

STRESZCZENIE

Encefalopatia wątrobowa (ang. hepatic encephalopathy; HE) ujawniająca się w wyniku uszkodzeń wątroby stanowi istotny problem epidemiologiczno - ekonomiczny, który dotyczy ~1 miliona mieszkańców krajów UE. Najpoważniejszym objawem klinicznym jest obrzęk mózgu prowadzący w większości przypadków ostrej i w stanach zaostrzenia przewlekłej HE, do zgonu pacjenta. Mechanizm obrzęku mózgu w HE jest głównie następstwem obrzmienia astrocytów, jednak udział czynnika naczyniowego, związanego z dysfunkcją bariery krew-mózg (ang. blood - brain barrier; BBB) wydaje się mieć również istotne znaczenie. Biorąc pod uwagę liczbę współgrających elementów, wiedza dotycząca uszkodzenia i deregulacji składowych BBB wymaga uszczegółowienia.

W przebiegu procesów patologicznych coraz częściej zwraca się uwagę na udział jednoniciowych, niekodujących RNA - mikroRNA (ang. microRNA; miRNA), postawiono więc hipotezę zakładającą, że jedną z przyczyn uszkodzenia BBB w HE są zmiany profilu miRNA.

Celem dysertacji była analiza profilu miRNA w osoczu i korze mózgowej szczurów z hiperamonemią prostą i szczurów z ostrym uszkodzeniem wątroby oraz wykazanie molekularnego podłoża zmian w komórkach śródbłonka naczyniowego mózgu, głównego elementu tworzącego BBB.

Doświadczenia wykonano wykorzystując (1) modele *in vivo* tj. szczurzy model hiperamonemii i szczurzy model ostrego uszkodzenia wątroby (2) modele *in vitro* tj. linię komórek śródbłonka naczyń mózgu szczura (ang. rat brain endothelial cell line; RBE4) i pierwotne hodowle komórek śródbłonka naczyń mózgu szczura (ang. primary brain microvascular endothelial cells; PBMEC), oraz (3) izolowane naczynia mózgu szczura.

Na podstawie analizy profilu miRNA osocza i kory mózgowej szczurów modelowych, zidentyfikowano odpowiednio w modelu hiperamonemii prostej 35 i 128, a w modelu ostrego uszkodzenia wątroby 338 i 345 zmienionych miRNA, zaś analiza bioinformatyczna, wykorzystująca dostępne narzędzia oraz bazy danych wykazała potencjalny związek 2 miRNA z genami kodującymi białka związane strukturalnie i funkcjonalnie z BBB (okludynę, integrynę 1 β). W ocenie morfologicznej BBB wykazano uszkodzenia obejmujące zmiany morfologii komórek śródbłonka, korelujące ze zwiększoną przepuszczalnością BBB. W badaniach *in vitro*, w komórkach śródbłonka naczyń mózgowych, analizowano zmiany poziomu ekspresji badanych białek, ze wskazaniem ich znaczenia funkcjonalnego, wykazując udział zidentyfikowanych miRNA-122-5p i miRNA-183-5p w obniżeniu poziomu ekspresji odpowiednio: okludyny i integryny 1 β .

Oceniona w modelu OA zmniejszona gęstość naczyń mózgowych sugerowała zmienione unaczynienie mózgu, porównywalne z unaczynieniem mózgu szczurów 12 miesięcznych, sugerując zmiany charakteryzujące starzenie normatywne. Zmieniony fenotyp komórek śródbłonka zweryfikowano w badaniach *in vitro*, wykazując cechy charakterystyczne dla procesu starzenia.

Skonstruowano, wykonano i przetestowano autorski system do pomiaru wartości rezystancji elektrycznej, służący ocenie integralności komórkowych modeli BBB w czasie rzeczywistym. Wartości pomiarów uzyskane w testach komórkowych były niezależne od zmian pH i temperatury, cechowały się wyższą dokładnością i precyzją, dlatego urządzenie wydaje się być odpowiednim narzędziem do badań toksyczności związków / leków w ocenie funkcji barier biologicznych.

Podsumowując, wyniki dysertacji poszerzają wiedzę na temat patomechanizmu uszkodzeń BBB w HE, w szczególności komórek śródbłonka. W kontekście dysfunkcji wątroby, badania wskazują na znaczenie miRNA w komunikacji na osi wątroba-mózg. Wyniki badań dostarczają nowych danych na temat roli miRNA w regulacji funkcji BBB, co może mieć potencjalne zastosowanie w diagnostyce i terapii zaburzeń neurologicznych związanych z chorobami wątroby. Konstrukcja autorskiego systemu do pomiaru rezystancji warstwy komórek, stanowi wartość interdyscyplinarną dysertacji.

SUMMARY

Hepatic encephalopathy (HE) develops, due to liver damage and represents a significant epidemiological and economic burden affecting approximately 1 million EU citizens. Brain edema is the most severe clinical symptom, which, in most cases of acute and overt chronic HE, leads to patient death. The mechanism of brain edema in HE primarily results from astrocyte swelling; however, the contribution of vascular factors related to the impairment of the blood-brain barrier (BBB) function also seems significant. However, knowledge of BBB dysfunction and HE damage is far from being complete, considering the number of interacting elements.

In pathological processes, increasing attention has been paid to the role of single-stranded, non-coding RNAs - microRNAs (miRNAs). Therefore, we formulated a hypothesis that the possible cause of the BBB damage in HE is miRNA profile changes that regulate the BBB. The dissertation aimed to analyze the miRNA profile in plasma and brain cortex of rats with simple hyperammonemia and rats with acute liver failure, and to demonstrate the molecular basis of changes in endothelial cells of brain vessels, the main component of the BBB.

Experiments were conducted using (1) a rat model of hyperammonemia and a rat model of acute HE, (2) *in vitro* models, including a rat brain endothelial cell line (RBE4) and primary brain microvascular endothelial cells (PBMEC), and (3) isolated rat brain vessels. Based on the analysis of the miRNA profile in the plasma and brain cortex of the rat's model, 35 and 128, as well as 338 and 345 altered miRNAs were identified, respectively. Bioinformatic analysis using available tools and information from databases indicated a potential association of 2 altered miRNAs with genes encoding proteins structurally and functionally related to the BBB (occludin, integrin 1 β).

Morphological assessment of the BBB showed damage involving changes in endothelial cell morphology correlating with increased BBB permeability, at the cellular level, changes in the expression levels of studied proteins were observed, indicating their functional significance. The involvement of identified miRNA-122-5p and miRNA-183-5p in the reduced expression of occludin and integrin 1 β in brain endothelial cells was demonstrated. The decreased density of brain microvessels observed in the acute liver failure model suggested disturbances in brain vascularization comparable to that of 12-month-old rats, indicating changes characteristic of normative aging.

A custom system for resistance measuring was constructed, implemented, and tested, serving to assess the integrity of cellular BBB models in time. The measurement was more accurate and independent of pH and temperature fluctuations, making the device a suitable tool for toxicity studies of compounds/drugs when evaluating biological barrier functions. This result adds interdisciplinary value to the dissertation.

In summary, the research expands our understanding of HE pathomechanism related to BBB damage, particularly endothelial cells. In the context of liver dysfunction, the study highlights the importance of miRNA in liver-brain axis communication. The results provide new insights into the role of miRNAs in regulating BBB function, which may have potential applications in the diagnosis and/or therapy of acute and chronic neurological disorders associated with liver diseases.