNA din circulația sangvină asociați cu diferite subclase de lipoproteine izolate din serurile unor pacienți în diferite stadii ale CAD: pacienți cu angină stabilă (SA), pacienți cu angină instabilă (UA) și pacienți la o lună după un infarct miocardic acut (MI) comparativ cu un grup de subiecți sănătoși. Grupul SA a fost considerat categorie CAD de referință, iar grupurile UA și MI împreună au fost considerate ca grupuri de CAD vulnerabilă (categorie de risc). Toți pacienții au fost recrutați de la Clinica de Cardiologie a Spitalului Universitar de Urgență Elias, București. Subiecții control au fost donatori sănătoși de la Centrul de Transfuzie Sangvină, București, fără factori de risc cardiovascular sau alte boli în evidență (conform istoricului medical, examinării clinice și testelor de laborator).

Un scop adițional a fost determinarea miRNA specifici care, împreună cu un set de parametri lipidici cunoscuți, sunt capabili să prezică vulnerabilitatea pacientului CAD. În acest scop, am izolat lipoproteine de densitate intermediară (IDL), LDL și HDL din seruri de la pacienți CAD și am investigat prezența miRNA și distribuția lor în subclasele specifice de lipoproteine.

Date publicate anterior arată rolul miRNA în evoluția CVD și importanța utilizării lor ca instrumente de diagnostic [28]. Până la ora actuală, puține studii au investigat asocierea miRNA cu lipoproteinele circulante și implicarea lor în evoluția CAD [18, 24, 29].

Datele obținute în acest studiu arată că miR-486, miR-92a, miR-122 au cele mai mari niveluri în serurile pacienților CAD versus serurile subiecților control, dar nivelurile lor serice individuale nu diferă din punct de vedere statistic între grupurile CAD. Nivelurile miR-486 și miR-92a considerate împreună cu nivelurile de HDL-C, apolipoproteine și cu activitatea PON1 pot discrimina între pacienții CAD stabili și cei vulnerabili, cu un nivel de predicție de circa 85%.

Datele noastre arată că toți miRNA selectați sunt asociați în principal cu HDL, fiind în acord și extinzând studii ale altor grupuri, recent publicate [15, 18]. Astfel, miR-486, miR-92a, miR-122, miR-125a și miR-146a sunt asociați în principal cu HDL serice și de zece ori mai puțin cu IDL și LDL. În plus, miR-486 și miR-92a au cele mai mari niveluri în HDL izolate de la pacienți CAD vulnerabili (UA și MI) versus SA și distribuția lor diferă între subfracțiile de HDL, miR-486 predominând în HDL<sub>2</sub>, în timp ce miR-92a predomină în HDL<sub>3</sub>.

Experimentele noastre arată o distribuție preferențială a miRNA în subpopulațiile HDL (HDL<sub>2</sub> și HDL<sub>3</sub>), nivelurile de miR-486 și miR-92a putând discrimina între pacienții CAD stabili și vulnerabili. Astfel, rezultatele noastre arată o creștere specifică a nivelurilor miR-486 în HDL<sub>2</sub> și a miR-92a în HDL<sub>3</sub>, în special în cele izolate din serurile pacienților CAD vulnerabili (pacienții UA și MI) comparativ cu pacienți SA. Aceste date sunt mai departe confirmate de rezultatele care arată că nivelurile serice ale miR-486 și miR-92a pot estima riscul de CAD vulnerabilă într-un model de regresie logistică binară corectat pentru nivelurile serice de lipide, apolipoproteine și activitatea enzimelor asociate cu HDL.

Aceste date originale au fost publicate în *PLoS ONE* (revistă indexată ISI cu factor de impact 2,806, având în prezent **15 citări**) și au fost comunicate la 9 manifestări științifice internaționale sub forma a **3 comunicări orale** și **7 postere** și la 1 manifestare științifică națională sub formă de **poster**. Rezumatele a 5 postere au fost publicate în 4 reviste indexate ISI (*FEBS Journal*, *European Heart Journal*, *Cardiovascular Research* x2) și 1 revistă BDI (*Romanian Journal of Cardiology*).

În cel de-al **treilea capitol** de rezultate originale, am evaluat nivelurile a șase miRNA (miR-223, miR-92a, miR-486, miR-122, miR-125a și miR-146a) în seruri și HDL de la pacienți cu SA, pacienți cu ACS și subiecți sănătoși. Toți pacienții CAD au fost recrutați de la Clinica de Cardiologie a Spitalului Universitar de Urgență Elias, București, iar subiecții control au fost donatori sănătoși recrutați din personalul Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” și al Spitalului Elias, neavând boli cardiovasculare în antecedente sau alte afecțiuni cunoscute.

Este general acceptat că hiperglicemia este un factor accelerant în evoluția CAD [30], de aceea am urmărit să investigăm efectul concentrațiilor crescute de glucoză asupra macrofagelor umane în cultură, mai exact asupra expresiei genice a proteinelor mașinării de procesare a miRNA (Dicer, Drosha, DGCR8) și asupra producției miRNA analizați.

Datele obținute în acest studiu privind efectul hiperglicemiei asupra miRNA arată că în serurile ACS hiperglicemice, nivelurile miR-223, miR-92a, miR-486, miR-122, miR-125a și miR-146a sunt crescute comparativ cu serurile ACS normoglicemice. De asemenea, efectul hiperglicemiei se observă și asupra lipoproteinelor, în HDL izolate din seruri ACS hiperglicemice, nivelurile miR-223, miR-92a și miR-486 sunt crescute comparativ cu seruri normoglicemice și sunt semnificativ diferite între pacienții ACS și SA.

În studiul nostru, corelațiile parametrice arată că miR-92a și miR-486 se corelează negativ cu doi factori de risc pentru CAD: LDL mici și dense (exprimate ca raportul LDL-C/apoB-100) și HDL disfuncțional (exprimat ca raportul activitatea PON1/apoA-I). Aceasta sugerează că atunci când LDL mici și dense și HDL disfuncțional coexistă, nivelurile miR-92a și miR-486 cresc, completând rezultatele noastre anterioare care arată o asociere preferențială a miR-92a și miR-486 la pacienții CAD vulnerabili. De asemenea, analiza logistică a parametrilor specifici ai pacienților a arătat că nivelurile serice de miRNA (în special miR-92a și miR-486), împreună cu obezitatea, hipertensiunea, hiperglicemia și disfuncționalitatea HDL, au potențialul de a prezice riscul de producere a unor evenimente cardiovasculare la pacienți CAD.

În acest capitol arătăm, de asemenea, că în macrofage umane expuse în cultură la seruri izolate de la pacienți normoglicemici, serurile ACS induc creșterea expresiei genice a Drosha, DGCR8 și Dicer (proteine implicate în biogeneza miRNA) și a producției miR-223, miR-92a, miR-486, miR-125a și miR-146a comparativ cu serurile SA, iar concentrațiile crescute de glucoză potențează efectele observate, mai ales în cazul serurilor ACS. Din informațiile pe care le avem până la acest moment, acesta este primul studiu care evaluează efectele serurilor de la pacienți CAD asupra expresiei miRNA și a componentelor mașinării de procesare a acestora în macrofage umane.

Adăugarea glucozei în serurile normoglicemice (pentru a mima concentrațiile crescute existente în serurile hiperglicemice) induce o creștere atât a nivelurilor intracelulare de miRNA (miR-125a, miR-486, miR-92a, miR-146a, miR-223), cât și a expresiei unor proteine din mașinaria de procesare a miRNA (Drosha, DGCR8 și Dicer).

Din informațiile pe care le avem până la acest moment, acestea sunt primele date care arată efectul concentrațiilor crescute de glucoză asupra producției miRNA în macrofage umane. Creșterea producției miRNA observată în macrofage în cultura este în acord cu nivelurile crescute ale miRNA specifice în seruri.

Aceste date originale au fost publicate în *PLoS ONE* (revistă indexată ISI cu factor de impact 2,806, având în prezent **3 citări**) și au fost comunicate la 3 manifestări științifice internaționale sub forma a **2 postere** și la 1 manifestare științifică națională sub formă de **poster**. Rezumatul unui poster a fost publicat în o revistă indexată ISI (*Atherosclerosis*).

În urma rezultatelor obținute în studiile cu pacienți și prin experimentele *in vitro* utilizând macrofage umane în cultură, se pot contura următoarele **concluzii generale**:

1. Nivelurile miR-122, miR-125a, miR-486, miR-92a, miR-146a, miR-10a, miR-21 și miR-33a circulanți sunt corelate cu lipidele serice, cu nivelurile de CRP și IL-1 $\beta$  în serurile pacienților hiperlipidemici și/sau hiperglicemici.
2. Nivelurile miR-125a și miR-146a circulanți sunt asociate cu hiperglicemia serică.
3. MiR-122, miR-125a, miR-486, miR-92a, miR-146a, miR-10a și miR-21 circulanți sunt asociați în principal cu HDL, iar miR-33a este asociat și cu LDL.
4. Nivelurile serice ale miR-486 și miR-92a împreună cu nivelurile apoA-I, apoE, cu activitatea PON1 și cu raportul HDL-C/LDL-C (într-un model de regresie logistică binară) pot fi utilizați ca markeri adiționali pentru diagnosticul CAD vulnerabilă.
5. MiR-486 și miR-92a se asociază preferențial cu subpopulațiile HDL (miR-486 cu HDL<sub>2</sub> și miR-92a cu HDL<sub>3</sub>) și nivelurile lor discriminează între pacienții CAD vulnerabili (UA și MI) și cei cu angină stabilă.
6. Concentrațiile serice crescute de glucoză se corelează cu nivelurile crescute de miR-223, miR-92a, miR-486 în seruri și HDL izolate de la pacienți CAD, acești miRNA asociați cu HDL fiind capabili să discrimineze între pacienții ACS și SA.
7. Expunerea macrofagelor umane în cultură la seruri ACS comparativ cu seruri SA determină creșterea producției intracelulare a miR-223, miR-92a, miR-486, miR-125a și miR-146a prin creșterea expresiei Drosha, DGCR8 și Dicer, acest efect fiind augmentat de creșterea concentrației de glucoză.

**Perspective:**

Pe baza rezultatelor originale obținute în cadrul tezei de doctorat, dorim să continuăm studiul microARN prin investigarea funcționalității miR-486 și miR-92a, utilizând metode *in silico*, *in vitro* și *in vivo*. Astfel, vom determina genele țintă ale miR-486 și miR-92a prin bioinformatică, vom testa țintirea directă de către mimici ai miRNA a genelor inserate în plasmide și vom evalua efectele terapiei cu inhibitori pentru miRNA la hamsterul hiperlipidemic.

De asemenea, dorim să analizăm distribuția microARN în fragmente vasculare recoltate de la pacienți cu boli cardiovasculare și să o corelăm cu nivelurile lor circulante și cu gravitatea bolii.

## BIBLIOGRAFIE

- [1] P. Libby, Y. Okamoto, V.Z. Rocha, E. Folco, Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice, *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 74 (2010) 213-220.
- [2] G.K. Hansson, A. Hermansson, The immune system in atherosclerosis, *Nat Immunol*, 12 (2011) 204-212.
- [3] Z. Reiner, A.L. Catapano, G. De Backer, I. Graham, M.R. Taskinen, O. Wiklund, S. Agewall, E. Alegria, M.J. Chapman, P. Durrington, S. Erdine, J. Halcox, R. Hobbs, J. Kjekshus, P.P. Filardi, G. Riccardi, R.F. Storey, D. Wood, ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS), *Eur Heart J*, 32 (2011) 1769-1818.
- [4] I. Manduteanu, M. Simionescu, Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders?, *Journal of cellular and molecular medicine*, 16 (2012) 1978-1990.
- [5] A.J. Lusis, Atherosclerosis, *Nature*, 407 (2000) 233-241.
- [6] M. Simionescu, D. Popov, A. Sima, Endothelial transcytosis in health and disease, *Cell Tissue Res*, 335 (2009) 27-40.
- [7] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116 (2004) 281-297.
- [8] K. Ono, Y. Kuwabara, J. Han, MicroRNAs and cardiovascular diseases, *FEBS J*, 278 (2011) 1619-1633.
- [9] K.J. Moore, K.J. Rayner, Y. Suarez, C. Fernandez-Hernando, microRNAs and cholesterol metabolism, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21 (2010) 699-706.
- [10] B.N. Davis, A. Hata, Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms, *Cell Commun Signal*, 7 (2009) 18.
- [11] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V.N. Kim, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, 425 (2003) 415-419.
- [12] A.M. Denli, B.B. Tops, R.H. Plasterk, R.F. Ketting, G.J. Hannon, Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex, *Nature*, 432 (2004) 231-235.
- [13] R. Yi, Y. Qin, I.G. Macara, B.R. Cullen, Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes Dev*, 17 (2003) 3011-3016.
- [14] P. Graves, Y. Zeng, Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 10 (2012) 239-245.
- [15] K.C. Vickers, B.T. Palmisano, B.M. Shoucri, R.D. Shamburek, A.T. Remaley, MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins, *Nat Cell Biol*, 13 (2011) 423-433.
- [16] D.L. Michell, K.C. Vickers, Lipoprotein carriers of microRNAs, *Biochim Biophys Acta*, (2016).
- [17] R.A. Boon, K.C. Vickers, Intercellular transport of microRNAs, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33 (2013) 186-192.
- [18] J. Wagner, M. Riwanto, C. Besler, A. Knau, S. Fichtlscherer, T. Roxe, A.M. Zeiher, U. Landmesser, S. Dimmeler, Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33 (2013) 1392-1400.
- [19] J.T. Mendell, E.N. Olson, MicroRNAs in stress signaling and human disease, *Cell*, 148 (2012) 1172-1187.
- [20] A.M. Ardekani, M.M. Naeini, The Role of MicroRNAs in Human Diseases, *Avicenna journal of medical biotechnology*, 2 (2010) 161-179.
- [21] K.J. Rayner, C. Fernandez-Hernando, K.J. Moore, MicroRNAs regulating lipid metabolism in atherogenesis, *Thromb Haemost*, 107 (2012) 642-647.
- [22] C. Guay, R. Regazzi, Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus, *Nat Rev Endocrinol*, 9 (2013) 513-521.
- [23] J. Madrigal-Matute, N. Rotllan, J.F. Aranda, C. Fernandez-Hernando, MicroRNAs and atherosclerosis, *Current atherosclerosis reports*, 15 (2013) 322.
- [24] E.E. Creemers, A.J. Tijssen, Y.M. Pinto, Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?, *Circulation research*, 110 (2012) 483-495.
- [25] F.J. Ortega, J.M. Mercader, V. Catalan, J.M. Moreno-Navarrete, N. Pueyo, M. Sabater, J. Gomez-Ambrosi, R. Anglada, J.A. Fernandez-Formoso, W. Ricart, G. Fruhbeck, J.M. Fernandez-Real, Targeting the circulating microRNA signature of obesity, *Clinical chemistry*, 59 (2013) 781-792.
- [26] M. Parrizas, A. Novials, Circulating microRNAs as biomarkers for metabolic disease, *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 30 (2016) 591-601.
- [27] D. Santovito, V. Egea, C. Weber, Small but smart: MicroRNAs orchestrate atherosclerosis development and progression, *Biochimica et biophysica acta*, 1861 (2016) 2075-2086.
- [28] M. Jaguszewski, J. Osipova, J.R. Ghadri, L.C. Napp, C. Widera, J. Franke, M. Fijalkowski, R. Nowak, M. Fijalkowska, I. Volkmann, H.A. Katus, K.C. Wollert, J. Bauersachs, P. Erne, T.F. Luscher, T. Thum, C. Templin, A signature of circulating microRNAs differentiates takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction, *European heart journal*, 35 (2014) 999-1006.
- [29] V.P. van Empel, L.J. De Windt, P.A. da Costa Martins, Circulating miRNAs: reflecting or affecting cardiovascular disease?, *Curr Hypertens Rep*, 14 (2012) 498-509.
- [30] A.P. Ofstad, Myocardial dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes, *Scand J Clin Lab Invest*, 76 (2016) 271-281.