

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Rafała Badacza pt.: „Ocena krążenia mózgowego i morfologii zmiany miażdżycowej u chorych ze stabilnym przebiegiem zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej w porównaniu z chorymi z niedawno przeżytym udarem mózgu”

Wstęp

Udar niedokrwienny mózgu (IS) w krajach wysoko rozwiniętych jest trzecią co do częstości przyczyną śmierci oraz jedną z głównych przyczyn chorobowości i długotrwałej niepełnosprawności. U jednej trzeciej chorych spowodowany jest zmianami w przedczaszkowych odcinkach tętnic szyjnych.

Patomechanizm IS spowodowanego zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej (ICAS) jest dwójaki. W częstszym mechanizmie, niedokrwienie mózgu jest skutkiem oderwania się materiału zatorowego z powierzchni owrzodzonej blaszki miażdżycowej oraz embolizacji tętnicy mózgowej. W tym mechanizmie znaczącą rolę przypisuje się lokalnym i systemowym procesom zapalnym, które prowadzą do zakrzepu na blaszce i/lub embolizacji. W drugim mechanizmie, spadek przepływu krwi wywołany zwężeniem powoduje hypoperfuzję struktur mózgowych i może doprowadzić do ich martwicy.

W warunkach in vivo, ocena składu histopatologicznego blaszki miażdżycowej jest niemożliwa, stąd poszukuje się biomarkerów, które umożliwiłyby identyfikację pacjentów zagrożonych pęknięciem blaszki miażdżycowej, a więc narażonych na IS.

Obecnie zwraca się uwagę na znaczenie chemokin w początkowych etapach rozwoju blaszki miażdżycowej. Jest to grupa cytokin, która pełni kluczową rolę w mobilizacji limfocytów i makrofagów oraz ich chemotaksji do tworzącej się blaszki miażdżycowej, ze szczególnym uwzględnieniem CCL5/RANTES (ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), której rolą jest przyspieszenie migracji komórek zapalnych do błony wewnętrznej naczynia, jak również MMP-9, będącej metaloproteinazą, odpowiadającą za proces degradacji substancji międzykomórkowej, prowadzący do pęknięcia blaszki miażdżycowej i utworzenia materiału trombotycznego na jej powierzchni. Ponadto, obiecującymi biomarkerami wydają się cząstki mikroRNA - niekodujące cząstki RNA, odpowiadające za regulację ekspresji genów poprzez degradację mRNA oraz hamowanie procesu translacji.

Niezależnie od parametrów laboratoryjnych, właściwa wizualizacja blaszki miażdżycowej w badaniach obrazowych, takich jak ultrasonografia dopplerowska (DUS), tomografia komputerowa (CT) czy rezonans magnetyczny (MRI) pozwala identyfikować zmiany miażdżycowe wysokiego ryzyka wystąpienia IS, co dodatkowo ułatwia podjęcie decyzji odnośnie rewaskularyzacji ICAS.

Zmniejszenie przepływu mózgowego wynikające z progresji ICAS, a także mikroembolizacja, mogą powodować nie tylko zaburzenia motoryczno - sensoryczne, ale również zaburzenia funkcji kognitywnych, prowadząc do demencji. Postępowanie rewaskularyzacyjne ma na celu zapobieganie IS z jednej strony, ale również ewentualną prewencję pogarszania się funkcji poznawczych u chorych.

Biorąc pod uwagę, że miażdżyca jest procesem ogólnoustrojowym o podłożu zapalnym, kwestią dyskusyjną jest ewentualny wpływ destabilizacji blaszki miażdżycowej w zakresie tętnicy szyjnej na występowanie objawów niedokrwienia w innych obszarach tętnicznych, wynikający z aktywności cytokin i czynników prozakrzepowych w obserwacji odległej. Współistnienie zmian miażdżycowych w wielu obszarach tętnicznych pogarsza rokowanie pacjentów i jest wyzwaniem dla lekarzy zarówno w diagnostyce, jak i w leczeniu interwencyjnym.

W chwili obecnej brakuje testów laboratoryjnych, o wystarczającej czułości i swoistości, które mogłyby stanowić markery diagnostyczne lub prognostyczne dla zdarzeń sercowo-naczyniowych w obserwacji odległej. Identyfikacja osoczowych cytokin prozapalnych oraz mikroRNA o znaczeniu prognostycznym, poza znaczeniem praktycznym, w istotnym stopniu mogłaby się przyczynić do zrozumienia mechanizmów prowadzących do niedokrwienia w przebiegu procesu zapalno-zakrzepowego, jakim jest miażdżyca.

Cele pracy

Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie, czy istnieje związek pomiędzy morfologią blaszki miażdżycowej w tętnicy szyjnej wewnętrznej a: występowaniem objawów neurologicznych związanych z ICAS, wynikami testów kognitywnych, perfuzją mózgową, stężeniem osoczowych cytokin zapalnych i mikroRNA. Ponadto, podjęto próbę identyfikacji czynników związanych z wystąpieniem niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych (MACCE), tj. zgonu sercowo-naczyniowego, udaru mózgu, zawału serca w obserwacji odległej.

Celami szczegółowymi pracy były:

1. Ocena morfologii blaszki miażdżycowej w badaniu ultrasonograficznym z uwzględnieniem cech „blaszki wysokiego ryzyka” u pacjentów z bezobjawowym przebiegiem zwężenia tętnicy szyjnej w porównaniu z pacjentami po świeżo przeżytym IS lub TIA.
2. Ocena osoczowego stężenia cytokin zapalnych (CCL5/RANTES, MMP-9, IL-6, TGFβ, CXCL16, FASL) u pacjentów z objawowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej,

w zależności od morfologii blaszki miażdżycowej, oraz ich związku z wystąpieniem MACCE w obserwacji odległej.

3. Analiza krążących cząstek mikroRNA u pacjentów z objawowym i bezobjawowym przebiegiem ICAS, oraz próba oceny związku mikroRNA z wystąpieniem MACCE w obserwacji odległej.
4. Próba identyfikacji chorych z wysokim ryzykiem IS, w oparciu o czynniki kliniczne, biomarkery i morfologię blaszki miażdżycowej.
5. Analiza ukrwienia mózgowia u pacjentów przed i po zabiegu rewaskularyzacyjnym ICAS przy zastosowaniu obrazowania perfuzyjnego i dyfuzyjnego rezonansu magnetycznego.
6. Porównanie przepływu w tętnicach koła Willisa oraz występowania krążenia obocznego przed i po zabiegu rewaskularyzacji ICAS oraz wpływu zabiegu rewaskularyzacji na funkcje kognitywne.

Material i metodyka

Badanie zrealizowano w Klinice Kardiologii Interwencyjnej (Instytut Kardiologii UJ CM), w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II.

W ramach pracy doktorskiej do badania włączono w sumie 159 pacjentów z istotnym ICAS (redukcja światła tętnicy o co najmniej 50%), przyjętych celem rewaskularyzacji zwężonej tętnicy w ramach prewencji udaru mózgu. Chorzy włączani do badania zostali podzieleni na dwie grupy.

Do grupy pierwszej włączeni zostali chorzy z dotychczas neurologicznie bezobjawowym przebiegiem ICAS, bez wcześniejszego IS lub TIA w wywiadzie. Do grupy drugiej włączono pacjentów po przebytych incydencie neurologicznym: IS lub TIA w czasie ostatnich 6 miesięcy przed hospitalizacją.

Kryterium włączenia do badania była obecność krytycznego ICAS, zakwalifikowanego do rewaskularyzacji. Kryteria wyłączenia z badania obejmowały: niedrożność ICA, migotanie przedsionków lub inne znane przyczyny IS lub TIA (np. koagulopatie), niestabilność hemodynamiczną, przewlekłą niewydolność serca w klasie NYHA III lub IV, ostry lub przewlekły stan zapalny, aktywną chorobę nowotworową, wywiad krwawienia śródczaszkowego w przeszłości, otępienie umysłowe w stopniu umiarkowanym lub ciężkim stwierdzone w badaniu MMSE lub MoCA.

Każdy pacjent wyraził świadomą zgodę na udział w badaniu przed rewaskularyzacją, zgodnie z wymogami Komisji Bioetycznej CM UJ. Badanie zrealizowano w zgodności z Deklaracją Helsińską.

U wszystkich pacjentów przed zabiegiem rewaskularyzacji ICAS zostało wykonane ultrasonograficzne badanie tętnic szyjnych i kręgowych (DUS), przezczaszkowe badanie tętnic mózgowych (TCCD) koła Willisa, tomografia komputerowa mózgu, biochemiczne badania laboratoryjne oraz opracowanie osocza pod kątem cytokin zapalnych i krążących mikroRNA. U części chorych wykonano obrazowanie dyfuzyjne i perfuzyjne mózgu metodą rezonansu magnetycznego oraz ocenę funkcji poznawczych. Wszystkich chorych poddano weryfikacji ICAS metodą angiografii, bezpośrednio przed kwalifikacją do rewaskularyzacji zwężonego naczynia.

W DUS oceniono stopień zwężenia ICA, morfologię blaszki miażdżycowej z uwzględnieniem jej echogeniczności oraz ukształtowanie powierzchni blaszki pod kątem obecności owrzodzeń. W TCCD oceniono wydolność obocznego krążenia mózgowego w obrębie koła Willisa.

Za pomocą wykonanego trzykrotnie perfuzyjnego MRI oceniano zmianę perfuzji mózgu w wyniku rewaskularyzacji ICAS, podczas gdy badaniem dyfuzyjnym poszukiwano cech okołozabiegowej mikrozatorowości mózgowej.

Funkcje kognitywne przed i po rewaskularyzacji ICAS oceniono u pacjentów przy pomocy skali MoCA oraz skali MMSE. Ocena stopnia niepełnosprawności została dokonana przy użyciu zmodyfikowanej skali Rankin oraz skali NIHSS.

W ramach oznaczeń laboratoryjnych oceniono stężenia wybranych cytokin CCL5/RANTES, MMP-9, IL-6, CXCL-16, FASL i TGF β , a w ramach badań molekularnych u każdego pacjenta analizowano poziom 10 krążących mikroRNA: miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b, miR-208b-3p, miR-499-5p, miR-34a-5p, miR-124-3p, miR-134-5p, miR-122-5p; oraz miR-375.

Metoda rewaskularyzacji ICAS, w oparciu o decyzję multidyscyplinarnego zespołu Vascular Team obejmowała przezskórną angioplastykę ICA (CAS) lub chirurgiczną endarterektomię (CEA). Rewaskularyzacja ICAS była poprzedzona angiografią z pomiarem ilościowym stopnia redukcji światła naczynia.

Pacjenci po rewaskularyzacji ICAS zostali objęci regularną obserwacją przez średni okres 38 ± 3.8 miesięcy (od 3 do 50 miesięcy). W trakcie obserwacji oceniano wystąpienie niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych (MACCE), w tym zgonu sercowo-naczyniowego (CVD), zawału serca (MI) lub udaru mózgu (IS).

Wyniki przedstawiono w trzech publikacjach:

W pracy pt.: „*The role of chemokine CCL5/RANTES and MMP-9 as inflammatory modulators in symptomatic internal carotid artery stenosis*” zbadano związek pomiędzy stężeniem wybranych cytokin zapalnych, a cechami morfologicznymi blaszki miażdżycowej w DUS. Oceniono także zależność między poziomem osoczowych cytokin, a ryzykiem wystąpienia MACCE w obserwacji odległej. Praca miała na celu próbę wyodrębnienia potencjalnego biomarkera niestabilnej blaszki miażdżycowej oraz zwiększonego ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z ICAS.

Blaszki aechogenne związane były z niższym stężeniem osoczowego CCL5/RANTES ($p = 0.042$), natomiast wyższym stężeniem IL-6 ($p = 0.04$) w porównaniu z blaszkami echogenicznymi. Owrzodzenie w obrębie blaszki wiązało się z wyższym stężeniem IL-6 ($p = 0.039$).

Wśród osób, u których stwierdzono MACCE w czasie obserwacji, stwierdzono niższe stężenie CCL5/RANTES w porównaniu do chorych bez MACCE ($p = 0.01$). Analogicznie, niższe wartości CCL5/RANTES obserwowano u chorych zmarłych z powodów sercowo-naczyniowych ($p = 0.034$), a także u chorych z MI w okresie obserwacji ($p = 0.001$). Na podstawie analizy wieloczynnikowej stwierdzono niższe stężenie CCL5/RANTES, natomiast wyższe stężenie MMP-9 jako istotne czynniki zwiększające ryzyko MACCE w obserwacji odległej (odpowiednio $p = 0.038$ i $p = 0.017$).

W analizie krzywych Kaplana-Meier’a, w 3-letniej obserwacji stwierdzono niższy odsetek przeżycia bez MACCE u pacjentów z niższym stężeniem CCL5/RANTES ($p = 0.035$) oraz u chorych z wyższym stężeniem MMP-9 ($p = 0.015$). Wyższy poziom MMP-9 wiązał się z częstszym wystąpieniem IS ($p = 0.029$), a niższy poziom CCL5/RANTES był związany z większym odsetkiem MI w okresie obserwacji ($p = 0.007$).

Celem pracy pt. “*Circulating miRNA levels differ with respect to carotid plaque characteristics and symptom occurrence in patients with carotid artery stenosis and provide information on future cardiovascular events*” była ocena związku między stężeniem krążących mikroRNA w grupie pacjentów z objawowym oraz bezobjawowym ICAS, a morfologią blaszki miażdżycowej oraz ryzykiem sercowo-naczyniowym w obserwacji odległej. Ponadto wyodrębniono mikroRNA o potencjalnej wartości prognostycznej, mogących pełnić funkcję biomarkerów przyszłych zdarzeń sercowo-naczyniowych.

Stwierdzono istotne różnice pomiędzy grupą pacjentów objawowych oraz bezobjawowych w stężeniu mikroRNA pochodzenia mózgowego: miR-124-3p ($p = 0.036$), miR-133a-3p ($p = 0.043$) oraz miR-134-5p ($p = 0.02$). W DUS, blaszka umiarkowanie echogeniczna, heterogenna, cechowała się wyższą ekspresją miR-124-3p ($p = 0.038$), miR-134-5p ($p = 0.045$), miR-34a-5p ($p = 0.006$) i miR-375 ($p = 0.027$), jak również niższą ekspresją miR-133b ($p = 0.048$). Z kolei blaszki hiperechogeniczne, wykazywały niższą ekspresję miR-34a-5p ($p = 0.017$), miR-134-5p ($p = 0.042$), oraz miR-375 ($p = 0.046$), przy wyższej ekspresji miR-16-5p ($p = 0.029$). Obecność zwapnień w obrębie blaszki była skorelowana z wyższą ekspresją miR-16-5p ($p = 0.023$). Blaszki owrzodziałe cechowała wyższa ekspresja miR-1-3p ($p = 0.049$) i miR-16-5p ($p = 0.003$) w porównaniu do blaszek gładkich, podczas gdy obecność skrzeplin w obrębie blaszki wiązała się z niższym stężeniem miR-1-3p ($p = 0.032$).

Na podstawie wieloczynnikowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa wyodrębniono miR-1-3p, jako istotny statystycznie predyktor MACCE ($p = 0.004$), CVD ($p = 0.005$) i MI ($p = 0.003$). Wykreślone krzywe ROC wykazały, że miR-1-3p, z wyznaczoną wartością odcięcia na poziomie 0.508 miał umiarkowaną wartość w predykcji CVD (AUC = 0.634, 95% CI: 0.369 – 0.900, czułość: 55.6%, swoistość: 95.1%) oraz MI (AUC = 0.743, 95% CI: 0.467 – 1.000, czułość: 66.7%, swoistość: 94%).

W pracy pt.: *“Impact of carotid artery revascularization on the cognitive, functional outcome and cerebral flow in patients with symptomatic carotid artery stenosis”* oceniono perfuzję mózgu oraz funkcje poznawcze u pacjentów z ICAS przed i po rewaskularyzacji zwężonej tętnicy.

U pacjentów przed rewaskularyzacją ICAS obserwowano gorszą perfuzję w zakresie półkuli mózgu po stronie zwężenia w badaniu PWI-MRI, wyrażoną w postaci wydłużonego czasu TTP ($p = 0.042$) w porównaniu z półkulą kontralateralną. Po zabiegu rewaskularyzacji, perfuzja półkuli mózgu zaopatrywanej przez zwężoną tętnicę szyjną wewnętrzną uległa poprawie, do stopnia ukrwienia porównywalnego z półkulą zaopatrywaną przez niezwązioną tętnicę.

Poprawa perfuzji mózgowej była obserwowana niezależnie od stwierdzonych w DWI - MRI nowych sygnałów mikrozatorowości (ang. Microembolic Signals - MES) po rewaskularyzacji. Analogicznie, w TCCD obserwowano poprawę przepływu mózgowego w postaci zwiększenia prędkości przepływu w MCA i ACA po stronie rewaskularyzowanej

tętnicy ($p = 0.001$ oraz $p = 0.021$). Analiza statusu kognitywnego pacjentów wykazała poprawę funkcji poznawczych po zabiegu rewaskularyzacji w odniesieniu do testu MMSE ($p = 0.019$) bez istotnej różnicy w skali MoCA ($p = 0.136$).

Podsumowanie wyników i wnioski

Wyniki obecnej rozprawy doktorskiej wykazały, że u chorych z niedawnym incydem niedokrwiennym mózgu stwierdza się częściej zmiany miażdżycowe o typie zmian niestabilnych, tj. o wyglądzie hypoechogennym i nierównej owrzodziałej powierzchni. W niniejszym opracowaniu zmiany aechogenne zostały znalezione u około 67% chorych, a owrzodzenia u 1/3 badanej populacji.

Po szczegółowej analizie krążących mikroRNA, stwierdzono, że ekspresja miR-16-5p i miR-1-3p jest istotnie wyższa w zmianach hypoechogennych oraz owrzodziałych, czyli zmianach niestabilnych. Potwierdza to hipotezę, że stan zapalny lokalny i systemowy wiąże się z występowaniem incydentów w różnych obszarach naczyniowych, a ocena ekspresji miR-1-3p może stanowić przydatny marker przy prognozowaniu tego ryzyka.

Spośród analizowanych w rozprawie doktorskiej cytokin, wydaje się celowym oznaczanie CCL5/RANTES oraz IL-6, ponieważ oba te biomarkery istotnie różniły pacjentów z hypoechogennymi blaszkami miażdżycowymi w porównaniu do chorych ze zmianami echogennymi i hyperechogennymi. Ponadto stężenie CCL5/RANTES i MMP-9 u pacjentów z ICAS, w obserwacji odległej okazało się niezależnym czynnikiem ryzyka sercowo-naczyniowego.

Po zabiegu rewaskularyzacji ICAS, perfuzja półkuli mózgu zaopatrywanej przez zwężoną tętnicę szyjną wewnętrzną uległa poprawie, do stopnia ukrwienia porównywalnego z półkulą zaopatrywaną przez niezwązioną, kontralateralną tętnicę. Ponadto, w okresie obserwacji obserwowano poprawę statusu kognitywnego pacjentów.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

1. Blaszki miażdżycowe o cechach zmiany niestabilnej w badaniu ultrasonograficznym, czyli hypoechogenne lub owrzodziałe, stwierdza się odpowiednio 2 i 3 razy częściej u chorych z objawowym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej, w porównaniu do chorych bezobjawowych.
2. Zmiany określone w badaniu ultrasonograficznym jako niestabilne cechuje wyższa ekspresja miR-1-3p oraz miR-16-5p, natomiast w zakresie cytokin zapalnych wyższe stężenie IL-6, a niższe stężenie CCL5/RANTES.

3. Spośród biomarkerów niestabilnych blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych, niezależny związek z ryzykiem występowania niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych wykazano dla CCL5/RANTES oraz MMP-9, a także dla miR-1-3p.
4. Zabiegi rewaskularyzacji tętnicy szyjnej wewnętrznej wiążą się z poprawą perfuzji mózgowej w zakresie półkuli zaopatrywanej przez rewaskularyzowaną tętnicę szyjną wewnętrzną do stopnia porównywalnego z kontralateralną półkulą mózgu, jak również z poprawą funkcji kognitywnych.
5. Cechy mikrozatorowości mózgowej, występujące u około połowy chorych po rewaskularyzacji, mają w większości przypadków charakter przejściowy i ustępują w okresie 4 tygodni po zabiegu, nie wiążąc się z trwałym pogorszeniem funkcji kognitywnych i perfuzji mózgowej.
6. U pacjentów z ICAS poddanych rewaskularyzacji obserwuje się poprawę przepływu krążenia mózgowego w badaniu TCCD, poprzez zwiększenie prędkości przepływu krwi w obrębie tętnic mózgu w półkuli zaopatrywanej przez rewaskularyzowaną tętnicę.

Summary

Introduction

In the developed countries, Ischemic Stroke (IS) is the third leading cause of death and one of the major causes of morbidity and long-term disability. Around one-third of IS cases are associated with atherosclerotic lesions within the extracranial segments of carotid arteries. Internal carotid artery stenosis (ICAS) leads to IS in two different mechanisms. In the more common mechanism, cerebral ischemia is a result of cerebral artery occlusion by the thrombi released from the ruptured, ulcerated carotid atherosclerotic plaque. In this mechanism, local and systemic inflammation is considered to play the key role in plaque rupture, thrombus formation and/or cerebral embolization. In the second pathomechanism, diminished cerebral blood flow occurring in severe stenosis of internal carotid artery (ICA) causes hypoperfusion of brain structures and may lead to cerebral ischemia and necrosis.

The *in vivo* histopathological analysis of atherosclerotic plaque is impossible, thus efforts are made to seek for potential biomarkers, which could identify the patients at risk of carotid plaque rupture, resulting in high risk of IS.

Currently, it seems that the major point of interest is the role of chemokines in the early stages of atherosclerotic plaque formation. Chemokines are the group of cytokines, that play a pivotal role in lymphocyte and macrophage mobilization and their chemotaxis to the formed plaque. The particles that are indicated to play an important role in the atherosclerotic process is CCL5/RANTES (Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), participating in the process of inflammatory cells migration to the intima, further cell recruitment and mediators release stimulation as well as MMP-9 - the metalloproteinase responsible for matrix degradation, leading to plaque rupture and thrombus formation on the plaque surface. Moreover, another promising biomarkers seem to be circulating microRNA - small, non-coding RNA particles, responsible for regulation of gene expression by mRNA degradation and by inhibiting the process of translation.

In addition, proper carotid plaque visualization with the use of imaging modalities, like carotid doppler ultrasound (DUS), computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) allows to identify the high-risk vulnerable plaques, resulting in better eligibility for carotid artery revascularization.

Decreased brain perfusion due to ICAS, as well as thromboembolism may cause not only senso-motoric deprivation, but also can lead to the cognitive function decline and

eventually dementia. Carotid revascularization on one hand is aimed to prevent future IS occurrence, but on the other hand, aims to prevent cognitive deterioration in ICAS patients.

As the inflammation leading to atherosclerosis is a generalized process, it is widely addressed that the plaque destabilization within the ICA can lead to ischemic events within other vascular territories in long-term observation, due to the release of variable cytokines and pro-thrombotic factors. The coexistence of atherosclerotic lesions within multiple arterial territories is associated with poor prognosis for patients and is a challenge for clinicians in both diagnosis and interventional treatment.

Currently, the laboratory tests that would have sensitivity and specificity high enough to function as diagnostic and prognostic biomarkers of future cardiovascular outcome are missing. The identification of cytokines and microRNA with potential prognostic value, apart from clinical viability, might greatly contribute to the understanding of mechanisms of ischemia due to inflammatory and thrombotic processes of atherosclerosis.

Aims

The main aim of the study was to evaluate the association of carotid plaque morphology and neurological symptom occurrence due to ICAS, cognitive function, cerebral perfusion as well as circulating cytokines and microRNA concentration. Moreover, the study aimed to identify the potential biomarkers of future major adverse coronary and carotid ischemic events (MACCE), including cardiovascular death (CVD), myocardial infarction (MI) or Ischemic Stroke (IS) in long-term observation.

The specific aims covered:

1. Carotid plaque morphology assessment, including “high-risk plaque” features in patients with asymptomatic ICAS in comparison to patients with the history of IS or TIA.
2. Evaluation of serum concentration of proinflammatory cytokines (CCL5/RANTES, MMP-9, IL-6, TGF β , CXCL16, FASL) in patients with symptomatic ICAS, with regard to plaque morphology and possible correlation with future MACCE occurrence during follow-up.
3. Circulating microRNA expression assessment in patients with symptomatic and asymptomatic ICAS and the evaluation of possible microRNA association with future MACCE occurrence during follow-up.

4. An attempt to identify the patients with high risk of IS, based upon clinical features, laboratory biomarkers and atherosclerotic plaque morphology.
5. Evaluation of cerebral circulation before and after ICAS revascularization in symptomatic ICAS patients with the use of perfusion- and diffusion- weighted magnetic resonance imaging.
6. Comparison of blood flow within the cerebral arteries of Willis Circle before and after ICAS revascularization and assessment of carotid revascularization on cognitive functions changes.

Material and methods.

The study was performed in the Department of Interventional Cardiology in the John Paul II Hospital in Cracow. The study comprised 159 patients with significant ICAS (vessel diameter reduction at least 50%), admitted with the aim of carotid revascularization for IS prevention. The patients were divided into two groups: Group I comprised patients with asymptomatic ICAS, with no history of IS or TIA. Group II comprised symptomatic ICAS patients who suffered from IS or TIA within 6 months preceding the admission.

The inclusion criteria included the presence of significant ICAS qualified for carotid revascularization. Exclusion criteria covered: occlusion of ICA, atrial fibrillation or other known potential causes of IS or TIA (coagulation disorders etc.), coronary instability, congestive heart failure in class III or IV, chronic or acute inflammatory status, active neoplasm, evidence of recent intracranial bleeding, severe cognitive impairment measured with MMSE or MoCA scale.

All subjects signed informed consent for participation in the study, in accordance with the requirements of the institutional local Ethics Committee. Study was performed in consistence with the requirements of the Declaration of Helsinki.

Carotid doppler ultrasound (DUS), transcranial color doppler (TCCD), brain computed tomography (CT), biochemical laboratory tests and serum preparation for the assessment of cytokines and microRNA were performed in all patients before carotid revascularization. In the group of patients, diffusion- and perfusion- weighted MRI, as well as cognitive function evaluation was performed additionally. All patients underwent the angiographic verification of ICAS prior to carotid revascularization.

DUS examination covered the ICA stenosis degree, carotid plaque morphology with the evaluation of plaque echogenicity and possible plaque ulcerations. In TCCD, the blood flow within the cerebral arteries of Willis Circle was examined with the assessment of collateral circulation.

Perfusion-weighted MRI was performed three times to evaluate cerebral perfusion changes after ICAS revascularization, while diffusion-weighted MRI was performed to detect periprocedural micro-embolic signals.

Cognitive function of the study participants was assessed with Montreal Cognitive Assessment (MoCA) and Mini Mental State Examination (MMSE) scales, while functional outcome was estimated using the modified Rankin scale (mRs) and National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) before and after carotid revascularization.

All blood samples were collected on admission, prior to any intervention, immediately after the signed informed consent was obtained from the patients and prepared for further analysis. The serum concentration of cytokines: CCL5/RANTES, MMP-9, IL-6, CXCL-16, FASL and TGF β and 10 types of circulating microRNA (miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b, miR-208b-3p, miR-499-5p, miR-34a-5p, miR-124-3p, miR-134-5p, miR-122-5p; and miR-375) were analyzed in each case.

The ICAS revascularization method was chosen depending on the Vascular Team multidisciplinary decision and covered either carotid artery stenting (CAS) or carotid endarterectomy (CEA). Carotid artery angiography was performed before revascularization with the measurement of ICA lumen reduction using quantitative assessment.

After revascularization, the incidence of MACCE, including CVD, myocardial infarction MI and recurrent IS, were recorded prospectively during the mean follow-up period of 38 ± 3.8 months (from 3 to 50 months).

Results were presented in three papers:

In the paper „*The role of chemokine CCL5/RANTES and MMP-9 as inflammatory modulators in symptomatic internal carotid artery stenosis*” the association between serum cytokines concentration and morphological features of carotid plaque in DUS was evaluated. The correlation between cytokine levels and the risk of MACCE occurrence during long-term follow-up was also established. The study was aimed to find a possible biomarker of unstable carotid plaque and higher risk of adverse cardio-vascular outcome in patients with ICAS.

The majority of patients presented with vulnerable plaque morphology. Echolucent plaques, as compared to echogenic ones presented lower levels of serum CCL5/RANTES ($p = 0.042$) and higher levels of IL-6 ($p = 0.04$). Plaque ulceration was associated with higher median levels of IL-6 ($p = 0.039$). In patients with MACCE noted during follow-up, lower median RANTES levels were observed ($p = 0.01$). Similarly, lower RANTES levels were observed in patients who died from CVD ($p = 0.034$) and suffered from MI ($p = 0.001$), as compared to non - CVD and non - MI groups, respectively. On multivariate Cox proportional hazard analysis, MMP-9 and CCL5/RANTES levels were associated with the MACCE risk increase ($p = 0.038$ and $p = 0.017$ respectively). The Kaplan - Meier curves analysis during the 3-year follow-up showed lower MACCE - free survival rate with lower levels of CCL5/RANTES ($p = 0.035$) and higher levels of MMP-9 ($p = 0.015$). Higher concentration of MMP-9 was associated with increased IS incidence ($p = 0.029$), while lower RANTES levels were associated with increased MI incidence ($p = 0.007$).

The aim of the paper entitled “*Circulating miRNA levels differ with respect to carotid plaque characteristics and symptom occurrence in patients with carotid artery stenosis and provide information on future cardiovascular events*” was to evaluate the association between circulating microRNA expression, carotid plaque morphology and long-term cardiovascular risk in patients with symptomatic and asymptomatic ICAS. In addition, the study aimed to determine the predictive value of selected specific miRNAs as potential biomarkers of future cardiovascular events.

Significant differences in the expression of brain-derived microRNA: miR-124-3p ($p = 0.036$), miR-133a-3p ($p = 0.043$) and miR-134-5p ($p = 0.02$) were observed between the groups of symptomatic and asymptomatic ICAS patients. In DUS, the moderately echogenic plaques showed significantly higher levels of miR-124-3p ($p = 0.038$), miR-134-5p ($p = 0.045$), miR-34a-5p ($p = 0.006$) and miR-375 ($p = 0.027$), and lower levels of miR-133b (1.74 ± 1.49 vs. 2.62 ± 4.28 ; $p = 0.048$). On the other hand, the hyperechogenic plaques showed significantly lower levels of miR-34a-5p ($p = 0.017$), miR-134-5p ($p = 0.042$) and miR-375 ($p = 0.046$), and higher levels of miR-16-5p ($p = 0.029$). The presence of plaque calcification was associated with higher miR-16-5p expression ($p = 0.023$). Ulcerated plaques were characterized by higher levels of miR-1-3p ($p = 0.049$) and miR-16-5p ($p = 0.003$) while thrombus formation within the plaque was associated with lower levels of miR-1-3p (0.11 ± 0.09 vs. 0.26 ± 0.29 ; $p = 0.032$). The multivariate Cox proportional hazard analysis revealed miR-1-3p fold change as a predictor of MACCE ($p = 0.004$), as well as a predictor of

CVD or MI ($p = 0.005$ and $p = 0.003$, respectively). Moreover, ROC analysis showed that miR-1-3p with a cut-off value of 0.508 has mild discriminating power with respect to prediction of CVD (AUC = 0.634, 95% CI: 0.369 – 0.900, sensitivity: 55.6%, specificity: 95.1%) and MI (AUC = 0.743, 95% CI: 0.467 – 1.000, sensitivity: 66.7%, specificity: 94%).

The study “*Impact of carotid artery revascularization on the cognitive, functional outcome and cerebral flow in patients with symptomatic carotid artery stenosis*” was aimed to assess the cerebral perfusion and cognitive function in patients with symptomatic ICAS before and after carotid revascularization.

Prior to ICAS revascularization, perfusion in the hemisphere ipsilateral to ICAS was significantly impaired, as compared to the contralateral hemisphere, as evidenced by longer TTP ($p = 0.042$). After revascularization, perfusion-weighted MR showed improvement of cerebral perfusion in the hemisphere supplied by the revascularized ICA, resulting in similar TTP and MTT parameters in both hemispheres ($p = 0.783$ and $p = 0.055$ respectively). Cerebral perfusion improvement was observed regardless of new MES found in DWI-MRI study performed after carotid revascularization. Similarly, there was a significant increase of cerebral flow velocity in TCCD, measured in MCA and ACA at the side of the procedure as compared to the examination performed prior to revascularization, ($p = 0.001$ and $p = 0.021$ respectively). The cognitive outcome analysis showed that there was a significant improvement of cognitive function evaluated by MMSE scale ($p = 0.019$) after ICAS revascularization as compared to pre-procedural assessment, with no significant difference with regard to MoCA scale ($p = 0.136$).

Conclusions

Presented results showed higher prevalence of unstable carotid plaque morphology, meaning hypoechogenic, ulcerated plaque types among patients with recent IS or TIA. In the presented study, hypoechogenic lesions were found in 67% of patients, while plaque ulceration was observed in 1/3 of study population.

After the detailed circulating microRNA analysis, miR-16-5p i miR-1-3p expression was significantly higher in patients with unstable - hypoechogenic, ulcerated plaque morphology. These findings support the hypothesis, that local and systemic inflammation is related to ischemic events occurrence within different vascular territories and miR-1-3p may be a useful biomarker of adverse cardiovascular risk prognosis.

Among the cytokines evaluated in the study, CCL5/RANTES and IL-6 assessment seems reasonable, as serum concentration of these cytokines significantly differentiated patients with hypoechogenic, vulnerable plaque morphology as compared to patients with echogenic and hyperechogenic lesions. Moreover, RANTES and MMP-9 levels were independently associated with future adverse cardiovascular outcome.

After ICAS revascularization, cerebral perfusion of the brain hemisphere supplied by the stenosed ICA significantly improved, resulting in similar perfusion as the contralateral hemisphere. In addition, during follow-up after revascularization, the improvement of cognitive function was observed among study participants.

Study results allowed to reach several conclusions:

1. Vulnerable carotid plaque morphology in DUS, displayed as hypoechogenic or ulcerated, are 2 and 3 times respectively more prevalent among patients with symptomatic ICAS, as compared to asymptomatic patients.
2. Unstable plaque morphology in DUS is associated with higher expression of miR-1-3p and miR-16-5p as well as higher concentration of IL-6 and lower level of CCL5/RANTES.
3. Among analyzed biomarkers of carotid plaque instability, levels of CCL5/RANTES, MMP-9 and miR-1-3p showed independent association with incidence of major adverse cardiac and cerebral events.
4. Carotid artery revascularization is associated with the improvement of cerebral circulation within the hemisphere supplied by the stenosed ICA to a level comparable with the contralateral hemisphere, as well as with the improvement of cognitive functions.
5. Microembolic signals, observed in around a half of patients after carotid revascularization, are in most cases temporary and resolve within 4 weeks of follow-up, resulting in no permanent cerebral perfusion decline or cognitive function impairment.
6. In patients with ICAS undergoing revascularization, the observed improvement of cerebral blood flow in TCCD is manifested by the increase of flow velocities within the cerebral arteries of the hemisphere supplied by the revascularized artery.