



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biologie și Patologie Celulară
„Nicolae Simionescu”

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**IDENTIFICAREA DE NOI BIOMARKERI CU
POTENȚIAL PREDICTIV PENTRU RISCUL APARIȚIEI
EVENIMENTELOR CRITICE LA PACIENȚII CU
DETERMINĂRI VASCULARE MULTIPLE**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT

Acad. ANCA VOLUMNIA SIMA

DOCTORAND:

ORIANA ELENA MORARU

2022

Cuprins

Cuvânt înainte

Listă abrevieri

Introducere si obiectivele generale ale tezei

I. Stadiul actual al cunoștințelor

I.1. Sistemul cardiovascular în condiții fiziologice și patologice

I.1.1. Structura peretelui arterial în condiții fiziologice

I.1.2. Ateroscleroza – definiție si factori de risc

I.1.3. Etapele dezvoltării plăcii de aterom

I.1.4. Lipoproteinele, dislipidemia, stresul oxidativ și inflamator în ateroscleroză

I.1.5. Factori epigenetici (microARN) în ateroscleroză

I.2. Teritoriile vasculare afectate de ateroscleroză în boala cardiovasculară

I.3. Boala ocluzivă cerebrovasculară extracraniană

I.3.1. Localizarea plăcii de aterom la nivel carotidian, clasificare și factori de risc

I.3.2. Simptomatologie și diagnostic în boala ocluzivă cerebrovasculară extracraniană

I.3.3. Tratamentul stenozei arterei carotide

I.4. Boala arterială periferică

I.4.1. Clasificarea bolii arteriale a membrelor inferioare

I.4.2. Metode de diagnostic în boala arterială periferică

I.4.3. Tipuri de tratament pentru boala arterială periferică

II. Contribuții originale

II.1. Identificarea unor parametrii biochimici si epigenetici cu potențial de markeri ai gravității stenozei arterei carotide (SAC)

II.1.1. Înrolarea pacienților cu SAC selectați conform ghidurilor profesionale

II.1.2. Caracteristicile antropometrice, diagnosticul secundar și tratamentul medicamentos al pacienților cu SAC

II.1.3 Recoltarea probelor de sânge de la pacienții cu SAC

II.1.4. Procedura de endarterectomie carotidiană (EAC) și recoltarea specimenelor de placă aterosclerotică

II.1.5. Metode biochimice și imunochimice pentru caracterizarea proteinelor plasmatică la pacienții cu SAC

II.1.6. Metode de biologie moleculară pentru analiza factorilor epigenetici (microARN) în probele de plasmă și placa aterosclerotică de la pacienții cu SAC

- II.1.7. Metodologia analizei statistice a rezultatelor de la pacienții cu SAC
- II.1.8. Parametrii biochimici determinați în plasma pacienților SAC
- II.1.9. Caracterizarea tipurilor de plăci de aterom carotidian izolate de la pacienții cu SAC
- II.1.10. Identificarea și analiza microARN din plasmă și aterom carotidian de la pacienții cu SAC
- II.1.11. Discuții și concluzii parțiale

II.2. Identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității bolii arteriale periferice (BAP)

- II.2.1. Înrolarea pacienților cu BAP selectați conform ghidurilor profesionale
- II.2.2. Caracteristicile antropometrice, diagnosticul secundar și tratamentul medicamentos al pacienților cu BAP
- II.2.3. Recoltarea probelor de sânge de la pacienții cu BAP
- II.2.4. Procedura de revascularizare prin by-pass a arterelor membrelor inferioare la pacienții cu BAP și recoltarea specimenelor de placă aterosclerotică
- II.2.5. Metode biochimice și imunochimice pentru caracterizarea proteinelor și lipoproteinelor plasmatică la pacienții cu BAP
- II.2.6. Metode de biologie moleculară pentru identificarea și analiza microARN în probele de plasmă și placă de aterom de la pacienții cu BAP
- II.2.7. Metodologia analizei statistice a rezultatelor de la pacienții cu BAP
- II.2.8. Parametrii biochimici determinați în plasma pacienților cu BAP
- II.2.9. Proteine modificate (oxidate și/sau glicate) în lipoproteine de densitate înaltă (HDL) de la pacienții cu BAP, cu și fără diabet
- II.2.10. Caracterizarea tipurilor de plăci de aterom din arterele periferice de la pacienții cu BAP
- II.2.11. Analiza factorilor biochimici și microARN de la pacienții cu BAP în funcție de evenimentele cardiovasculare înregistrate pe parcursul unui an de urmărire clinică
- II.2.12. Discuții și concluzii parțiale

III. Concluzii generale

IV. Bibliografie

Lucrări publicate pe durata programului doctoral

Cuvinte cheie: ateroscleroză, boala arterelor periferice, markeri de inflamație, markeri epigenetici (microARN), lipoproteine, stenoza arterelor carotide

Număr total de pagini: 130

Număr de figuri în Stadiul actual al cunoștințelor: 12

Număr de tabele în Stadiul actual al cunoștințelor: 5

Număr de figuri în Contribuții originale: 22

Număr de tabele în Contribuții originale: 26

Referințe bibliografice: 197

Lucrări publicate în reviste indexate ISI: 3 (1 – autor principal, 2 – co-autor)

Introducere și obiectivele generale ale tezei

Elaborarea prezentei teze a pornit de la marea problematică a medicinei moderne, și anume ateroscleroza, și mai exact de la totalitatea și severitatea determinărilor aterosclerotice la nivel vascular periferic (carotidian și la nivelul membrelor inferioare). Severitatea bolii aterosclerotice la nivel periferic, și nu numai, este influențată de prezența factorilor de risc (diabetul zaharat, dislipidemia, fumatul, vârsta, asocierea altor determinări aterosclerotice, obezitatea) și de complexitatea acestora. Evoluția bolii aterosclerotice este galopantă în absența corecției acestor factori de risc sau a neglijării medicației sau a stilului de viață nesănătos. Această teză de doctorat și-a propus să găsească corelații între parametrii plasmatici lipidici și inflamatori și boala aterosclerotică, precum și identificarea unor markeri ai evoluției bolii aterosclerotice. Persistența factorilor de risc în zonele arteriale pro-aterogene determină apariția și progresia unei cascade de evenimente ce se traduce prin apariția și progresia plăcii de aterom. Etapele formării plăcii de aterom încep cu acumularea subendotelială a lipoproteinelor modificate oxidativ, care declanșează activarea celulelor endoteliale (CE), urmată de disfuncția endotelială, cu apariția unor molecule de adeziune celulară responsabile de declanșarea unui puternic răspuns inflamator. Celulele inflamatorii pătrunse sub endoteliu, prin factorii pe care îi secretă, determină acumularea de celule musculare netede la nivelul intimei arteriale, cu formarea capului fibros. Celulele musculare netede suferă și ele un proces de transformare, într-un fenotip secretor, dând naștere unei lamine bazale hiperplazice, multistratificate, cu o matrice extracelulară bogată în fibre de colagen și fibrile (Simionescu and Sima, 2012). În final, se formează placa de aterom, care poate fi stabilă sau instabilă, în funcție de compoziția celulară a acesteia. Eroziunea sau subțierea capului fibros expune matricea extracelulară subendotelială bogată în celule proinflamatorii și procoagulante, celulelor din circulația sanguină, inițiindu-se astfel procesul de tromboză. Această cascadă de evenimente este amplificată și accelerată în cazul diabetului zaharat, începând cu apariția timpurie a disfuncției endoteliale (Toma et al 2021), a plăcii aterosclerotice și trombozarea acesteia.

Structura tezei de doctorat

În **prima parte** a tezei de doctorat am abordat problematica pacientului „vascular”, adică a pacientului care asociază una sau mai multe determinări aterosclerotice, de obicei cu multipli factori de risc asociați și neglijați, în proporție ridicată. Pacientul ajunge la chirurgul vascular deoarece nu mai suportă durerea de repaus sau nocturnă, sau când leziunea trofică de la nivelul piciorului capătă un miros fetid pe care pacientul sau familia nu îl mai poate suporta, sau când leziunile vasculare de la nivelul arterelor carotide se soldează cu un accident vascular și atunci este nevoie de un examen de specialitate. De asemenea, am descris pe scurt modalitatea de formare a plăcii de aterom și mecanismele și moleculele implicate în acest proces aterosclerotic.

Partea a doua a lucrării, cea de contribuții originale cuprinde:

- criteriile de înrolare a pacienților și descrierea tipurilor de intervenții chirurgicale aplicate pacienților înrolați în studiu;
- metodele biochimice și imunochimice pentru caracterizarea proteinelor și lipoproteinelor plasmatică și metodele de biologie moleculară pentru analiza factorilor epigenetici (microARN) în probe de plasmă și aterom;
- identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității bolii stenotice carotidiene și ai bolii arteriale periferice în două studii specifice.

Am stabilit grupele de pacienți cu stenoză carotidiană și boală arterială periferică, grupul control pentru fiecare din cele două categorii de pacienți, datele antropometrice, diagnosticele secundare, tratamentul medicamentos al acestor categorii de pacienți. Am studiat două teritorii vasculare (arterele carotide și arterele periferice ale membrilor inferioare) a căror afectare aterosclerotică este frecventă și produce morbiditate și mortalitate în cel mai înalt grad.

În **primul studiu**, ne-am propus să evaluăm rolul miR-223, ca potențial biomarker pentru agravarea SAC la pacienții cu vârsta peste 65 de ani și am corelat nivelele acestuia cu parametrii asociați lipoproteinelor de densitate înaltă (HDL). Concluzia acestui studiu este că pacienții cu SAC cu vârsta peste 65 de ani au prezentat o creștere semnificativă a nivelurilor miR-223-3p atât în plasmă, cât și în placa de aterom carotidiană, comparativ cu pacienții cu SAC sub 65 de ani.

În cel de **al doilea studiu**, ne-am propus să identificăm modificări ale compoziției subfracțiilor HDL₂ și HDL₃ care se asociază cu severitatea bolii arteriale periferice (BAP)

și determină alterarea funcției HDL măsurată ca efecte antiinflamatorii exercitate asupra CE umane activate cu factorul de necroză tumorală alfa (TNF α). Am urmărit să determinăm care dintre modificările identificate la nivelul constituenților HDL sunt detectabile la proteine din plasmă și ar putea prezice severitatea bolii la pacienții cu BAP, pentru a fi transpuse în laboratoarele clinice. Astfel am constatat creșterea nivelurilor de clusterina (CLU) și a activității specifice ale mieloperoxidazei (MPO) și diminuarea activității specifice a paraoxonazei (PON1) în plasmă, acestea reflectând alterarea proteinelor HDL și a funcționalității acestora. Rezultatele ar putea fi translatate în laboratoare clinice și ar putea servi la prognosticul severității BAP. De asemenea, în același studiu am analizat expresia din placa aterosclerotică și de la nivel plasmatic al hsa-miR-142-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-92a-3p și am realizat corelații cu evoluția postoperatorie pe parcursul unui an a pacienților cu BAP. Am dovedit pentru prima dată legătura dintre nivelurile miARNs din placa aterosclerotică și expresia pri-miARNs corespunzătoare în placa aterosclerotică.

I. Stadiul actual al cunoștințelor

În acest capitol am cuprins date cunoscute despre structura peretelui arterial în condiții fiziologice (tipurile de artere și structura peretelui vascular normal), ce se întâmplă în condiții patologice, cum apare ateroscleroza, fazele de apariție și dezvoltare a plăcii de aterom, precum și despre factorii de risc bine cunoscuți care determină procesul aterosclerotic. De asemenea, am prezentat date despre rolul factorilor epigenetici (microARN) în ateroscleroză.

Boala cardiovasculară (BCV), principala cauză de mortalitate în lume, este un proces complex, principalele manifestări clinice incluzând infarctul miocardic, accidentul vascular cerebral și BAP, care pot fi unice ca localizare sau cu determinări simultane la două sau trei niveluri arteriale. Procesul aterosclerotic este cel care generează BCV. Placa aterosclerotică este rezultatul acțiunii unor factori de risc, considerați ca fiind clasici (dislipidemia, stresul oxidativ, citokinele proinflamatorii, factori vasoconstrictori incriminați în hipertensiune, produși de glicoxidare asociați cu hiperglicemia și fumatul) sau în absența unei hipercolesterolemii sistemice, inițierea formării plăcii de aterom este o reacție inflamatorie.

Evaluarea riscului cardiovascular individual implică măsurarea factorilor de risc corelați cu riscul cardiovascular (lipidele, glicemia, vârsta, sexul, fumatul și tensiunea arterială). La acești factori clasici se încearcă stabilirea unor corelații între markerii plasmatici și boala aterosclerotică, precum și predictibilitatea evoluției bolii aterosclerotice. Este cunoscut faptul că boala vasculară afectează arterele la diferite niveluri și se caracterizează prin efecte dăunătoare la nivelul endoteliului vascular, generând disfuncție endotelială. Disfuncția endotelială este răspunsul la acțiunea factorilor de risc cardiovascular. Ea reprezintă etapa timpurie cheie în dezvoltarea aterosclerozei, dar apoi este implicată în toate etapele progresiei plăcii aterosclerotice și în apariția complicațiilor acesteia. Indiferent de factorii care o generează, formarea plăcii de aterom este un proces în care implicarea graduală a diferitelor tipuri de celule și a produșilor lor secretorii duce la o serie de secvențe de la formarea stratului lipidic la placa fibrolipidică, la ruptură și aterotromboză.

Ateroscleroza este un proces multifactorial indus și favorizat de factori de risc precum dislipidemia, stresul oxidativ și inflamator, diabetul zaharat (DZ), hipertensiunea, fumatul, îmbătrânirea și mutațiile genetice (Authors/Task Force et al., 2019) și poate fi localizat la mai multe niveluri, concomitent (coronarian, carotidian și la nivelul membrelor inferioare).

Dislipidemia se definește prin concentrații sanguine crescute de colesterol total (total cholesterol, TC) și de LDL-colesterol (LDL-C) și/sau trigliceride (TG) și scăderea colesterolului în HDL (Musunuru, 2010).

HDL sunt complexe macromoleculare alcătuite din lipide și proteine, produse în ficat și intestinul subțire, care transportă colesterol liber și esterificat, fosfolipide (phospholipids, PL), TG și apoproteine (apolipoproteine - apoAI, apoAII, apoCIII, apoE, enzime – paraoxonaza 1 (PON1), mieloperoxidaza (MPO)) în circulație (Camont et al., 2011, Larach et al., 2012). În plasma umană, HDL sunt reprezentate de două subfracții majore: HDL₂ și HDL₃, cu dimensiune, densitate și compoziție diferită (Eren et al., 2012). HDL au proprietăți anti-aterosclerotice datorită capacității lor de a prelua colesterolul în exces din țesuturile periferice transportându-l la ficat, așa-numitul revers cholesterol transport (RCT), dar și datorită potențialului lor anti-oxidant, anti-inflamator și anti-trombotic (Arora et al., 2016). Un efect atero-protector al HDL este conservarea funcției CE (). În ultimii ani, calitatea și funcția HDL au devenit un indicator consecvent al riscului de BCV (Carnuta et al., 2017, Parhofer, 2015). În cazul creșterii stresului oxidativ, HDL devine disfuncțional și prezintă un număr crescut de molecule de MPO care înlocuiesc

moleculele de PON1 (Variji et al., 2019). Astfel, HDL disfuncțional nu mai poate proteja LDL de oxidare, aceste modificări fiind factorii cheie de risc pentru inițierea și progresia plăcilor aterosclerotice. Activitatea PON1 în ser și în HDL la pacienții cu BAP este scăzută comparativ cu subiecții sănătoși, concluzia fiind că HDL se oxidează și devine disfuncțional (Tan et al., 2014, Shen et al., 2015, Luscher et al., 2014). Încercările pentru dezvoltarea de noi terapii pentru tratamentul pacienților cu BAC bazate pe stimularea ficatului și intestinului subțire de a produce HDL funcțional sunt de mare actualitate.

MicroARN-urile (miARN) sunt secvențe scurte, necodante de ARN, de 20-25 nucleotide, implicate în controlul expresiei genice. Aceste miARN orchestrează expresia genelor la nivel post-transcripțional, reglând sinteza proteinelor la nivelul ARN-ului mesager (ARNm) prin degradarea acestuia. Astfel, fiecare miARN poate deveni un factor de transcriere și un reglator al expresiei genice cu implicații în proliferarea și diferențierea celulară, apoptoză și procese inflamatorii (Vogiatzi et al., 2018). Aceste miARN sunt descrise ca reglatori în variate procese celulare întâlnite în fiziopatologia BCV (Vogiatzi et al., 2018), a cancerului (Rupaimoole and Slack, 2017), bolilor autoimune (Yan et al., 2019) și a altor afecțiuni. Mai mult, miARN se găsesc în diferite țesuturi și celule sanguine, nivelul lor plasmatic fiind propus ca un potențial biomarker în diagnosticul evenimentelor cardiovasculare, cum ar fi infarctul miocardic (Devaux et al., 2012). Exisă câteva date despre nivelul miARN în placa aterosclerotică (Parahuleva et al., 2018), dar nu au fost raportate studii cu privire la corelația nivelului expresiei miARN din placă și cel de la nivel plasmatic, precum și corespondentul expresiei pri-miARN în placă.

Evenimentul vascular major în stenoza arterei carotide (SAC) este reprezentat de accidentul vascular ischemic, iar dezvoltarea leziunilor la nivelul arterelor membrilor inferioare generează BAP, cu repercusiuni importante asupra calității vieții pacientului și reintegrarea lui în societate.

Ateroscleroza arterelor carotide extracraniene reprezintă o problemă majoră de sănătate, cu o mortalitate prin accident vascular ischemic situată între 10-30%. Semnele și simptomele în boala ocluzivă cerebrovasculară extracraniană sunt reprezentate de amauroza fugace, accidentul ischemic tranzitor, accidentul ischemic în evoluție și infarctul cerebral. Explorările imagistice care stabilesc diagnosticul și conduita terapeutică sunt ecografia Doppler, angio tomografia sau angio RMN, angiografia carotidiană.

Tratamentul bolii ocluzive cerebrovasculare extracraniene presupune mai multe abordări și anume: schimbarea stilului de viață, tratamentul medicamentos și, după caz, tratamentul chirurgical. Enderectomia carotidiană (EAC) se adresează pacienților cu

SAC simptomatică, dar și unui grup de pacienți asimptomatici cu risc crescut de eveniment vascular cerebral (conform ghidurilor internaționale).

Ateroscleroza arterelor periferice a membrelor inferioare reprezintă un procent mic al mortalității globale de cauze cardiovasculare, cca 1-2%, dar reprezintă o cauză comună de morbiditate generată de reducerea mobilității, prin claudicație intermitentă, durere de repaus sau ischemie acută. BAP a membrelor inferioare poate fi simptomatică sau asimptomatică, localizată la diverse niveluri ale axului arterial periferic (artere femurale comune, profunde, superficiale, poplitee și trunchiuri gambiere) și poate determina manifestări clinice diverse, de la durere de tip claudicație intermitentă, cu reducerea progresivă a perimetrului de mers până la durere de repaus (care nu lasă pacientul să se odihnească și care necesită de obicei folosirea unei cantități importante de opiacee) și apariția leziunilor trofice minime sau extensive de tipul gangrenei. Implicații importante în evoluția pacienților cu BAP o are și asocierea diabetului (Abou-Zamzam et al., 2007)

Diagnosticul BAP se face prin efectuarea unei anamneze minuțioase, examinarea clinică a pacientului cu aprecierea pulsurilor periferice, măsurarea indicelui gleznă-braț, efectuarea unei ecografii Doppler și a angiografiei de membre inferioare sau a unui angio CT/RMN.

Tratamentul BAP implică controlul factorilor de risc (tratamentul conservator) și tratamentul chirurgical, acesta din urmă putând fi de revascularizare (by-pass, angioplastie) sau de amputație.

II. Contribuții originale

Acest capitol cuprinde:

II.1. Identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității stenozei arterei carotide (SAC).

II.2. Identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității bolii arteriale periferice (BAP).

Identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității stenozei arterei carotide (SAC) a avut ca scop evaluarea asocierii hsa-miR-223-3p (miR-223) cu vârsta la pacienții cu SAC după intervenția chirurgicală de EAC, adică estimarea rolului miR-223 ca potențial biomarker pentru agravarea SAC la pacienții cu vârsta peste 65 de ani și asocierea acestuia cu parametrii asociați HDL.

Studiul a cuprins 32 de pacienți cu SAC > 70% internați în spital pentru procedura de EAC și 28 de subiecți sănătoși control (N). Cei 32 de pacienți cu SAC, internați în spital pentru procedura de EAC, au fost împărțiți în 2 grupe, în funcție de vârstă: pacienți cu SAC cu vârsta sub 65 de ani (n = 13) și pacienți cu SAC cu vârsta peste 65 de ani (n = 19). Am selecționat pacienții în funcție de criteriile de includere și excludere pe care le-am stabilit înainte de începerea studiilor, iar intervențiile chirurgicale au respectat recomandările societăților de profil.

Au fost determinați parametrii plasmatici și au fost caracterizate proteinele plasmatică la pacienții cu SAC (Figura 1) prin metode specifice și de asemenea s-a efectuat analiza Western blot a probelor de la pacienții cu SAC.

Am procesat specișenele de plăci aterosclerotice carotidiene pentru microscopie optică și am aplicat metode de biologie moleculară pentru analiza factorilor epigenetici (microARN) în probele de plasmă și placa aterosclerotică de la pacienții cu SAC, apoi am analizat statistic rezultatele miARN de la pacienții cu stenoza arterei carotide (SAC).

Din totalul pacienților cu SAC care au suferit intervenție chirurgicală pentru îndepărtarea plăcii carotidiene, un procent de 66,7% au prezentat o evoluție bună și 33,3% au avut o evoluție nefavorabilă. Pacienții cu SAC cu evoluție nefavorabilă a bolii au prezentat o creștere a concentrației plasmatică a TG, CRP, formei oxidate a ApoAI (MDA-ApoAI) și acidului sialic, față de cei cu evoluție favorabilă (Figura 1).

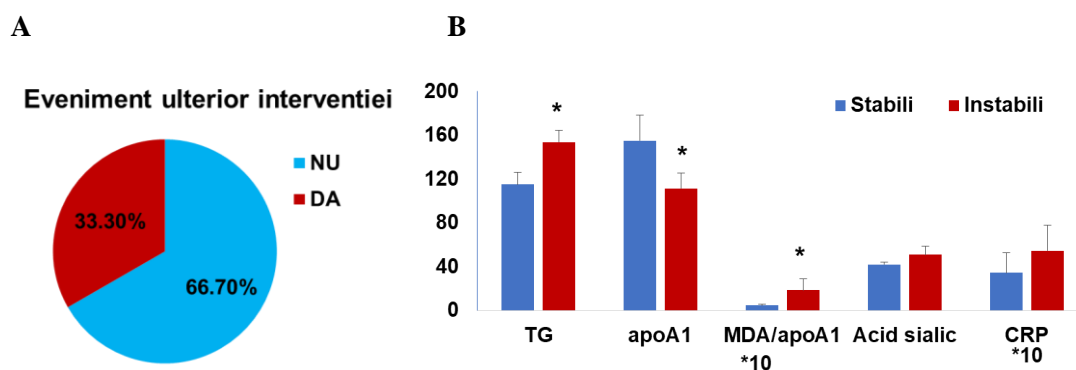


Figura 1. Corelații între evoluția pacienților cu stenoza arterelor carotide la 1 an de la intervenție (A) și parametrii plasmatici determinați inițial (B). Datele sunt exprimate ca medii ± eroare standard a mediei (SEM). *p < 0,05 SAC stabili vs. instabili.

Noutatea studiului nostru este că pacienții cu SAC cu vârsta peste 65 de ani comparativ cu pacienții cu SAC sub 65 de ani au prezentat o creștere semnificativă a nivelurilor miR-223-3p atât în plasmă, cât și în placa de aterom carotidiană (Figura 2).

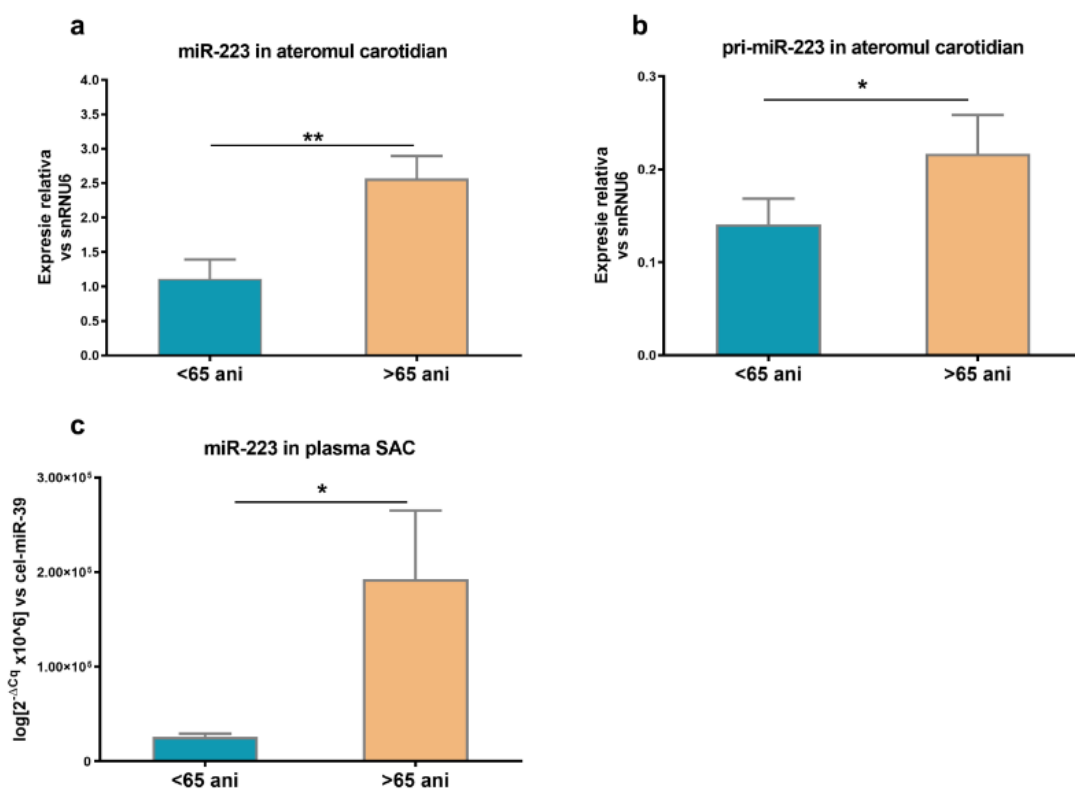


Figura 2. Nivelurile miR-223-3p la pacienții cu SAC. Niveluri de miR-223-3p (a) și pri-miR-223 (b) în ateromul carotidian și de miR-223-3p în plasmă (c) la pacienții cu SAC cu vârsta peste 65 de ani comparativ cu cei sub 65 de ani. Datele sunt ilustrate sub formă de histograme cu bare de eroare SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparativ cu grupul < 65 ani.

Din câte știm, acesta este primul studiu care raportează corelația nivelurilor miR-223-3p în plasmă și placa de aterom carotidiană cu vârsta pacienților cu SAC.

Am demonstrat în acest capitol o producție sporită de miR-223-3p, local și specific în celulele ateromului carotidian de la pacienții vârstnici cu SAC, asociată cu expresia crescută local a pri-miR-223, aceste date corelându-se cu observațiile grupului lui Li (Li et al., 2017) care susțin ipoteza că la pacienții vârstnici cu SAC, o producție sporită de miR-223 apare în plăcile aterosclerotice ca răspuns la diferiți factori oxidativi și inflamatori ce ar putea afecta activitatea promotorului miR-223.

Împreună, datele noastre și ale celorlalte grupuri sugerează că:

1. nivelurile crescute de miR-223-3p plasmatice observate la pacienții vârstnici cu SAC se corelează cu producția locală crescută de miRNA în ateromul carotidian,
2. nivelurile crescute de miR-223-3p se corelează cu procesele oxidative și inflamatorii care apar în timpul îmbătrânirii,
3. modularea expresiei miR-223-3p ar putea fi utilizată ca o posibilă abordare terapeutică pentru prevenirea restenozei după endarterectomie la pacienții cu SAC.

O limitare a prezentului studiu este numărul relativ mic de pacienți cu SAC analizați. În ciuda acestui fapt, analizele statistice utilizate, împreună cu distribuția miR-223 în plasmă și aterom carotidian, au dat rezultate statistic semnificative. O altă limitare al studiului nostru și al altora privind analiza miARN este lipsa metodelor standardizate de măsurare a nivelurilor absolute de miARN în plasmă, ceea ce face compararea cu alte date din literatură destul de dificilă.

Cel de al doilea studiu s-a ocupat de identificarea unor parametrii biochimici și epigenetici cu potențial de markeri ai gravității bolii arteriale periferice (BAP).

În studiul acesta, ne-am propus să identificăm modificări ale compoziției subfracțiilor HDL₂ și HDL₃ care se asociază cu severitatea BAP și determină alterarea funcției HDL măsurată ca efect anti-inflamator exercitat asupra CE umane activate cu TNF α . Un alt scop al studiului a fost de a determina care dintre modificările identificate la nivelul constituenților HDL sunt detectabile în plasmă și ar putea prezice severitatea bolii la pacienții cu BAP, pentru a fi transpuse în laboratoarele clinice.

Am analizat nivelurile unui set de 4 miARN-uri (hsa-miR-142-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-92a-3p) în plasma și în plăcile aterosclerotice femurale la pacienții cu BAP, care au dezvoltat evenimente cardiovasculare în decursul unui an de la intervenția chirurgicală primară. Am ales acest set de miARN pe baza studiilor anterioare din departamentul Lipidomică al IBPC-NS și al altor date publicate în literatură. Astfel, am analizat expresia din placă și de la nivel plasmatic al hsa-miR-142-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-92a-3p și am realizat corelații cu evoluția pacienților cu BAP. Am raportat că hsa-miR-142-3p poate fi considerat un biomarker predictiv pentru evenimentele cardiovasculare.

Studiul a cuprins 47 de pacienți diagnosticați cu BAP (4 femei și 43 de bărbați) BAP, cu vârste cuprinse între 32-83 de ani, cu by-pass la nivelul membrului inferior și 28 de subiecți sănătoși control (N). Am selecționat pacienții în funcție de criteriile de includere și excludere pe care le-am stabilit înainte de începerea studiilor, iar intervențiile chirurgicale au respectat recomandările societăților de profil.

Am determinat parametrii plasmatici, am izolat prin ultracentrifugare subfracțiile de HDL din plasma pacienților cu BAP, am măsurat parametrii biochimici în subfracțiile de HDL, am determinat aducții de proteine MDA și AGE în subfracțiile de HDL, am efectuat analiza Western blot și am analizat miARN în plasma și placa aterosclerotică de la pacienții cu BAP.

Pacienții cu BAP au fost împărțiți în două grupuri în funcție de prezența DZ ca patologie asociată cu BAP: (i) BAP fără DZ (BAP, n = 32) și (ii) BAP cunoscută a avea DZ (BAP-DZ, n = 21). HDL₂ și HDL₃ izolate prin ultracentrifugare din plasma subiecților sănătoși (N) și a pacienților BAP cu și fără DZ (BAP-DZ/BAP) au fost caracterizate prin:

1. conținutul de lipide și apolipoproteine: colesterol, fosfolipide (PL), apolipoproteina AI (ApoAI), ApoAII, ApoCIII, clusterin (CLU), and ApoE,
2. conținutul și activitatea PON1 și MPO: PON1 proteina și activitate, MPO proteina și activitate,
3. prezența aducțiilor AGE-proteine: AGE-ApoAI, AGE-CLU, AGE-ApoE și AGE-PON1,
4. prezența markerilor de stres oxidativ: aducți malondialdehida-ApoAI (MDA-ApoAI), MDA-CLU, MDA-ApoE, MDA-PON1, ceruloplasmina (CP) și diene conjugate.

Rezultatele noi ale studiului nostru sunt că la pacienții cu BAP, DZ induce o alterare diferențiată a componentelor proteice ale HDL₂ și HDL₃, după cum urmează:

1. HDL₂ prezintă o reducere a proteinei PON1 și a activității, împreună cu scăderea apoAI și creșterea apoAII și apoCIII;
2. o creștere modestă a proteinei MPO în HDL₂ este însoțită de o creștere semnificativă a aducțiilor de proteine-MDA și -AGE în ApoAI, CLU, ApoE și PON1;
3. în HDL₃ au crescut CLU și apoCIII și au scăzut nivelurile apoAII;
4. HDL₃ are o activitate PON1 redusă, în paralel cu nivelurile crescute de MPO și CP, și niveluri crescute de MDA- și AGE-PON1, -CLU și AGE-apoAI (Figurile 3-5)

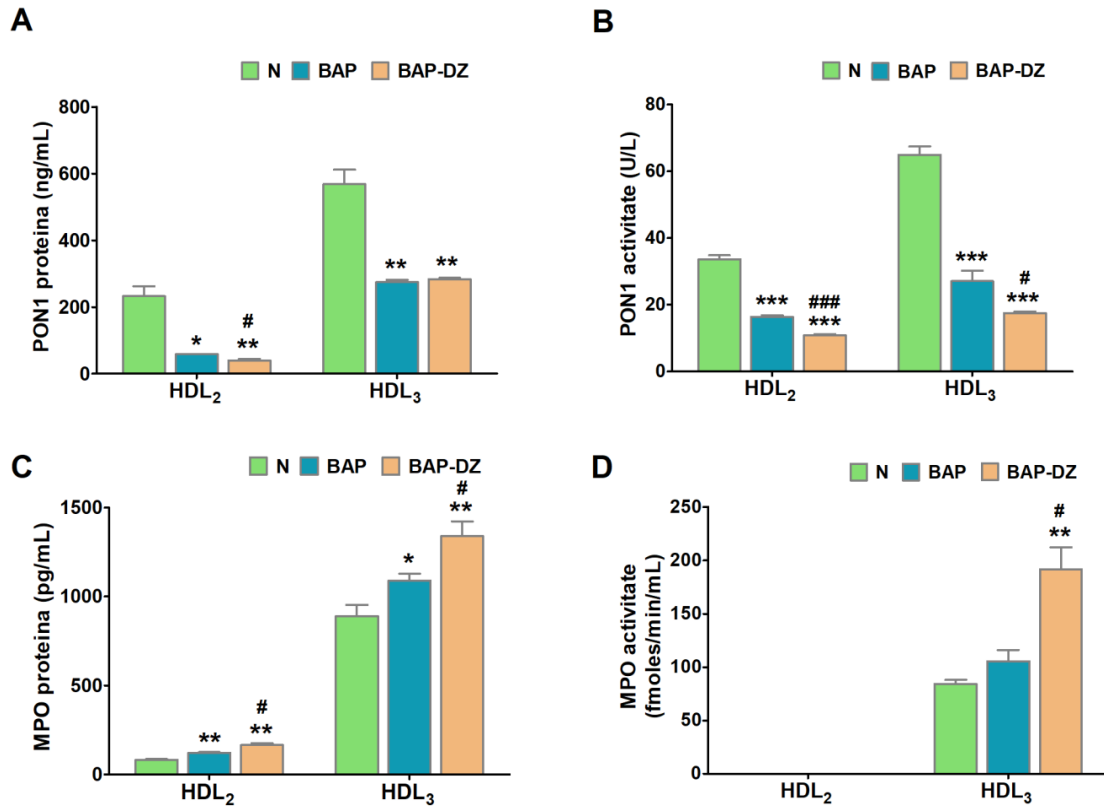


Figura 3. Nivelurile de proteină și activitate ale paraoxonazei 1 (PON1) și ale mieloperoxidazei (MPO) în subfracțiile de HDL. HDL₂ și HDL₃ izolate prin ultracentrifugare din plasma subiecților sănătoși (N) și a pacienților BAP cu și fără DZ (BAP-DZ/BAP) au fost caracterizate din punct de vedere al conținutului și activității PON1 și MPO: PON1 proteina (**A**) și activitate (**B**), MPO proteina (**C**) și activitate (**D**). Datele sunt exprimate ca medie ± SEM; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. N; #p < 0,05, ###p < 0,001 vs. BAP.

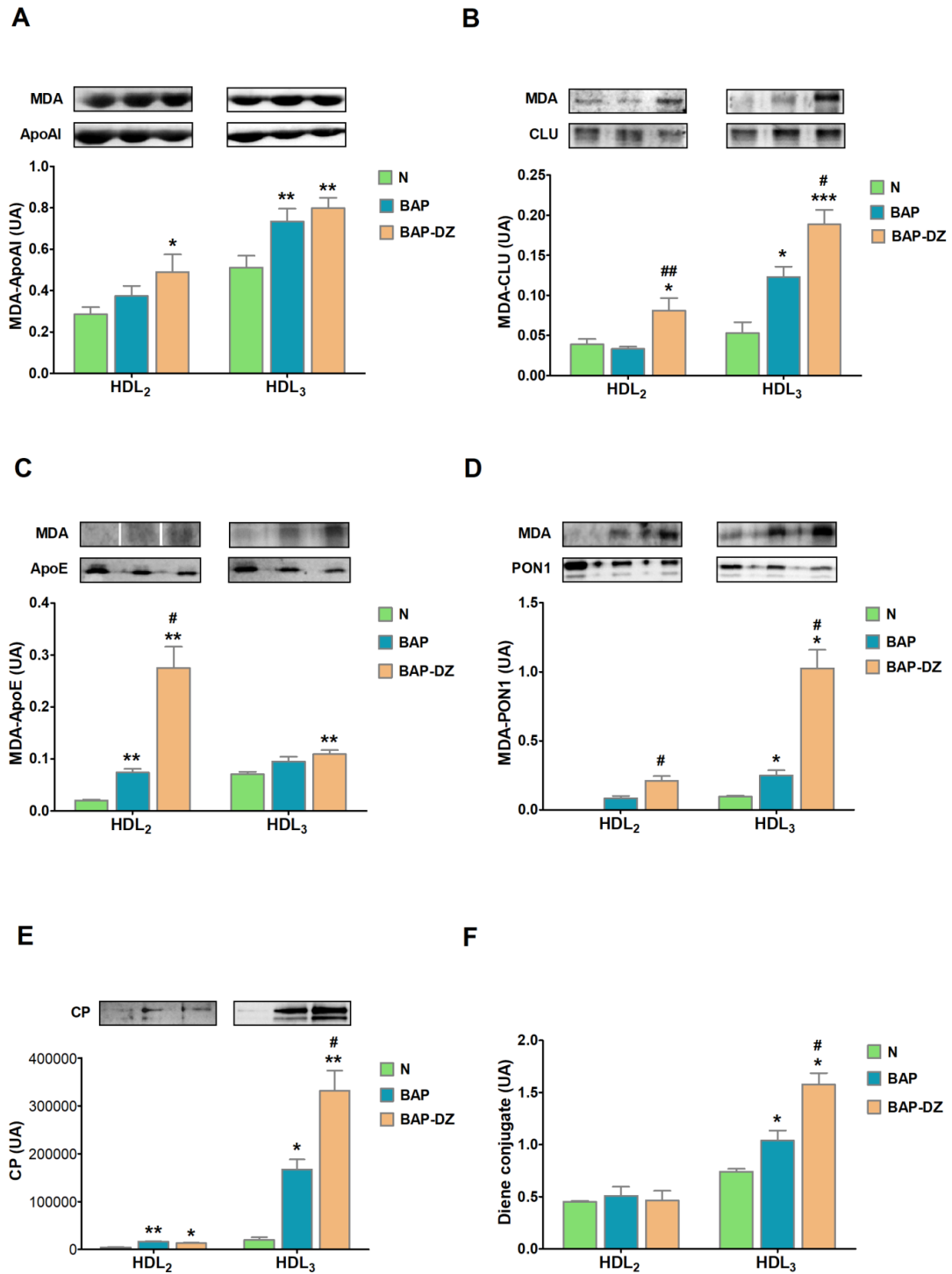


Figura 4. Parametrii de stres oxidativ în subfracțiile de HDL. HDL₂ și HDL₃ izolate prin ultracentrifugare din plasma subiecților sănătoși (N) și a pacienților BAP cu și fără DZ (BAP-DZ/BAP) au fost caracterizate din punct de vedere al prezenței markerilor de stres oxidativ: aducți malondialdehidă-apolipoprotein AI (MDA-ApoAI) (A), MDA-clusterina (MDA-CLU) (B), MDA-ApoE (C), MDA-paraoxonaza 1 (MDA-PON1) (D), ceruloplasmina (CP) (E) și diene conjugate (F). Datele sunt exprimate ca medie ± SEM; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. N; #p < 0,05, ##p < 0,01 vs. BAP.

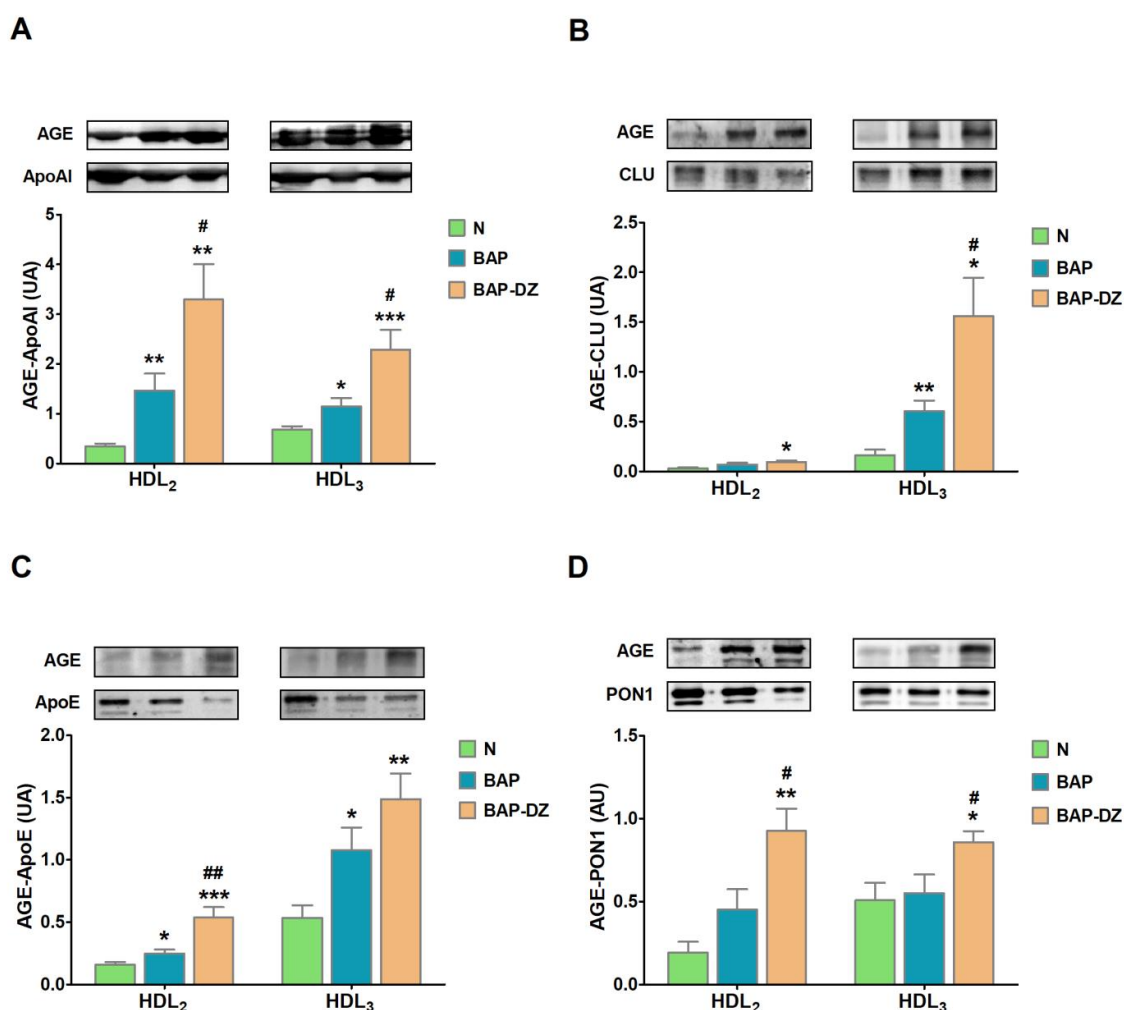


Figura 5. Producții finali de glicare avansată (AGE) formează aducți cu proteinele din subfracțiile de HDL. HDL₂ și HDL₃ izolate prin ultracentrifugare din plasma subiecților sănătoși (N) și a pacienților BAP cu și fără DZ (BAP-DZ/BAP) au fost caracterizate din punct de vedere al prezenței aducțiilor AGE-proteine: AGE-apolipoproteina AI (AGE-ApoAI) (A), AGE-clusterina (AGE-CLU) (B), AGE-ApoE (C) și AGE-paraoxonaza 1 (AGE-PON1) (C). Datele sunt exprimate ca medie ± SEM; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. N; #p < 0,05, ##p < 0,01 vs. BAP.

În prezentul studiu, arătăm pentru prima dată că subfracțiile de HDL de la pacienții cu BAP și cu DZ au o compoziție distinctă în comparație cu cele de la pacienții cu BAP fără DZ. Astfel, HDL₂ are niveluri mai scăzute de TC și PL în BAP-DZ față de BAP.

O altă noutate a studiului nostru este redistribuirea CLU și apoAII între subfracțiile de HDL în BAP-DZ în comparație cu pacienții cu BAP. Astfel, nivelul CLU este redus în

HDL₂ și crescute în HDL₃, în timp ce nivelul apoAII este crescut în HDL₂ și diminuat în HDL₃ (Maskanakis et al., 2018, Rodriguez-Rivera et al., 2021). Rezultatele noastre arată că, în condiții patologice pronunțate, cum ar fi diabetul, producția de CLU este mai mare la pacienții cu BAP-DZ comparativ cu cei cu BAP, afinitatea sa pentru HDL₃ fiind crescută în comparație cu HDL₂, în acord cu datele publicate anterior (Davidson et al., 2009).

Raportăm aici pentru prima dată că la pacienții cu BAP-DZ versus cei cu BAP, proteina PON1 scade în HDL₂, în timp ce activitatea sa scade în ambele subfracții de HDL, probabil datorită creșterii semnificative a nivelurilor de MPO care dislocuie și oxidează PON1 (în special în HDL₃), contribuind astfel la disfuncția HDL. Anterior, raportul dintre proteinele MPO și PON1 sau dintre activitățile lor au fost propuse ca markeri pentru funcționalitatea HDL (Arora et al., 2016).

Datele noastre arată pentru prima dată că, în condiții diabetice, atașarea CLU la HDL₃ crește, în ciuda diminuării PON1. În plus, CP pro-oxidantă atașată la HDL₃ este crescută considerabil în condițiile diabetice, contribuind astfel la disfuncția HDL, în acord cu rezultatele noastre anterioare (Carnuta et al., 2017).

Astfel, o altă noutate a rezultatelor noastre este că CLU și CP sunt atașate la HDL₃ mai mult la pacienții cu BAP-DZ decât la cei cu BAP, sugerând că în condiții diabetice coexistența lor în HDL₃ este favorizată. Acest dezechilibru între enzimele antioxidante și pro-oxidante asociate cu HDL, în favoarea celor din urmă, generează o creștere semnificativă a modificărilor oxidative ale apolipoproteinelor. Toate aceste modificări sunt reflectate de nivelurile crescute de diene conjugate, MDA- și AGE-apolipoproteine și -PON1, dezvăluind o alterare excesivă a calității HDL la pacienții cu BAP-DZ comparativ cu cei cu BAP. Dintre modificările care apar în componentele HDL în condiții patologice, modificarea MDA-HDL are impactul negativ cel mai puternic asupra RCT (Bornfeldt et al., 2021).

Subliniem rezultatele noi și foarte interesante obținute în studiul nostru și anume că dintre toate componentele HDL₂ și HDL₃ analizate, doar nivelurile CLU, activitățile specifice PON1 și MPO prezintă diferențe semnificative în plasma pacienților cu BAP-DZ față de cei cu BAP și prezintă o puternică asociere predictivă cu diabetul. Numărul mic de pacienți cu BAP-DZ și BAP reprezintă o limitare a studiului nostru; totuși am ajuns la semnificație statistică pentru parametrii propuși ca markeri pentru severitatea BAP.

În **concluzie**, creșterea nivelurilor CLU și a activității specifice MPO și diminuarea activității specifice PON1 în plasmă reflectă alterarea funcționalității HDL. Acestea ar putea fi translatate în laboratoare clinice și ar putea prezice severitatea BAP în stările

hiperglicemice. În plus față de markerii stabiliți măsurați în laboratoarele clinice, acești trei parametri ar putea fi considerați biomarkeri candidați pentru severitatea BAP și utilizați în viitor pentru o predicție mai bună și mai timpurie a evoluției bolii.

Într-un studiu paralel am căutat să identificăm potențialii miARN predictivi pentru apariția evenimentelor cardiovasculare postoperatorii la pacienții cu BAP, măsurând nivelurile plasmatiche ale miARN în plasmă și în placa aterosclerotică și am făcut corelații cu evenimentele cardiovasculare apărute pe parcursul unui an de la intervenția chirurgicală. Noile date (Figura 6) arată că spre deosebire de pacienții BAP fără EV, pacienții cu BAP cu EV prezintă:

1. o alterare a parametrilor asociați cu stresul oxidativ și inflamator, corelată cu o creștere semnificativă în plasmă a nivelurilor miR-142-3p și miR-223-3p;
2. creșteri semnificative ale expresiei miR-142-3p, miR-155-5p și miR-223-3p în placa aterosclerotică, care se corelează pozitiv cu nivelurile pri-miRNA asociate;
3. o scădere semnificativă a expresiei miR-92a în placă, în timp ce nivelul pri-miR-92a este crescut;
4. o asociere semnificativă între parametrii oxidativi și inflamatori, lipidele plasmatiche și nivelul plasmatic al miARN ;
6. nivelul plasmatic al miR-142-3p s-a dovedit a fi un factor predictiv independent pentru evenimentele cardiovasculare la pacienții cu BAP.

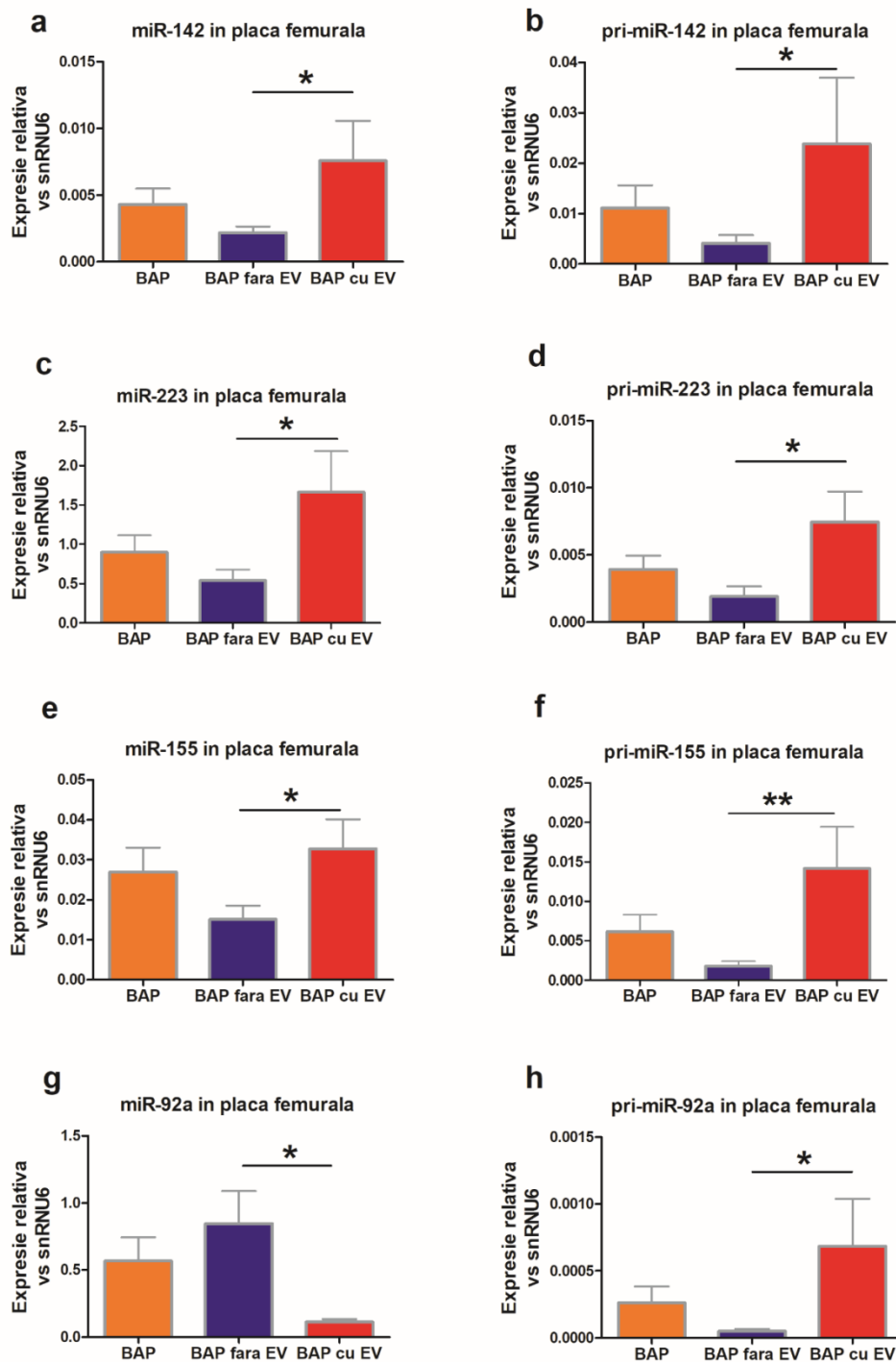


Figura 6. Nivelurile miARN și ale transcriptiilor primari (pri-miARN) în plăcile aterosclerotice din arterele femurale de la pacienți cu boala arterelor periferice (BAP). Nivelurile miR-142 (a), miR-223 (c), miR-155 (e), miR-92a (g), pri-miR-142 (b), pri-miR-223 (d), pri-miR-155 (f), și pri-miR-92a (h) în plăci aterosclerotice femurale de la pacienți BAP cu evenimente cardiovasculare (BAP cu EV) post-operator comparativ cu cei fără EV (BAP fără EV). Datele sunt ilustrate ca histograme cu bară de eroare (SEM). Legenda: * valori $p < 0,05$, ** valori $p < 0,01$ comparativ cu BAP fără EV.

Din cunoștințele noastre, prezentul studiu este primul care abordează predicția evoluției bolii utilizând analiza comparativă a nivelului plasmatic și din placa de aterom a miARN la pacienții cu BAP. Am dovedit pentru prima dată legătura dintre nivelul miARN din placa aterosclerotică și expresia pri-miARN în placă.

Predicția precoce și rapidă a evoluției BAP poate optimiza decizia clinică pentru ajustarea intervențiilor individuale în cazul tratamentului acestor pacienți. Practicând o medicină personalizată, miR-142 poate contribui la stratificarea riscului pacienților cu BAP prezicând apariția evenimentelor cardiovasculare post-operator. Aceste noi date cresc posibilitatea utilizării terapiei având ca țintă miARN (inhibiția miR-142 in vivo) pentru a completa tratamentul cu statine în boala aterosclerotică, prin modularea mecanismului legat de miARN.

Cel mai important și nou rezultat al studiului este evidențierea potențialului miR-142 ca factor predictiv independent pentru apariția postoperator a evenimentelor cardiovasculare la pacienții cu BAP.

În concluzie, am demonstrat că miR-142-3p, miR-155-5p, miR-223-3p și miR-92a-3p sunt produși în placa aterosclerotică după cum se constată prin expresia specifică a pri-miARN și din corelațiile lor pozitive cu componentele cheie ale complexului de procesare miARN (enzimele Dicer și Drosha). De asemenea, am arătat că expresia miR-142-3p, miR-155-5p și miR-223-3p din placa aterosclerotică este asociată cu evenimentele cardiovasculare postoperatorii la pacienții cu BAP și corelate cu factorii de risc pro-aterogeni: metabolici, oxidativi și proinflamatorii. În final, bazat pe datele obținute din modelarea regresiei statistice, propunem miR-142-3p ca biomarker independent pentru prezicerea evenimentelor cardiovasculare la pacienții BAP.

Concluzii generale

1. Pacienții cu SAC prezintă alterarea parametrilor plasmatici asociați cu stresul oxidativ (scăderea PON1, creșterea MPO și CP) și inflamator (creșterea IL-1 β și CRP) comparativ cu subiecții sănătoși.
2. Pacienții cu SAC având vârsta peste 65 de ani prezintă o creștere semnificativă a nivelurilor miR-223-3p atât în plasmă, cât și în placa de aterom carotidiană, comparativ cu pacienții cu SAC având vârsta sub 65 de ani.
3. Nivelul crescut de miR-223-3p în placa de aterom carotidiană la pacienții cu SAC cu vârsta peste 65 de ani este asociat cu o expresie crescută a pri-miR-223 din placa aterosclerotică.
4. Diabetul zaharat de tip II induce o alterare diferențiată a componentelor proteice ale subfracțiilor HDL₂ și HDL₃ în plasma pacienților cu BAP, după cum urmează:
 - HDL₂ prezintă o reducere atât a proteinei cât și a activității enzimatică a PON1, împreună cu scăderea apoAI și creșterea apoAII și apoCIII; nivelul proteinei MPO prezintă o creștere modestă.
 - HDL₃ are o activitate enzimatică a PON1 redusă, în paralel cu nivelurile crescute de MPO și CP, asociate cu nivelurile crescute de MDA- și AGE-PON1, MDA- și AGE-CLU și AGE-apoAI.
5. Modificarea concentrațiilor plasmatice ale unor proteine alterate în HDL, precum CLU, PON1 și MPO, ar putea fi considerate indicatori ai severității bolii la pacienții cu BAP.
6. MiR-142 are potențialul de a fi considerat un factor predictiv independent pentru apariția postoperatorie a evenimentelor cardiovasculare la pacienții cu BAP.
7. Din punctul de vedere al chirurgului vascular, accesul la măsurarea nivelului miARN la pacienții cu SAC ar permite indicarea de măsuri timpurii de evaluarea a stării pacienților prin monitorizare ecografică la termen mai scurt pentru descoperirea restenozei la pacienții cu SAC operați și aplicarea tratamentului corespunzător.
8. Compoziția și funcția HDL sunt modificate la pacienții cu BAP și într-un grad mai mare la pacienții BAP cu diabet zaharat de tip II. Nivelurile modificate ale CLU și ale activităților specifice ale PON1 și MPO sunt detectabile în plasma pacienților cu BAP. Întrucât izolarea și caracterizarea HDL este o procedură laborioasă, putem considera nivelurile plasmatice ale CLU, PON1 și MPO drept indicatori potențiali ai disfuncției HDL care pot fi utilizați pentru o mai bună stratificare a riscului la pacienții cu BAP.

Bibliografie

- ABOU-ZAMZAM, A. M., JR., GOMEZ, N. R., MOLKARA, A., BANTA, J. E., TERUYA, T. H., KILLEEN, J. D. & BIANCHI, C. 2007. A prospective analysis of critical limb ischemia: factors leading to major primary amputation versus revascularization. *Ann Vasc Surg*, 21, 458-63.
- ARORA, S., PATRA, S. K. & SAINI, R. 2016. HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease. *Clin Chim Acta*, 452, 66-81.
- AUTHORS/TASK FORCE, M., GUIDELINES, E. S. C. C. F. P. & SOCIETIES, E. S. C. N. C. 2019. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 290, 140-205.
- BORNFELDT, K. E., LINTON, M. F., FISHER, E. A. & GUYTON, J. R. 2021. JCL roundtable: Lipids and inflammation in atherosclerosis. *J Clin Lipidol*, 15, 3-17.
- CAMONT, L., CHAPMAN, M. J. & KONTUSH, A. 2011. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*, 17, 594-603.
- CARNUTA, M. G., STANCU, C. S., TOMA, L., SANDA, G. M., NICULESCU, L. S., DELEANU, M., POPESCU, A. C., POPESCU, M. R., VLAD, A., DIMULESCU, D. R., SIMIONESCU, M. & SIMA, A. V. 2017. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. *Sci Rep*, 7, 7295.
- DAVIDSON, W. S., SILVA, R. A., CHANTEPIE, S., LAGOR, W. R., CHAPMAN, M. J. & KONTUSH, A. 2009. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 870-6.
- DEVAUX, Y., VAUSORT, M., GORETTI, E., NAZAROV, P. V., AZUAJE, F., GILSON, G., CORSTEN, M. F., SCHROEN, B., LAIR, M. L., HEYMANS, S. & WAGNER, D. R. 2012. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 58, 559-67.
- EREN, E., YILMAZ, N. & AYDIN, O. 2012. High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. *Open Biochem J*, 6, 78-93.

- LARACH, D. B., DEGOMA, E. M. & RADER, D. J. 2012. Targeting high density lipoproteins in the prevention of cardiovascular disease? *Curr Cardiol Rep*, 14, 684-91.
- LI, Z., YU, F., ZHOU, X., ZENG, S., ZHAN, Q., YUAN, M., YANG, Q., LIU, Y. & XIA, J. 2017. Promoter hypomethylation of microRNA223 gene is associated with atherosclerotic cerebral infarction. *Atherosclerosis*, 263, 237-243.
- LUSCHER, T. F., LANDMESSER, U., VON ECKARDSTEIN, A. & FOGELMAN, A. M. 2014. High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circ Res*, 114, 171-82.
- MASKANAKIS, A., PATELIS, N., KARAOLANIS, G., DAVAKIS, S., SCHIZAS, D., PERREA, D., KLONARIS, C., GEORGOPOULOS, S., LIAKAKOS, T. & BAKOYIANNIS, C. 2018. Apolipoprotein J as a predictive biomarker for restenosis after carotid endarterectomy: a retrospective study. *Acta Pharmacol Sin*, 39, 1237-1242.
- MUSUNURU, K. 2010. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids*, 45, 907-14.
- PARAHULEVA, M. S., LIPPS, C., PARVIZ, B., HOLSCHEMANN, H., SCHIEFFER, B., SCHULZ, R. & EULER, G. 2018. MicroRNA expression profile of human advanced coronary atherosclerotic plaques. *Sci Rep*, 8, 7823.
- PARHOFER, K. G. 2015. Increasing HDL-cholesterol and prevention of atherosclerosis: A critical perspective. *Atheroscler Suppl*, 18, 109-11.
- RODRIGUEZ-RIVERA, C., GARCIA, M. M., MOLINA-ALVAREZ, M., GONZALEZ-MARTIN, C. & GOICOECHEA, C. 2021. Clusterin: Always protecting. Synthesis, function and potential issues. *Biomed Pharmacother*, 134, 111174.
- RUPAIMOOLE, R. & SLACK, F. J. 2017. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 16, 203-222.
- SHEN, Y., DING, F. H., SUN, J. T., PU, L. J., ZHANG, R. Y., ZHANG, Q., CHEN, Q. J., SHEN, W. F. & LU, L. 2015. Association of elevated apoA-I glycation and reduced HDL-associated paraoxonase1, 3 activity, and their interaction with angiographic severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 14, 52.
- TAN, Y., LIU, T. R., HU, S. W., TIAN, D., LI, C., ZHONG, J. K., SUN, H. G., LUO, T. T., LAI, W. Y. & GUO, Z.-G. 2014. Acute Coronary Syndrome Remodels the

Protein Cargo and Functions of High-Density Lipoprotein Subfractions. *PLOS ONE*, 9, e94264.

VARIJI, A., SHOKRI, Y., FALLAHPOUR, S., ZARGARI, M., BAGHERI, B., ABEDIANKENARI, S., ALIZADEH, A. & MAHROOZ, A. 2019. The combined utility of myeloperoxidase (MPO) and paraoxonase 1 (PON1) as two important HDL-associated enzymes in coronary artery disease: Which has a stronger predictive role? *Atherosclerosis*, 280, 7-13.

VOGIATZI, G., OIKONOMOU, E., DEFTEREOS, S., SIASOS, G. & TOUSOULIS, D. 2018. Peripheral artery disease: a micro-RNA-related condition? *Curr Opin Pharmacol*, 39, 105-112.

YAN, L., LIANG, M., HOU, X., ZHANG, Y., ZHANG, H., GUO, Z., JINYU, J., FENG, Z. & MEI, Z. 2019. The role of microRNA-16 in the pathogenesis of autoimmune diseases: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*, 112, 108583.

LUCRĂRI PUBLICATE PE DURATA PROGRAMULUI DOCTORAL

Lucrări publicate în reviste indexate ISI – autor principal

Barbalata T, **Moraru OE**, Stancu CS, Devaux Y, Simionescu M, Sima AV, Niculescu LS. Increased miR-142 Levels in Plasma and Atherosclerotic Plaques from Peripheral Artery Disease Patients with Post-Surgery Cardiovascular Events. *Int J Mol Sci.* **2020** Dec 16;21(24):9600. doi: 10.3390/ijms21249600 (IF 5.923, Q1).

Lucrări publicate în reviste indexate ISI –co-autor

Barbalata T, **Moraru OE**, Stancu CS, Sima AV, Niculescu LS. MiR-223-3p levels in the plasma and atherosclerotic plaques are increased in aged patients with carotid artery stenosis; association with HDL-related proteins. *Mol Biol Rep.* **2021** (sub tipar). doi: 10.1007/s11033-021-06636-y (IF 2.316, Q3).

Sanda GM, Toma L, Barbalata T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Sima AV, Stancu CS. Clusterin, paraoxonase 1, and myeloperoxidase alterations induce high-density lipoproteins dysfunction and contribute to peripheral artery disease; aggravation by type 2 diabetes mellitus. *Biofactors.* **2021** (sub tipar) doi: 10.1002/biof.1800 (IF 6.113, Q1).

Comunicări la manifestări științifice internaționale – co-autor

Barbălată T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Stancu CS, Simionescu M, Sima AV. A panel of circulating miRNAs could predict age-related post-endarterectomy cardiovascular events in carotid artery stenosis patients. The 4th MC and WG Meeting of COST Action CA17129 “*Catalysing transcriptomics research in cardiovascular disease*” (CardioRNA), Maastricht, The Netherlands, 12-14 February **2020**.

Barbalata T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Stancu CS, Simionescu M, Sima AV. A panel of miRNAs and inflammatory markers are associated with hyperglycemia in peripheral artery diseases patients. CardioRNA Live! Meeting of CardioRNA COST Action CA17129 “*Catalysing transcriptomics research in cardiovascular disease*”, 7-10 September **2020**.

Barbalata T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Stancu CS, Simionescu M, Sima AV. A panel of miRNAs are associated with post-endarterectomy vascular events in carotid artery stenosis patients. *Science at a Glance Session (SaaG) la 88th European Atherosclerosis Congress*, Online edition, 4-7 October 2020, *Atherosclerosis*, 315: e77, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.240, **2020**.

Sanda GM, Toma L, Barbălată T, **Moraru OE**, Niculescu LS, Sima AV, Stancu CS. Quantitative and qualitative alterations of plasma clusterin, paraoxonase 1, myeloperoxidase and HDL's apolipoproteins are aggravated by hyperglycemia in peripheral artery disease patients with diabetes. ePoster la *89th European Atherosclerosis Society Congress Atherosclerosis, Virtual congress*, 30 May – 2 June **2021**.