

Streszczenie

Choroby sercowo-naczyniowe (CVD) pozostają główną przyczyną zgonów na świecie, a ich liczba rośnie każdego roku, osiągając poziom pandemii. Pomimo postępów w zrozumieniu czynników ryzyka, działań profilaktycznych i leczeniu, prognozuje się dalszy wzrost zachorowalności i śmiertelności z racji starzejącej się populacji i zmieniającego się stylu życia. Miażdżycza odgrywa kluczową rolę w tym zjawisku jako czynnik bezpośrednio związany z zawałami serca i udarami. Do tej pory nie opracowano skutecznego leku na miażdżycę, natomiast strategie prewencyjne i spowalniające rozwój mogą znacząco zmniejszyć jej wpływ i ryzyko powikłań. Głębsze zrozumienie mechanizmów tego złożonego procesu jest kluczowe dla identyfikacji nowych celów terapeutycznych i opracowywania bardziej precyzyjnych metod leczenia. Obniżenie poziomu cholesterolu jest obecnie najczęściej stosowanym podejściem. Jednak monoterapia statynami jest niespecyficzna i może być niewystarczająca ze względu na skutki uboczne lub niedostateczną ochronę, a także zaawansowany stan chorobowy. Dlatego, oprócz powszechnie stosowanej rosuwastatyny, wprowadza się leki nowszej generacji takie jak inhibitory PCSK9, inhibitory aktywacji i agregacji płytek krwi, inhibitory degranulacji neutrofilów czy zamienniki statyn o mniejszej ilości skutków ubocznych. Jednak potrzeba celowanych i bardziej skutecznych terapii jest nadal kluczowym priorytetem w walce z CVD.

Poza wysokim poziomem cholesterolu, stres oksydacyjny i dysfunkcja komórek znacząco przyczyniają się do rozwoju miażdżycy i stanowią potencjalne cele interwencji. Zaburzenia te związane są z aktywnością NRF2, który jest czynnikiem transkrypcyjnym dla szeregu genów odpowiedzialnych za ochronę komórki przed stresem oksydacyjnym i innymi czynnikami stresogennymi. Co ciekawe, aktywność NRF2 spada z wiekiem i różni się w zależności od rodzaju komórek. Do tej pory doniesienia na temat roli NRF2 w miażdżycy nie dały jasnej odpowiedzi, co do jego pro- lub przeciwmiażdżycowego działania.

W przeciwieństwie do wcześniejszych badań wykorzystujących myszy z konstytutywnym nokautem genu *Nrf2*, skupiliśmy się na roli *Nrf2* w komórkach śródbłonna w miażdżycy, używając myszy z nieaktywnym transkrypcyjnie *Nrf2* w komórkach z ekspresją kadheryny 5 (*Cdh5*). U tych myszy, tu nazywanych *Nrf2*^{Cdh5tKO}, wycięty został w komórkach śródbłonna egzon 5 genu *Nrf2*, kluczowy dla aktywności transkrypcyjnej. Pojedyncza iniekcja wektorami uzyskanymi z wirusów towarzyszących adenowirusom serotypu 8 (AAV8) kodującymi białko *Pcsk9* pod kontrolą wątrobowego promotora HCRapoE/hAAT oraz dieta wysokotłuszczowa

pozwoły na indukcję hipercholesterolemii i w konsekwencji rozwój miażdżycy u myszy. Analiza wielkości blaszek miażdżycowych w korzeniu aorty wykazała większą powierzchnię blaszek u myszy $Nrf2^{Cdh5^{KO}}$ w porównaniu do kontrolnych myszy $Nrf2^{flox/flox}$ z zachowaną aktywnością Nrf2.

Nie pozbawionym znaczenia aspektem naszego modelu mysiego jest niepożądana aktywność rekombinazy Cre w komórkach pochodzenia hematopoetycznego, w tym w monocytach i makrofagach. Nawet 50% monocytów i makrofagów może wykazywać zmniejszoną aktywność transkrypcyjną Nrf2, co potwierdziliśmy w makrofagach różnicowanych ze szpiku i komórkach Kupffera pozyskanych z myszy $Nrf2^{Cdh5^{KO}}$. Zrodziło się więc pytanie o udział monocytów i makrofagów w nasileniu miażdżycowego fenotypu w naszym modelu. Przeprowadziliśmy zatem eksperyment z udziałem myszy z nokautem transkrypcyjnym Nrf2 w komórkach z ekspresją lizozymu M ($Nrf2^{LysM^{KO}}$), tj. monocytach i makrofagach. W tym wypadku, rozmiar blaszek miażdżycowych był porównywalny między myszami $Nrf2^{LysM^{KO}}$ a ich kontrolami ($Nrf2^{flox/flox}$). Może to wskazywać na większy udział śródbłonkowej, a nie monocytarnej i makrofagowej, aktywności Nrf2 dla wzrostu blaszek miażdżycowych.

Następnie podjęliśmy próbę identyfikacji molekularnych mechanizmów zaangażowanych w bardziej zaawansowany fenotyp miażdżycowy u myszy $Nrf2^{Cdh5^{KO}}$. Przeprowadziliśmy sekwencjonowanie transkryptomu na poziomie pojedynczej komórki (scRNA-seq) z materiału wyizolowanego z aort kontrolnych i miażdżycowych myszy $Nrf2^{Cdh5^{KO}}$ oraz $Nrf2^{flox/flox}$. Zidentyfikowaliśmy w ten sposób 12 populacji obejmujących większość komórek ściany aorty. Zmiany transkryptomu w miażdżycy (porównanie: aorty miażdżycowe $Nrf2^{flox/flox}$ vs kontrolne $Nrf2^{flox/flox}$) związane były z aktywacją przydanki oraz wzmożoną sygnalizacją między komórkami śródbłonka, fibroblastami i miofibroblastami. To w pewnym sensie potwierdza wcześniejsze doniesienia o roli przydanki jako warstwy najwcześniej reagującej na stres i uszkodzenia. Co więcej, kluczowa rola przydanki w miażdżycy sprowadza się do zwiększonej proliferacji, produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), prozapalnych cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych, MMP, TIMP i czynników wzrostu. Zaangażowane są w to głównie fibroblasty i miofibroblasty, które w naszych badaniach wykazały zmiany w takich ścieżkach sygnałowych, jak regulacja migracji i proliferacji komórek, angiogeneza, gojenie ran, organizacja ECM.

Liczne badania udokumentowały związany z wiekiem spadek ekspresji i aktywności Nrf2, co może sugerować jego rolę w powodowaniu dysfunkcji i starzenia się komórek. Analiza danych transkryptomicznych dla śródbłonek zwierząt Nrf2^{Cdh5tKO} oraz Nrf2^{fllox/fllox} w warunkach podstawowych wykazała zmiany ekspresji genów związanych z fałdowaniem białek, procesami apoptotycznymi, organizacją cytoszkieletu aktywnego i regulacją cyklu komórkowego. Może to wskazywać na zatrzymanie cyklu komórkowego lub uruchomienie mechanizmów związanych ze śmiercią komórkową w śródbłonkach z aort myszy Nrf2^{Cdh5tKO}. Nie zaobserwowaliśmy jednak zmian w ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym, co spowodowane może być tym, że próbki te pochodziły z myszy Nrf2^{Cdh5tKO} nie ekspozycjonowanych na stres, podczas gdy aktywność Nrf2 zależy w głównej mierze od warunków stresowych.

Kolejnym etapem była analiza transkryptomu komórek śródbłonka myszy Nrf2^{Cdh5tKO} ekspozycjonowanych na czynniki proaterogenne. Niedostateczna aktywność Nrf2 w śródbłonku w miażdżycy wpłynęła na ekspresję genów o proaterogennej aktywności zaangażowanych w odpowiedź na naprężenia ścinające, wiązanie do ognisk adhezyjnych, transmigrację leukocytów przez śródbłonek, endocytozę, aktywację płytek krwi. Ponadto, w miażdżycowych śródbłonkach myszy Nrf2^{Cdh5tKO} zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji genów zaangażowanych w prozapalne szlaki sygnałowe, takie jak TNF, NF-kappa B, Rap1, HIF-1. Podkreśla to kluczową rolę Nrf2 w modulowaniu stanu zapalnego, który w istotny sposób przyczynia się do rozwoju i niestabilności blaszki miażdżycowej.

Komunikacja międzykomórkowa jest kluczowa dla utrzymania homeostazy w obrębie ściany aorty, a wszelkie zaburzenia mogą prowadzić do rozwoju blaszki miażdżycowej przez wpływ na fenotyp komórek, migrację, proliferację, odpowiedź prozapalną i organizację ECM. Analiza CellChat dla aort z miażdżycowych myszy Nrf2^{Cdh5tKO} i Nrf2^{fllox/fllox} wykazała spadek sygnalizacji między komórkami śródbłonka, fibroblastami i miofibroblastami. Co więcej, nasza analiza ujawniła znaczące zmiany oddziaływań ligand-receptor dla komórek śródbłonka, monocytów i makrofagów w warunkach miażdżycowych, takie jak podwyższenie ekspresji VCAM1-(ITGA4+ITGB1) i SELPG-SELP, co może promować infiltrację komórek prozapalnych w aortach Nrf2^{Cdh5tKO}. Z kolei obniżenie interakcji pomiędzy THBS1-CD47 i THBS1-CD36 może powodować zmniejszenie produkcji NO i hamować angiogenezę.

Jak wcześniej wspomniano, ponad 50% komórek układu odpornościowego u myszy Nrf2^{Cdh5tKO} mogło utracić aktywność transkrypcyjną Nrf2. Postanowiliśmy wykorzystać ten fakt i

odpowiedzieć na pytanie jak częściowa utrata aktywności Nrf2 w fagocytach jednojądrzastych będzie wpływać na ich fenotyp w warunkach miażdżycowych. W oparciu o wyniki naszej analizy scRNA-seq w mysich aortach wyodrębniliśmy aż 9 podtypów komórek w obrębie populacji fagocytów jednojądrzastych. Do dalszych analiz wybraliśmy trzy najbardziej liczne subpopulacje, których rola w miażdżycy jest dobrze udokumentowana – makrofagi tkankowe Lyve+, makrofagi prozapalne oraz monocyty.

Porównanie tych miażdżycowych subpopulacji pozwoliło wykazać, że monocyty pozbawione aktywności Nrf2 posiadają wyższą ekspresję chemoatraktantów, niektórych metaloproteinaz, ale jednocześnie także inhibitorów metaloproteinaz, co może wskazywać na rolę Nrf2 w remodelingu ECM i infiltracji monocytów. Zmiany w obrębie makrofagów tkankowych Lyve1+ z obniżoną aktywnością Nrf2 wykazały, że szlak RIG-I jest silnie indukowany. RIG-I aktywuje IRF i NF- κ B, indukując geny stymulowane interferonem (ISG) i cytokiny prozapalne, często regulowane przez Nrf2. Wykazaliśmy ponadto, że miażdżycowe makrofagi tkankowe Lyve1+ z myszy Nrf2^{Cdh5tKO} wykazują obniżoną ekspresję genu ferroportyny *Slc40a1*, co może sprzyjać programowanej śmierci tych komórek w drodze ferroptozy.

Prozapalne makrofagi, będące główną populacją wywołującą stan zapalny i indukującą progresję blaszki miażdżycowej, uważa się za komórki dzielące się. Dlatego znaczące zmiany ekspresji genów w szlaku replikacji DNA w prozapalnych makrofagach miażdżycowych Nrf2^{Cdh5tKO} było dość nietypową obserwacją. Podwyższona ekspresja genów *Atr* i *Apex1*, sugeruje stres oksydacyjny i uszkodzenia DNA związane z niedoborem Nrf2. Ponadto, w prozapalnych makrofagach miażdżycowych Nrf2^{Cdh5tKO}, zaobserwowaliśmy podwyższoną ekspresję genów rodziny CLR, zaangażowanych w rozpoznawanie lipidów i endocytozę. Dodatkowo, geny związane z autofagią i ferroptozą były ekspresjonowane na niższym poziomie. Zatem, niedobór Nrf2 w miażdżycowych prozapalnych makrofagach zmienia ekspresję genów związanych z replikacją i naprawą DNA, rozpoznawaniem lipidów oraz szlakami śmierci komórkowej, wpływając na ich aktywację, zdolność do fagocytozy i przeżywalność.

Starzenie się komórek, zwłaszcza komórek śródbłonna, jest uważane za istotny czynnik przyczyniający się do miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych. Komórki starzejące się gromadzą się z wiekiem i w chorobach związanych z wiekiem, w wyniku stresu oksydacyjnego, często będącego efektem obniżonej aktywności Nrf2. W ramach prowadzonych badań

opracowaliśmy model komórek śródbłonka aorty ludzkiej (HAEC) poddanych stresowi oksydacyjnemu (traktowanie H_2O_2) w warunkach *in vitro*. Za pomocą szeregu biochemicznych i molekularnych markerów starzenia potwierdziliśmy ich senescentny fenotyp. Analiza profilu proteomicznego senescentnych HAEC wykazała, że białka o zmienionej ekspresji związane są ze szlakiem p53, szlakami replikacji DNA, metabolizmem, interakcją ECM-receptor i adhezją komórkową wskazując na utratę homeostazy oksydacyjnej, funkcji śródbłonka i zatrzymanie cyklu komórkowego.

Fenotyp wydzielniczy komórek senescentnych (SASP) to nieodłączny element starzenia. Postanowiliśmy szerzej zbadać parakryny wpływ SASP na inne komórki występujące w ścianie aorty, a mianowicie fibroblasty, będące dominującą populacją w obrębie przydanki. Analiza proteomiczna ludzkich fibroblastów uzyskanych z przydanki (hAdv) hodowanych w obecności pożywki znad senescentnych HAEC pokazała zmiany w poziomie białek związanych z mitofagią i ferroptozą, a także z wychwytem i metabolizmem lipidów.

Co ciekawe, białkiem o najbardziej zmienionej ekspresji w senescentnych HAEC okazał się czynnik wzrostu i różnicowania-15 (GDF-15) - cytokina wydzielnicza, która jest biomarkerem chorób sercowo-naczyniowych. Biorąc pod uwagę wcześniejsze doniesienia na temat istotnej roli przydanki w chorobach naczyniowych, potraktowaliśmy komórki hAdv rekombinowanym GDF-15. Stwierdziliśmy, że ten ważny składnik SASP, podobnie jak pożywka znad senescentnych HAEC, wpływa na niektóre kluczowe elementy związane z ferroptozą w komórkach hAdv. Stymulacja hAdv GDF-15 nie miała wpływu na indukowaną erastyną śmierć komórek. Jednakże GDF-15 znacząco zmniejszał indukowany erastyną poziom reaktywnych form tlenu i peroksydację lipidów w warunkach podstawowych, co sugeruje, że GDF-15 może aktywować mechanizmy antyoksydacyjne w fibroblastach przydanki. Z drugiej strony, wyciszenie endogennego GDF-15 w hAdv zmniejszało peroksydację lipidów i poprawiało przeżywalność komórek w obecności erastyny.

Doniesienia na temat roli GDF-15 w biologii naczyniowej są niejednokrotnie sprzeczne, co prowadzi do wniosku, że rola wspomnianej cytokiny jest skomplikowana i zależy od konkretnego typu komórki, stadium choroby i mikrośrodowiska tkanki. Do tej pory, biologiczne efekty GDF-15 były badane głównie przy użyciu modeli 2D, które oferują znacznie mniej dokładne odwzorowanie warunków fizjologicznych w porównaniu z modelami 3D. Opracowaliśmy zatem trójwymiarowy model odwzorowujący mikrośrodowisko przydanki i

zbadaliśmy rolę GDF-15 w aktywacji fibroblastów i w odpowiedzi angiogennej komórek śródbłonna. Zaobserwowaliśmy, że GDF-15 razem z czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), ale nie osobno, wzmacnia potencjał angiogenny komórek śródbłonna. Co ciekawe, hodowla komórek śródbłonna z hAdv pre-stymulowanymi GDF-15 wykazywała odwrotną tendencję – potencjał angiogenny był obniżony. Dodatkowo, w hodowli 3D komórki hAdv po stymulacji GDF-15 miały zmienioną morfologię wskazującą na niższą aktywność, a ekspresja genów związanych aktywacją do miofibroblastów była obniżona.

Podsumowując, niniejsza praca dostarcza nowych informacji na temat roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w rozwoju miażdżycy, homeostazie ściany naczyniowej i oddziaływaniach międzykomórkowych. Ponadto, zawarte w pracy wyniki dostarczają nowych informacji nt. roli związanego z senescencją białka GDF-15 na komórki przydanki naczyń. Wpływ tych dwóch czynników na ścianę naczyniową wydaje się w dużym stopniu zależeć od typu komórek, co należy wziąć pod uwagę przy opracowywaniu bardziej skutecznych i ukierunkowanych terapii.