

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Jacek Gacoń

**Rola i znaczenie wybranych osoczowych cząstek miRNA oraz grubości
kompleksu intima-media tętnic szyjnych w bezpośrednim i odległym
rokowaniu w zawale serca**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Anna Kabłak-Ziembicka

Pracę wykonano w Klinice Kardiologii Interwencyjnej Szpitala im. Jana Pawła II w Krakowie
oraz w Oddziale Kardiologii Interwencyjnej Szpitala im. Edwarda Szczeklika w Tarnowie

Tarnów, rok 2019

Mojej Promotor, prof. UJ, dr hab. n. med. Annie Kablak-Ziembickiej dziękuję za nieocenioną pomoc, wyznaczanie celów naukowych i pomoc w ich realizacji,

Mojej Żonie i Synowi za wyrozumiałość i wsparcie

WPROWADZENIE	4
CELE PRACY	6
MATERIAŁ I METODYKA	7
PRACE SKŁADAJĄCE SIĘ NA DYSERTACJĘ	13
OMÓWIENIE PRAC	14
PODSUMOWANIE WYNIKÓW	20
WNIOSKI	22
PIŚMIENNICTWO	24
STRESZCZENIE POLSKIE	28
STRESZCZENIE ANGIELSKIE	34
PRACE WCHODZĄCE W CYKL PUBLIKACJI	39
ZGODY AUTORÓW	72

WPROWADZENIE

Ostry zespół wieńcowy (ang. Acute Coronary Syndrome, ACS) jest wiodącą przyczyną zgonów sercowo-naczyniowych [1,2]. Dzięki ogromnemu postępowi związanemu z dynamicznym rozwojem programów szybkiego leczenia ACS, dostępności do ośrodków kardiologii interwencyjnej i nowoczesnych metod rewaskularyzacji serca, umieralność wewnątrzszpitalna zmniejszyła się z 30% w latach 80-tych do około 3-8% obecnie [2,3,4,5].

Natomiast zapadalność na ponowny zawał serca i zgony sercowo-naczyniowe wśród chorych wypisanych po ACS pozostaje niezmiennie wysoka na przestrzeni ubiegłych lat. Ryzyko ponownego zawału serca w pierwszym roku po ACS szacuje się na 5-8%, a zgonu sercowo-naczyniowego w odpowiednio 1 i 3-roku obserwacji na 12% oraz 17% [3,4,5,6].

Grupa ACS nie jest grupą jednorodną, co odzwierciedlają standardy postępowania zgodne w wytycznymi towarzystw kardiologicznych [7,8].

Do ACS zalicza się niestabilną postać choroby wieńcowej (ang. unstable angina, UA), zawał z przetrwałym (ang. ST-Elevation Myocardial Infarction, STEMI), bądź bez przetrwałego uniesienia odcinka ST w elektrokardiogramie (ang. Non-ST-Elevation Myocardial Infarction, NSTEMI). Kluczową rolę „w ocaleniu żywotności mięśnia sercowego” odgrywa czas, w trakcie którego należy prawidłowo zdiagnozować i wdrożyć terapię rewaskularyzacyjną [9,10]. Większość przypadków STEMI nie budzi wątpliwości w postawieniu właściwego rozpoznania i natychmiastowym wdrożeniu rewaskularyzacji. W pozostałych przypadkach czyli UA i NSTEMI problem jest już znaczący, niejednokrotnie prowadząc do przedłużania pobytów w izbach przyjęć, gdzie pacjent potencjalnie zagrożony oczekuje na diagnozę [8,11]. Z uproszczeniem przyjmuje się, że STEMI jest skutkiem ostrego zamknięcia tętnicy wieńcowej na skutek pęknięcia blaszki miażdżycowej i wytworzenia na niej zakrzepu. Należy jednak mieć na uwadze, że zamknięte naczynie dozawałowe nie zawsze koresponduje ze zmianami EKG w postaci uniesienia odcinka ST [7,8,11]. Ponadto, początkowy wynik oznaczeń laboratoryjnych markerów mięśnia sercowego może być ujemny, co przedłuża czas do decyzji terapeutycznych [12].

Stąd ważna rola echokardiografii w oddziałach ratunkowych, w której można zdiagnozować świeże zaburzenia kurczliwości odcinkowej lewej komory, a także wykluczyć inne patologie wewnątrzsercowe odpowiedzialne za występowanie bólu w klatce piersiowej. Wykorzystując echokardiografię można przyspieszyć rozpoznanie i wdrożenie właściwej terapii [7,8,12,13].

W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia na temat nowych cząstek będących fragmentem łańcucha genetycznego, tzw. mikro RNA (miRNA), które odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów fizjologicznych i patofizjologicznych zachodzących m.in. w układzie sercowo-naczyniowym. miRNA są

małymi nie kodującymi cząstkami zbudowanymi z ok. 22 nukleotydów [14-19]. Dotychczas zidentyfikowano ponad 2000 tych cząstek, dla części opisano mechanizmy działania na przebieg i regulację różnych stanów patofizjologicznych w układzie sercowo-naczyniowym. Z miRNA obecnie wiąże się nadzieje, iż zostaną zidentyfikowane nowe markery specyficzne dla rozpoznania ACS w przebiegu ostrego zamyknięcia tętnicy dozwolowej, niezależne od zapisu EKG. A następnie uda się wyselekcjonować miRNA, które mają wartość rokowniczą po zawale serca i mogły by być wykorzystane jako potencjalne cele terapeutyczne [20-23].

Odrębnym zagadnieniem jest profilowanie ryzyka sercowo-naczyniowego, tj. zgonu sercowo-naczyniowego (ang. cardiovascular death, CVD), ponownego zawału serca (ang. myocardial infarction, MI) oraz udaru niedokrwiennego mózgu (ang. ischemic stroke, IS) u pacjentów po przebytym ACS. Do dobrze poznanych czynników rokowniczych zalicza się: frakcję wyrzutową lewej komory (ang. left ventricular ejection fraction, LVEF), hs-CRP, BNP, profil lipidowy, funkcję nerek, wyniki testów obciążeniowych, miażdżycowe zwężenia tętnic poza wieńcowych [24-28].

Jednakże wiadomo, że pomimo wdrożenia zaleceń farmakologicznych i modyfikacji stylu życia u chorych po ACS, ryzyko ponownego epizodu niedokrwiennego pozostaje wysokie [29-33]. Odpowiedz na ten problem jest złożona. Wśród potencjalnych winowajców wymienia się brak dobrej współpracy z pacjentem, zbyt niskie dawki leków, powrót do złych nawyków żywieniowych i używek przez pacjentów. Rejestry podają, że tylko połowa chorych po ACS, u których przy wypisie przepisano tzw. optymalne leczenie farmakologiczne (ang. Best Medical Therapy, BMT) stosowało zalecone leki w prawidłowych dawkach, a zalecane cele terapeutyczne osiąga około 60% chorych [30,32,33].

Wobec tych danych, wydaje się, że należy poszukiwać wskaźników odpowiedzi na leczenie w obiektywnych badaniach obrazowych i laboratoryjnych, które pozwoliłyby oceniać bezpośrednio dynamikę zachodzących procesów aterosclerotycznych jak również zapewnić bezpośredni wgląd w blaszki miażdżycowe.

Dotychczasowe badania wykazały przydatność kliniczną oceny kompleksu intima-media tętnic szyjnych (ang. carotid intima-media thickness, CIMT) w przewidywaniu ryzyka sercowo-naczyniowego, tj. zgonu sercowo-naczyniowego, zawału serca czy udaru niedokrwiennego mózgu. Natomiast dane dotyczące wielokrotnej oceny CIMT w czasie i dynamiki zmian grubości CIMT u chorych po zawale serca w aspekcie jego wartości klinicznej w prognozowaniu zmian ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych dotychczas stanowi przedmiot kontrowersji.

Pewne nadzieje wiąże się z prognostyczną rolą miRNA w schorzeniach serca i naczyń. M.in. wskazywano na ich kliniczną wartość w prognozowaniu ryzyka zgonów, zaostrzenia niewydolności serca i re-hospitalizacji, przebudowy mięśnia lewej komory spowodowanego włóknieniem, wystąpienia groźnych arytmii [34]. Udowodniono istotną zależność pomiędzy ryzykiem zgonu lub rozwoju

niewydolności serca, a miR-208b oraz miR-499-5p [35,36]. U pacjentów z chorobą niedokrwienną serca (ang. coronary artery disease, CAD) wzrost stężenia miRNA-133a wiąże się z większym ryzykiem zgonu, zawału serca i ponownej rewaskularyzacji [35,37].

W pracy doktorskiej została podjęta próba określenia przydatności klinicznej wybranych miRNA oraz zmian grubości CIMT jako parametr diagnostyczny i rokowniczy przebiegu klinicznego u chorych po ACS. Ponadto, podjęto próbę określenia czy zmiana CIMT w czasie może mieć wartość kliniczną u pacjentów po zawale serca w modyfikacji ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych.

CELE PRACY

Głównym celem pracy była próba określenia wartości diagnostycznej i prognostycznej miRNA u chorych przyjętych z powodu ACS celem rewaskularyzacji wieńcowej, oraz próba określenia przydatności seryjnych pomiarów CIMT dla modyfikacji ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych w obserwacji 5-letniej po ACS.

Celami szczegółowymi pracy były:

- 1) Ocena ekspresji wybranych osoczowych miRNA związanych z niedokrwieniem mięśnia sercowego w ostrym zespole wieńcowym
- 2) Ocena ekspresji miRNA u chorych z ostrym zespołem wieńcowym z uniesieniem i bez uniesienia odcinka ST
- 3) Ocena zależności pomiędzy czynnikami demograficznymi, biochemicznymi z uwzględnieniem białek ostrej fazy i cytokin prozapalnych oraz miRNA u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego w obserwacji krótko- i długoterminowej
- 4) Próba wyodrębnienia miRNA ulegających ekspresji w zależności od typu zawału serca, obrazu klinicznego i angiograficznego
- 5) Ocena wartości prognostycznej zmian grubości kompleksu intima-media tętnic szyjnych u pacjentów po zawale mięśnia sercowego
- 6) Próba wyodrębnienia miRNA związanych z ryzykiem zdarzeń sercowo-naczyniowych w obserwacji odległej

MATERIAL

Praca doktorska powstała jako cykl spójnych tematycznie prac oryginalnych. Pacjenci byli włączani do badania w dwóch ośrodkach kardiologicznych: Oddział Kardiologii Inwazyjnej Szpitala im. Edwarda Szczeklika w Tarnowie oraz Klinika Kardiologii Interwencyjnej UJ CM, Szpitala im. Jana Pawła II w Krakowie.

Do badania włączono 215 chorych po zawale serca, w wieku $63,3 \pm 9,8$ lat (154 mężczyzn), u których wykonano rewaskularyzację mięśnia sercowego, zoptymalizowano leczenie farmakologiczne (BMT), pobrano krew na badania laboratoryjne oraz poddano obserwacji odległej. Spośród tych chorych u 43 losowo wybranych (w średnim wieku $57,6 \pm 10,1$ lat) pobrano krew do analizy miRNA.

Kryteria włączenia: pacjenci z niepowikłanym ACS, wiek powyżej 18 lat, obecność co najmniej jednej istotnej zmiany miażdżycowej w tętnicy wieńcowej dozawałowej (>50% redukcji pola powierzchni). Kryteria wyłączenia: objawy ostrej niewydolności serca (w klasie II, III i IV wg Killipa) lub zastoinowej niewydolności serca w klasach NYHA III i IV, wcześniejsza fibrynoliza, mechaniczne lub elektryczne powikłania zawału serca, blok lewej odnogi pęczka Hisa, przewlekła antykoagulacja, aktywna choroba nowotworowa, aktywny lub przewlekły stan zapalny. ACS z normalnymi tętnicami wieńcowymi (zawał serca typu 2 wg definicji).

Kolejna podgrupa obejmowała 71 kolejnych pacjentów (47 mężczyzn, w średnim wieku $69,5 \pm 9,6$ lat), po niedawno (do 3 miesięcy) przeżytym epizodzie niedokrwiennym mózgu (ang. Cerebral Ischemic Event, CIE) spowodowanym istotnym zwężeniem tętnicy szyjnej wewnętrznej powyżej 50% redukcji światła przepływu (ang. Internal Carotid Artery Stenosis, ICAS), przyjętych w celu rewaskularyzacji ICAS.

Kryteria włączenia u pacjentów z CIE obejmowały: opinię neurologa stwierdzającą związek pomiędzy objawami neurologicznymi a obecnością ICAS, oraz ognisko niedokrwienne w CT/MRI mózgu w obszarze zaopatrywanym przez ICAS.

Do badania nie włączano chorych leczonych, którzy nie wyrazili zgody na udział w badaniu, a także chorych leczonych przewlekłe antykoagulacją, z czynną chorobą nowotworową, aktywną lub przewlekłą infekcją zapalną lub inną przewlekłą chorobą wymagającą chemioterapii (np. choroby tkanki łącznej wymagające leczenia sterydami lub cytostatykami). Z badania wykluczono pacjentów gdy brak był związku pomiędzy stroną ICAS a neurologicznymi zmianami w tomografii komputerowej lub deficytami neurologicznymi w opinii neurologa.

W badaniach z CIMT, dodatkowym kryterium wyłączenia była niemożność uzyskania diagnostycznego obrazu ultrasonograficznego (np. masywne zwapnienia umożliwiające ocenę CIMT).

Wszyscy pacjenci uzyskali leczenie zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i Towarzystwa Neurologicznego. Wszyscy pacjenci otrzymali BMT zgodnie z aktualnymi wytycznymi [7,8,10]. Został zalecony kwas acetylosalicylowy lub kłopidogrel oraz inne leki, w tym statyna, beta-bloker i ACEI / ARB, zgodnie z aktualnymi wytycznymi ESC dotyczącymi postępowania w CAD lub chorobie tętnic obwodowych [38,39].

Badania wchodzące w skład niniejszego cyklu publikacji zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Protokoły badań zastały ocenione i zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną. Wszyscy uczestnicy wyrazili zgodę na udział w badaniu.

METODYKA

U wszystkich chorych zostały wykonane:

- Analiza kliniczna obejmująca występowanie klasycznych czynników ryzyka miażdżycy, dotychczasowy przebieg choroby i wykonane interwencje, leczenie farmakologiczne.
- Spoczynkowy elektrokardiogram
- Pomiar wskaźnika kostka-ramię (ang. ankle-brachial index, ABI)
- Badania laboratoryjne obejmujące ocenę w surowicy krwi: stężenia kreatyniny, glukozy, profilu lipidowego, stężenia hs-CRP, hs-TnT w momencie przyjęcia do szpitala po 3-6 h i 12-24 h.
- Profil osoczowych miRNA (miR-1, -16, -34a, -122, -124, -208b, 133a/b, -375, and -499)
- Badanie ultrasonograficzne tętnic dogłowych metodą Doppler Duplex z pomiarem CIMT i blaszek miażdżycowych, co najmniej dwukrotnie.
- Badanie echokardiograficzne z oceną funkcji skurczowej i frakcji wyrzutowej lewej komory
- Angiografia tętnic wieńcowych
- U chorych poddanych rewaskularyzacji ICAS angiografia tętnic szyjnych bezpośrednio przed zabiegiem

Elektrokardiograficzna diagnostyka ostrego zespołu wieńcowego

Kryteria rozpoznania STEMI obejmowały: uniesienie odcinka ST mierzone w punkcie J w odprowadzeniach V2–V3 wynoszące $\geq 0,25$ mV u mężczyzn poniżej 40 roku życia i $\geq 0,2$ mV u mężczyzn po 40 roku życia oraz $\geq 0,15$ mV u kobiet. Każde uniesienie odcinka ST o co najmniej $\geq 0,1$ mV w pozostałych dwóch sąsiadujących odprowadzeniach, a także wystąpienie świeżego całkowitego bloku lewej odnogi pęczka Hisa (LBBB). U pacjentów z zawałem serca ściany dolnej wykonywano również zapis EKG z prawokomorowych (V3R oraz V4R) odprowadzeń przedsercowych. Izolowany

zawał serca ściany tylnej (gałąź okalająca lewej tętnicy wieńcowej), u których stwierdzano izolowane obniżenie odcinka ST w odprowadzeniach V1–V3 $\geq 0,05$ mV, STEMI potwierdzano, poprzez wykonanie dodatkowych zapisów z tylnej ściany klatki piersiowej w celu stwierdzenia uniesienia odcinka ST spełniających kryteria rozpoznania zawału serca ściany dolno-podstawnej (V7–V9 $\geq 0,05$ mV u osób powyżej 40 roku życia, lub $\geq 0,1$ u mężczyzn < 40 rż.).

Rozpoznanie ACS u pacjentów z przewlekłym blokiem LBBB rozpoznawano na podstawie kryteriów Sgarbossy [40].

Kryteria rozpoznania NSTEMI obejmowały:

- kliniczne: podstawowym objawem jest ból w klatce piersiowej,
- EKG: zmiany mogą obejmować przemijające uniesienie odcinka ST, utrzymujące się lub przejściowe obniżenie odcinka ST, odwrócenie załamków T, spłaszczenie lub pseudonormalizację załamka T lub też zapis EKG może nie odbiegać od normy.
- biomarkery: istotny (z przynajmniej jedną wartością > 99 . percentyla górnej granicy wartości referencyjnych) wzrost lub spadek markerów martwicy miokardium (Troponin).

Spektrum kliniczne NSTEMI może obejmować zarówno pacjentów bez objawów przy przyjęciu, jak i osoby z utrzymującym się niedokrwieniem, niestabilne elektrycznie lub hemodynamicznie albo z zatrzymaniem krążenia [7].

Zapis EKG wykonywano co najmniej 2-krotnie przy przyjęciu pacjenta w odstępie 20 minutowym, oraz po rewaskularyzacji mięśnia sercowego oraz co najmniej 2-krotnie w trakcie dalszego pobytu na oddziale kardiologii.

Badanie echokardiograficzne:

Wykonywano u wszystkich chorych zgodnie z wytycznymi EAE (ang. European Association of Echocardiography) [41]. W trakcie badania oceniano funkcję skurczową lewej komory z określeniem frakcji wyrzutowej (ang. left ventricle ejection fraction, LV-EF), wg wzoru: $LV-EF = \frac{objętość\ późnorozkurczowa\ LV - objętość\ późnoskurczowa\ LV}{objętość\ późnorozkurczowa\ LV} \times 100\%$

Ponadto analizowano wielkość jam serca i funkcję zastawek serca, oraz odcinkowe zaburzenia kurczliwości lewej komory.

Badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych

Każdy pacjent miał wykonane badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych głowicą liniową o wysokiej rozdzielczości (4-11 MHz) w prezentacji B-mode, kolorowym i pulsacyjnym Dopplerem aparatem Toshiba Aplio PowerVision (Toshiba Medical Systems Co., Ltd, Tokio, Japonia). Pacjentów badano w pozycji leżącej z głową odchyloną do tyłu.

Pomiar kompleksu intima-media (ocena 12 segmentów tętnic szyjnych) wyrażono jako średnią arytmetyczną z maksymalnych grubości kompleksu intima-media z uwzględnieniem grubości blaszki miażdżycowej wykonując po 2 pomiary dla każdego z segmentów, tj. obustronnie w tętnicy szyjnej wspólnej (1 cm przed opuszką), w opuszcze tętnicy szyjnej wspólnej oraz w początkowym odcinku 1 cm tętnicy szyjnej wewnętrznej. Pomiar CIMT wykonano trzykrotnie – w czasie pobytu pacjenta w szpitalu, oraz dwukrotnie w okresie obserwacji – mediana 21 oraz 41 miesięcy.

Do analizy statystycznej przedstawiono wyniki CIMT jako średnią arytmetyczną wartość CIMT, różnicę pomiędzy pomiarem kolejnym a wartością początkową CIMT oraz roczną zmianę grubości CIMT wyliczoną wg wzoru: roczna zmiana CIMT = (kontrolny CIMT – wyjściowy CIMT)/okres obserwacji w latach. Progresję CIMT definiowano jako każdy przyrost średniej wartości CIMT z 12 analizowanych segmentów w momencie kontrolnych pomiarów (Δ CIMT >0,001mm), a regresja jako brak progresji Δ CIMT \leq 0,001mm

Koronarografia i rewaskularyzacja wieńcowa

Angiografię naczyń wieńcowych wykonano z dostępu udowego lub promieniowego za pomocą techniki Seldingera. W trakcie badania oceniano przepływ wieńcowy i obecność zmian miażdżycowych zarówno w naczyniu dozawałowym jak i pozostałych nasierdziowych tętnicach wieńcowych.

Do oceny wyjściowego przepływu z tętnicy dozawałowej zastosowano skalę przepływu TIMI (Thrombolysis In Myocardial Infarction) [42], wg której pacjenci zostali podzieleni na 2 grupy. Pacjenci, u których tętnica dozawałowa (ang. infarct related artery, IRA) została oceniona na 0 lub 1 pkt w skali TIMI stanowili grupę „zamkniętej IRA”, a przepływ 2 lub 3 pkt w skali TIMI obejmował grupę „drożnej IRA”. Wszystkie angiogramy zostały przeanalizowane przez dwóch niezależnych obserwatorów. Technika zabiegu, rodzaj wszczepionych stentów, leczenie przeciwkrzepliwe w trakcie koronarografii i rewaskularyzacji pozostawiono do uznania operatora. W skrócie, pacjenci otrzymywali podwójną terapię przeciwplatekową (ładującą dawkę aspiryny - ASA 300mg i kłopidogrel 600mg) podawano bezpośrednio po rozpoznaniu ACS przed koronarografią. Podczas angiografii podawano niefrakcjonowaną heparynę zgodnie z masą pacjenta i czasem ACT. Inhibitory glikoproteiny IIb /IIIa zostały zastosowane według uznania operatora. Inne leki, takie jak środki przeciwbólowe, beta-blokery, podano zgodnie ze wskazaniami klinicznymi. Podczas rewaskularyzacji podjęto próbę trombektomii w przypadku okluzji wieńcowej lub widocznej znacznej skrzepliny. IRA był rutynowo stentowana, predylatacja, wybór między konwencjonalnym lub stentem uwalniający lek antymitotyczny zależał od okoliczności klinicznych i decyzji operatora.

Ocena miażdżycy w innych łóżyskach tętniczych

Wszyscy pacjenci byli badani pod kątem współistniejącej miażdżycy w innych głównych obszarach tętniczych. Rozpoznanie zwężenia tętnicy szyjnej, nerkowej, oraz miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych (ang. Peripheral Arterial Disease, PAD) opierały się na stwierdzeniu co najmniej 50% redukcji światła naczynia w badanym terytorium w badaniu ultrasonograficznym, angiografii metodą tomografii komputerowej lub podczas angiografii, i/lub wywiadu rewaskularyzacji tętnic pozawieńcowych.

U wszystkich chorych oceniano wskaźnik kostka-ramię jako narzędzie przesiewowe dla PAD, z wartością odcięcia poniżej 0,9 jako ekwiwalentu zwężeń >50% redukcji światła naczynia w tętnicach kończyn dolnych.

Badania laboratoryjne.

Troponinę o wysokiej czułości (hs-TnT) oznaczano przy przyjęciu pacjenta na SOR, oraz następnie co najmniej dwukrotnie po zabiegu rewaskularyzacji wieńcowej (testem R&D, Bazylea, Szwajcaria), co umożliwiło ocenę ewolucji zawału serca i przeanalizowanie maksymalnych wartości hs-TnT (hs-TnTmax).

Pomiar stężenia glukozy, hs-CRP, kreatyniny, profilu lipidowego w osoczu był wykonywany dla celów badania u pacjentów na czczo, następnego dnia w godzinach rannych.

Analiza osoczowych miRNA:

Próbki krwi pobrano przy przyjęciu pacjenta do szpitala (po podaniu heparyny niefrakcjonowanej). Materiał pozostawiano do koagulacji przez 30 minut, odwirowano i zamrożono surowice w -80°C do momentu analizy miRNA i wybranych biomarkerów. Ekstrakcję miRNA przeprowadzono za pomocą zestawu miRNeasy Serum / Plasma Kit (nr kat. 217184, Qiagen) z początkową lizą za pomocą odczynnika Trizol LS (nr kat. 10296-028, Invitrogen). Stężenia RNA określono metodą elektroforezy kapilarnej na Agilent Bioanalyser 2100 z chipem Pico Eukaryote Total RNA (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara CA). Uzyskano średnio $60 \pm 31,9$ pg / μ L całkowitego RNA z 300 μ l surowicy.

Profilowanie miRNA

Startery Exiqon LNA zastosowano do ilościowego oznaczenia 10 dojrzałych miRNA przy użyciu systemu ViiA 7 (metodą PCR w czasie rzeczywistym). RNA przekształcono w cDNA przy użyciu zestawu Universal cDNA Synthesis Kit (nr kat. EQ-203300, Exiqon). Przed syntezą do RNA dodawano syntetyczny miRNA, który służy jako kontrola reakcji syntezy cDNA. Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w trzech powtórzeniach z mieszaną SYBR Green master Universal RT (nr kat. EQ-203400, Exiqon) stosując warunki standardowe. Wybrano miRNA specyficzne dla narządów: mięsień sercowy i mięśnie szkieletowe (miR-1, -133a, -133b, -208b, -499), tkanką mózgową (miR-34a, -

124, -134), wątrobą (miR- 122), trzustką (miR-375) i referencyjny miRNA dla surowicy (miR-16). Dane przetwarzano metodą delta-delta-Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), stosując globalną normalizację zaimplementowaną w oprogramowaniu DataAssist (Life Sciences). Obliczono zmiany krotności (RQ) w grupie drożnych i zamkniętych tętnicach dozawałowych oraz pacjentów z STEMI vs. NSTEMI. Hierarchiczne grupowanie mediany normalizowanych wartości ekspresji miRNA przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Cluster 3.0.

Obserwacja odległa

W 2 spośród 3 prac oryginalnych, pacjenci zostali poddani obserwacji prospektywnej z oceną częstości występowania zgonu sercowo-naczyniowego (ang. Cardiovascular Death, CVD), ponownego ACS i CIE, a także złożonego punktu końcowego zgon sercowo/naczyniowy, ostry zespół wieńcowy, udar niedokrwienny mózgu (ang. Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Events, MACCE). Okres obserwacji wyniósł średnio 57 ± 25 (zakres 6 do 84 miesięcy). Ponowny ACS został zdiagnozowany zgodnie z aktualnymi kryteriami Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Rozpoznanie CIE musiało być udokumentowane opinią neurologa, na podstawie wykonanych badań w oddziale udarowym, aby zapewnić rzetelność rozpoznania. CVD zdefiniowano jako zakończony zgonem CIE, ACS lub nagły zgon (tj. jakakolwiek nagła lub nieoczekiwana śmierć, o ile nie zostanie udowodniona inna przyczyna w autopsji).

Analiza statystyczna

Zmienne ilościowe zostały przedstawione w postaci wartości średnich i odchyłeń standardowych. Zmienne jakościowe zostały przedstawione jako proporcje. Rozkład normalny był weryfikowany testem Shapiro-Wilka. Do analizy zmiennych ilościowych używano testu t-Studenta, U-Mann'a-Whitney'a lub analizy wariancji (ANOVA), natomiast do analizy zmiennych jakościowych testu χ^2 , dokładnego testu Fisher'a lub testu Pearson'a.

Różnice w ekspresji miRNA analizowano przeprowadzając nieparametryczny test Kołmogorowa-Smirnowa.

Niezależne czynniki diagnostyczne były identyfikowane z użyciem analiz jednoczynnikowych, a następnie weryfikowane metodą wieloczynnikowej analizy regresji wstecznej krokowej.

Ocena niezależnych czynników ryzyka występowania MACCE w obserwacji odległej została przeprowadzona jedno- i wieloczynnikowym modelem hazardu proporcjonalnego Coxa, z wyliczeniem ilorazów ryzyka (ang. hazard ratio, HR) oraz przedziałów ufności (ang. confidence interval, 95% CI).

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu Statistica v.12.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). Za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0,05$. Dane były gromadzone dla celów

statystycznych w bazach Excel zaprojektowanych specjalnie dla celów badania.

Znaczenie diagnostyczne i prognostyczne badanych miRNA oraz zmiany CIMT w czasie oceniano konstruując krzywe ROC, w określeniu pola pod krzywą (ang. area under the curve, AUC), oraz podaniem punktów odcięcia z oznaczeniem czułości i swoistości testu.

Wyliczono ponadto, kwartyłe dla zmiany wartości CIMT (Δ CIMT), dla których rokowanie przedstawiono w postaci krzywych przeżycia Kaplana-Meiera. Istotność statystyczną pomiędzy poszczególnymi krzywymi przeżycia weryfikowano za pomocą C statystyki.

PRACE SKŁADAJĄCE SIĘ NA DYSERTACJĘ:

1.

Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome

Jacek Gacoń, Anna Kabłak-Ziembicka, Ewa Stępień, Francisco J. Enguita, Izabela Karch, Bogusław Derlaga, Krzysztof Żmudka, Tadeusz Przewłocki

DOI: 10.5603/KP.a2015.0174

Kardiol Pol 2016;74(3):280-288.

2.

Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study

Jacek Gacoń, Rafał Badacz, Ewa Stępień, Izabela Karch, Francisco J. Enguita, Krzysztof Żmudka, Tadeusz Przewłocki, Anna Kabłak-Ziembicka

DOI: 10.5603/KP.a2017.0243

Kardiol Pol 2018;76(2):362-369.

3.

The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction

Jacek Gacoń, Tadeusz Przewłocki, Jakub Podolec, Rafał Badacz, Piotr Pieniazek, Wojciech Ryniewicz, Krzysztof Żmudka, Anna Kabłak-Ziembicka

DOI: 10.5114/aic.2019.81705

Postepy Kardiol Interw 2019;15(1).

OMÓWIENIE PRAC

Praca 1.

W badaniu “Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome” oceniono wartość diagnostyczną wybranych osoczowych miRNA, dla identyfikacji pacjentów z zamkniętą vs. drożną IRA, oraz w zależności od elektrokardiograficznej prezentacji zawału serca.

Badaniem objęto 43 chorych przyjętych z troponino-dodatnim ACS, poddanych koronarografii i rewaskularyzacji. Pacjentów klasyfikowano w zależności od typu zawału serca: z przetrwałym uniesieniem odcinka ST (STEMI, 16 chorych) oraz bez przetrwałego uniesienia odcinka ST (NSTEMI, 27 chorych) w zapisie EKG. Ponadto, na podstawie obrazu angiograficznego pacjentów podzielono na podgrupy z uwzględnieniem drożności (TIMI 2 lub 3) vs. zamknięcia tętnicy dozawałowej (TIMI 0 lub 1).

Kryteria włączenia obejmowały: wiek powyżej 18 lat, obecność co najmniej jednej istotnej zmiany miażdżycowej w tętnicy wieńcowej. Kryteria wyłączenia: objawy niewydolności serca (w klasie II, III i IV wg Killipa) obserwowane przed cewnikowaniem serca, uprzednią fibrylizację, mechaniczne lub elektryczne powikłania zawału serca, blok lewej odnogi pęczka Hisa, stosowaną przewlekle antykoagulację, znaną chorobę nowotworową, aktywną lub przewlekłą infekcję lub inną chorobę zapalną. Wszystkie osoby podpisały świadomą zgodę zgodnie z wymogami lokalnej komisji etycznej. Badanie przeprowadzono zgodnie z wymogami Deklaracji Helsińskiej.

U wszystkich chorych przeanalizowano występowanie standardowych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, badania biochemiczne takie jak profil lipidowy, stężenie osoczowe kreatyniny, glukozy, hs-CRP, markerów martwicy mięśnia sercowego i ich ewolucję.

Próbki krwi celem oceny stężeń wybranych miRNA (miR-1, -16, -34a, -122, -124, -208b, -133a/b, -375, and -499), pobrano po wyrażeniu pisemnej świadomej zgody przez pacjenta, po przyjęciu pacjenta do Oddziału i po podaniu niefrakcjonowanej heparyny, ale przed wykonaniem koronarografii.

Uzyskane wyniki.

Na podstawie koronarografii, zamkniętą tętnicę wieńcową stwierdzono u 12 (75%) pacjentów spośród 16 z elektrokardiograficznym obrazem STEMI, oraz u 15 (56%) spośród 27 w grupie NSTEMI, co wskazuje na fakt, że zapis krzywej EKG nie determinuje obrazu angiograficznego tętnicy dozawałowej. Niemniej jednak, stężenie max troponiny hs-T było istotnie wyższe w grupie STEMI w porównaniu do NSTEMI.

Z wyjątkiem miR-134, którego poziom był 3,83-krotnie wyższy w grupie STEMI ($p < 0,025$) nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w ekspresji innych analizowanych miRNA pomiędzy chorymi z STEMI vs. NSTEMI.

Natomiast, stwierdzono istotne statystycznie różnice w ekspresji miRNA, w zależności od obserwowanego przepływu w tętnicy dozawałowej w skali TIMI. Pacjenci z zamkniętą IRA mieli 7-krotnie ($p < 0,05$) oraz 4,57-krotnie ($p < 0,05$) istotnie wyższe poziomy swoistych dla serca osoczowych miR-133a i miR-133b. Podobnie, specyficzne dla mózgu miRNA: miR-34a, -124 i -134 wykazały odpowiednio 5,50- ($p < 0,05$), 2,55- ($p < 0,025$) i 3,45-krotny ($p < 0,05$) wzrost w grupie z zamkniętą IRA w porównaniu do chorych z obecnym przepływem w dozawałowej tętnicy wieńcowej w skali TIMI 2 i 3. Stężenia troponin hs-T nie wykazywały istotnych statystycznie różnic u chorych z drożnym vs niedrożnym naczyniem zawałowym.

Aby ocenić wartość diagnostyczną osoczowych miRNA wykonano analizę krzywych ROC. Stężenie miR-134 charakteryzowała czułość 87,5% i swoistość 59,3% (AUC: 0,725, $p = 0,002$) dla różnicowania STEMI vs NSTEMI. Na podstawie ekspresji miR-134, 11 pacjentów prawidłowo zaklasyfikowano jako STEMI, a 20 jako NSTEMI.

Natomiast analizując drożność tętnicy dozawałowej, najsilniejszym diagnostycznym miRNA okazały się: miR-124 (AUC 0,787; $p < 0,001$; czułość 59%; swoistość 87%), miR-133b (AUC 0,704; $p = 0,006$; czułość 63%; swoistość 81%), miR-34a (AUC 0,697; $p = 0,009$; czułość 56%; swoistość 87%), miR-134 (AUC 0,686; $p = 0,016$; czułość 67%; swoistość 69%) i miR-133a (AUC: 0,640; $p = 0,049$; czułość 52%; swoistość 94%).

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski: pomimo faktu, że nie ma wyraźnych różnic w odniesieniu do profilu miRNA u pacjentów ze STEMI i NSTEMI, ekspresja miRNA różni się istotnie w zależności od angiograficznego obrazu tętnicy dozawałowej. Drożne tętnice dozawałowe produkują mniej krążących „mózgowych” i „sercowych” miRNA co świadczy o zróżnicowanym patomechanizmie uszkodzenia komórek śródbłonna naczyniowego i być może komórek niedotlenionych narządów. Obserwacja ta może przyczynić się do wyjaśniania mechanizmów ostrych zespołów wieńcowych.

Praca 2.

Badanie **“Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study”** miało na celu określenie modelu ekspresji osoczowych miRNA spowodowanych incydem niedokrwiennym w dwóch różnych obszarach tętniczych. W tym celu porównano poziomy krążących miR u pacjentów z ACS oraz z CIE spowodowanym miażdżycowym ICAS. Następnie, chorych poddano prospektywnej ocenie klinicznej pod

kątem wystąpienia ponownych zdarzeń sercowo-naczyniowych i roli miRNA jako potencjalnego biomarkera związanego z ryzykiem ostrego niedokrwienia (MACCE).

Grupa I obejmowała 71 kolejnych chorych (47 mężczyzn, średni wiek $69,5 \pm 9,6$ roku) z CIE i zwężeniem ICAS (średni stopień zwężenia w angiografii $83,9 \pm 15\%$, zakres 70-99%), u których wykonano skuteczną rewaskularyzację tętnicy szyjnej wewnętrznej.

Grupa II obejmowała 43 kolejnych pacjentów (34 mężczyzn, średni wiek $57,6 \pm 10,1$ lat) z ACS, u których następnie wykonano koronarografię i przezskórną rewaskularyzację tętnicy dozawałowej.

Kryteria włączenia obejmowały u pacjentów z CIE: neurologiczną opinię stwierdzającą związek pomiędzy objawami neurologicznymi a obecnością ICAS $>70\%$, potwierdzony obszar niedokrwienności mózgu w badaniu obrazowym w obszarze zaopatrywanym przez ICAS. U pacjentów z ACS, obecność istotnego zwężenia w tętnicy dozawałowej podczas koronarografii.

Do badania nie włączano chorych leczonych przewlekłe antykoagulacją, z czynną chorobę nowotworową, aktywną lub przewlekłą infekcją zapalną lub inną przewlekłą chorobą wymagającą chemioterapii (np. choroby tkanki łącznej wymagające leczenia sterydami lub cytostatykami).

Ponadto, kryteria wyłączenia w grupie ACS stanowiły objawy niewydolności serca (w klasie II, III i IV wg Killipa) obserwowane przed cewnikowaniem serca, wcześniejszą fibrylizację, mechaniczne lub elektryczne powikłania zawału serca, blok lewej odnogi pęczka Hisa. W grupie CIE, do badania nie włączano chorych, po przebyciu uprzednio CIE, gdy odnotowano brak spójności między miejscem ICAS a stwierdzonymi zmianami niedokrwienności mózgu w tomografii komputerowej lub wynik konsultacji neurologicznej sugerujący CIE o innej etiologii niż ICAS. Wykluczono również pacjentów z prawidłowymi tętnicami szyjnymi lub pacjentów leczonych fibrynolitycznie.

Wszystkie osoby podpisały świadomą zgodę zgodnie z wymogami lokalnej komisji etycznej. Badanie przeprowadzono zgodnie z wymogami Deklaracji Helsińskiej.

U wszystkich chorych przeanalizowano występowanie standardowych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, badania biochemiczne takie jak profil lipidowy, stężenie osoczkowe kreatyniny, hs-CRP, fibrynogenu.

Próbki krwi celem oceny stężeń wybranych miRNA (miR-1, -16, -34a, -122, -124, -208b, -133a/b, -375, and -499), pobrano po wyrażeniu pisemnej świadomej zgody przez pacjenta, bezpośrednio po przyjęciu pacjenta do Oddziału i po podaniu niefrakcjonowanej heparyny.

Wszystkich chorych poddano prospektywnej obserwacji w średnim czasie $53,8 \pm 14,9$ miesięcy. W trakcie obserwacji rejestrowano częstość występowania CVD, ACS, i CIE, a także MACCE.

Zawał mięśnia sercowego został zdiagnozowany według kryteriów Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Aby zapewnić rzetelność diagnoza CIE została potwierdzona przez neurologa. CVD

zdefiniowano jako śmiertelny CIE, śmiertelny MI lub inny CVD (to jest każdy nagły lub nieoczekiwany zgon, o ile nie zostanie udowodniony inaczej w autopsji).

Uzyskane wyniki.

Pacjenci z CIE vs. ACS byli starsi ($p < 0,001$), częściej chorowali na nadciśnienie tętnicze ($p = 0,005$) i mieli wyższy poziom kreatyniny w surowicy ($p = 0,01$). Z kolei, wyższe stężenie hs-CRP ($p = 0,01$) i cholesterolu LDL ($p < 0,001$) notowano w grupie pacjentów z ACS.

U pacjentów z ACS vs. CIE stwierdzono statystycznie wyższe stężenia osoczowego miR-124-3p (log 2-DCt $0,571 \pm 0,07$ vs. $-0,638 \pm 0,06$; $p < 0,001$), miR-134-5p (log 2-DCt $0,288 \pm 0,09$ vs. $-0,02 \pm 0,07$; $p = 0,012$), miR-208b--3p (log 2-DCt $-0,899 \pm 0,08$ vs. $-1,998 \pm 0,149$; $p < 0,001$), miR-34a-5p (log 2-DCt $0,238 \pm 0,08$ vs. $-0,248 \pm 0,07$; $p < 0,001$) i miR-499-5p (log 2-DCt $-0,899 \pm 0,08$ vs. $-1,176 \pm 0,07$; $p < 0,001$), a mniejszy poziom miR-16-5p (log 2-DCt $-0,072 \pm 0,08$ vs. $1,962 \pm 0,103$, $p < 0,001$) i miR-122-5p (log 2-DCt $-0,076 \pm 0,08$ vs. $1,892 \pm 0,09$; $p < 0,001$).

Natomiast u pacjentów z ACS i CIE obserwowano podobne poziomy osoczowych miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b i miR-375.

Podczas czteroletniego okresu obserwacji MACCE wystąpił u 23 (20,5%) pacjentów. W grupie CIE było osiem CVD (jeden z powodu CIE i siedem z powodu zawału serca) i pięć CIE niezakończonych zgonem. W grupie ACS było 10 ponownych ACS niezakończonych zgonem, podczas gdy nie odnotowano CVD ani CIE. Wielowymiarowa analiza proporcjonalnego hazardu Cox'a ujawniła następujące predyktory CVD / MI / CIE: miR-208b-3p (HR = 1,225, 95% CI 1,092-1,375; $p = 0,001$), miR-34a-5p (HR = 0,963, 95 % CI 0,935-0,992, $p = 0,012$) i miR-499-5-5p (HR = 0,077, 95% CI 0,025-0,239; $p < 0,001$). Ponadto miR-208b, miR-34a i miR-499 uznano za niezależne czynniki ryzyka dla MI, CIE, oraz CVD. Wzrost poziomu miR-133b został zidentyfikowany jako czynnik ryzyka przyszłego CVD (HR = 1,009; CI 1,003–1,015; $p = 0,004$).

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski: u pacjentów z ACS i CIE obserwowano podobne stężenia osoczowych miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b (wg piśmiennictwa identyfikowanych z komórką mięśniową i kardiomiocytem, ale także ich obecność stwierdzano w blaszce miażdżycowej w tętnicach szyjnych), co mogłoby wskazywać na wspólny mechanizm ostrego niedokrwienia serca i mózgu, ponieważ wg literatury są to miRNA zaangażowane w proces destabilizacji i pęknięcia blaszki miażdżycowej.

U chorych z ACS stwierdzono wyższe stężenia miR-124-3p oraz miR-34a-5p, które wg danych z piśmiennictwa wiąże się z proliferacją komórek, promowaniem apoptozy kardiomiocytów i włóknieniem pozawałowym, oraz wyższą ekspresję miR-134-5p świadczącą zapewne o mechanizmie ACS związanym z pęknięciem blaszki, aktywacją płytek i powstaniem skrzepu, a także wyższą ekspresję miR-208b-3p

oraz miR-499-5p będących swoistymi dla komórki kardiomiocytu, tak więc odzwierciedlającymi stopień uszkodzenia kardiomiocytów.

Wyższe stężenia miR-16-5p oraz miR-122-5p u chorych z CIE, mogą być związane m.in. z silną aktywacją makrofagów i apoptozą, oraz uszkodzeniem śródbłonna, bardziej wyraźnym w tej grupie pacjentów.

Pośród 23 zdarzeń sercowo-naczyniowych w obserwacji prospektywnej, 6 wystąpiło wskutek niedokrwienia mózgu, a 17 niedokrwienia mięśnia sercowego. Zidentyfikowano 3 wspólne miRs dla ryzyka wystąpienia CIE i ACS. Ekspresja miR-208b związana była z 22% wzrostem ryzyka MACCE, natomiast ekspresja miR-499 oraz miR-34a wiązały się z redukcją ryzyka MACCE o odpowiednio 92% oraz 3%. W przypadku miR-34a, niski poziom ekspresji tej cząsteczki powoduje zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego p53 zaangażowanego m.in. w indukcję apoptozy. Ponadto, miR-34a bezpośrednio oddziałując z Bcl-2, Cdk-4 oraz receptor Met, hamuje ich ekspresję, promując tym samym zatrzymanie cyklu komórkowego oraz zahamowanie apoptozy. Wzrost poziomu miR-133b został zidentyfikowany jako czynnik podwyższonego ryzyka CVD, poprzez promowanie apoptozy.

Praca 3.

Przedmiotem kolejnego badania, pt: **“The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction”** była ocena przydatności seryjnych pomiarów CIMT w aspekcie ich wartości rokowniczej w ocenie ryzyka wystąpienia MACCE, MI i nawrotu dławicy piersiowej z powodu progresji zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych (ang. coronary lesion progression; CLP) u pacjentów po przebytych MI.

Badanie obejmowało 215 pacjentów (154 mężczyzn, średni wiek $63,3 \pm 9,8$ lat) przyjętych do ośrodka kardiologii interwencyjnej z powodu ACS celem rewaskularyzacji naczynia dożawałowego.

Kryteria włączenia obejmowały: troponino-dodatni ACS z istotnym zwężeniem co najmniej jednej tętnicy wieńcowej, wiek powyżej 18 lat, świadomą zgodę na udział w badaniu. Do kryteriów wyłączenia zaliczono: objawy niewydolności serca (w klasie IV wg NYHA), stosowaną przewlekle antykoagulację, czynną chorobę nowotworową, aktywną lub przewlekłą infekcję lub inną chorobę zapalną, nieoptymalny wynik badania USG uniemożliwiający dokonanie wiarygodnej oceny CIMT.

Wszystkie osoby wyraziły świadomą pisemną zgodę zgodnie z wymogami lokalnej komisji etycznej. Badanie przeprowadzono zgodnie z wymogami Deklaracji Helsińskiej.

USG tętnic szyjnych o wysokiej rozdzielczości wykonano u wszystkich chorych w trakcie pobytu w szpitalu. Wyliczono średnią z 12 pomiarów maksymalnej grubości kompleksu intima-media z uwzględnieniem grubości blaszki miażdżycowej w następujący sposób: dokonywano po 2 pomiary dla segmentu dystalnego tętnicy szyjnej wspólnej (1 cm przed opuszką), w opuszcze tętnicy szyjnej i odcinku

proksymalnym tętnicy szyjnej wewnętrznej (w obrębie 1 cm od podziału opuszki) obustronnie w tętnicach szyjnych.

Analizie statystycznej poddano średnią arytmetyczną z 12 pomiarów.

Ocenę CIMT powtórzono u wszystkich pacjentów co najmniej dwukrotnie (mediana: 3 oraz 4.5 roku). Roczna zmiana CIMT (mm / rok) została wyrażona wg wzoru:

roczna zmiana CIMT = (kontrolny CIMT - wyjściowy CIMT) / okres obserwacji w latach

Różnicę między kontrolną a wyjściową wartością CIMT wyrażono również jako wartość bezwzględną (Δ) zgodnie z następującym wzorem: $\Delta CIMT = kontrolny CIMT - wyjściowy CIMT$

Wszystkich chorych poddano średnio 5-letniej prospektywnej obserwacji. W trakcie obserwacji rejestrowano częstość występowania MACCE, CVD, MI, CIE i CLP.

Uzyskane wyniki.

MACCE odnotowano u 65 (30,2%) pacjentów, w tym dziesięć zgonów sercowo-naczyniowych (9 wskutek MI, 1 - CIE), 42 MI i / lub 15 CIE niezakończonych zgonem.

Ponowny MI wystąpił u 12 (5,6%) pacjentów w pierwszym roku obserwacji oraz u 26 (12,1%) pacjentów w okresie 3 lat. Nawrót stabilnej dławicy piersiowej odnotowano u 30 (14%) pacjentów, w tym u 20 (9,3%) z powodu CLP, a u 10 (4,7%) z powodu restenozy w stencie.

U pacjentów z MACCE oraz CLP częściej stwierdzano nadciśnienie tętnicze ($p=0,026$), wyższe stężenie kreatyniny ($p=0,049$), hs-CRP ($p=0,001$) w surowicy krwi oraz większą ilość czynników ryzyka miażdżycy ($p=0,05$), w porównaniu do chorych u których nie notowano ponownych zdarzeń sercowo-naczyniowych.

Przy włączeniu chorych do badania, stwierdzano wyjściowo podobne wartości CIMT ($1,45 \pm 0,44$ mm vs $1,43 \pm 0,40$ mm; $p = 0,486$), zarówno u chorych bez jak i z MACCE w obserwacji odległej.

W średnim okresie obserwacji wynoszącym $36,5 \pm 29,3$ miesięcy (zakres 6-72 miesięcy), u pacjentów u których wystąpił MACCE stwierdzano 2,7-krotnie większy roczny przyrost wartości CIMT w porównaniu do chorych bez MACCE ($0,024 \pm 0,12$ mm vs. $0,009 \pm 0,16$ mm / rok; $p < 0,001$). Podobne wyniki dotyczyły re-oceny CIMT przeprowadzonej w średnim czasie obserwacji $53,3 \pm 37,1$ miesięcy ($0,050 \pm 0,1$ mm vs. $0,001 \pm 0,1$ mm / rok, $p < 0,001$).

U pacjentów, u których roczna zmiana CIMT wskazywała na istotną redukcję zmian miażdżycowych (1. kwartyl dla rocznej zmiany CIMT) obserwowano istotnie niższą liczbę ponownych zawałów serca i wystąpienia dławicy piersiowej de novo, w porównaniu z osobami z roczną zmianą CIMT w 2., 3. i 4. kwartylu ($p = 0,008$) oraz w porównaniu do czwartego kwartyłu (1 vs 4 kwartył: $p < 0,001$). Krzywa przeżycia Kaplana-Meiera dla 1 kwartyłu wynosiła odpowiednio 100%, 97,8% i 88,4%, a dla 4 kwartyłu: 92,6%, 76,6% i 61,0% w 1, 3 i 5 roku obserwacji.

Wieloczynnikowa analiza przeżycia metodą Cox'a wykazała, że ryzyko MACCE wiązało się niezależnie z roczną progresją CIMT o co najmniej 0,003 mm/rok (HR 3,00; 95% CI 1,496 – 6,016; $p < 0,001$) i wyjściowym stężeniem kreatyniny w surowicy (HR 1,01; 95% CI 1,003 – 1,017; $p = 0,006$). Roczny przyrost CIMT $> 0,003$ mm/rok, stężenie kreatyniny w surowicy i hiperlipidemia w wywiadzie były niezależnie związane z ryzykiem ponownego zawału serca (odpowiednio: HR 4,59; 95% CI 1,591–13,217; $p = 0,005$; HR 1,01; 95% CI 1,003–1,017; $p = 0,004$; HR 3,15; 95% CI 1,271–7,784; $p = 0,013$), oraz zawału serca + CLP (HR 2,95; 95% CI 1,378–6,323; $p < 0,001$; HR 1,01; 95% CI 1,004–1,018; $p = 0,002$; HR 3,50; 95% CI 1,759–6,964; $p = 0,005$).

Po wykreśleniu krzywych ROC, roczny przyrost CIMT $> 0,003$ mm/rok charakteryzował się czułością pomiędzy 80% a 84,5%, oraz swoistością pomiędzy 47% a 49,3% w ocenie prawdopodobieństwa wystąpienia MACCE, ponownego MI, oraz MI+CLP (pole pod krzywą, AUC pomiędzy 0,638 a 0,673).

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujący wniosek: okresowa ocena zmiany grubości blaszki miażdżycowej w tętnicach szyjnych może być przydatnym parametrem oceny ryzyka ponownego zawału serca i wystąpienia nawrotu dolegliwości stenokardialnych związanych z CLP, a także z ryzykiem MACCE.

Punkt odcięcia dla rocznego przyrostu CIMT wynoszący 0,003 mm/rok, wiąże się z ok. 3 do 4,6-krotnym wzrostem ryzyka analizowanych zdarzeń w obserwacji odległej, z satysfakcjonującą czułością, ale niską swoistością.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Złożoność procesów biomolekularnych i genetycznych w patomechanizmie ostrego niedokrwienia serca i mózgu, sprawia, że wyodrębnienie ważnych diagnostycznie i rokowniczo parametrów nastęrcza dużych trudności. Wyniki uzyskane w niniejszym opracowaniu, wskazują na przydatność miR-133a, miR-133b, miR-34a, miR-124 i miR-134 w wytypowaniu chorych z zamkniętym naczyniem dozawałowym, niezależnie od prezentacji ACS w zapisie EKG. Natomiast, miR-134 był jedynym parametrem różnicującym chorych z STEMI i NSTEMI.

Chorzy po CIE i ACS wykazują podobną ekspresję w zakresie miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b i miR-375, co mogłoby sugerować częściowo wspólny patomechanizm wywołujący niedokrwienie (powstanie złogów składających się z makrofagów, lipoprotein o małej gęstości (LDL), komórek piankowatych i pozakomórkowych skupisk cholesterolu, które następnie wzbogacają się w elementy włókniste tkanki łącznej, które przerastając i otaczając pierwotne ognisko zapalne, separują je od reszty naczynia - "atheromatous plaque").

Niemniej jednak, w ACS stwierdzono wyższe stężenia miR-124-3p oraz miR-34a-5p, które wg danych z piśmiennictwa wiąże się z proliferacją komórek, promowaniem apoptozy kardiomiocytów i włóknieniem pozawałowym, oraz wyższą ekspresję miR-134-5p świadczącą zapewne o mechanizmie ACS związanym z pęknięciem blaszki, aktywacją płytek i powstaniem skrzepu, a także wyższą ekspresję miR-208b-3p oraz miR-499-5p będących swoistymi dla komórki kardiomiocytu, tak więc odzwierciedlającymi stopień uszkodzenia kardiomiocytów.

Wyższe stężenia miR-16-5p oraz miR-122-5p u chorych z CIE, mogą być związane m.in. z silną aktywacją makrofagów i apoptozą, oraz uszkodzeniem śródbłonna, bardziej wyraźnym w tej grupie pacjentów.

Może to przemawiać za dominującą rolą miRs związanych z aktywnością procesu zapalnego (makrofagi, apoptoza), dysfunkcją śródbłonna w CIE, a zakrzepowego w ACS z następowym niedokrwieniem kardiomiocytów i ich apoptozą wyrażoną swoistymi dla miocytów miRs (miR-1, -133a, -133b, -208b, -499). Ponadto niska ekspresja miR-34a, wiązała się z poprawą rokowania u pacjentów po przebytych zarówno CIE jak i ACS, co potwierdzają dane z literatury o ich roli procesie apoptozy i włóknienia.

Obecna rozprawa doktorska przynosi również nowe spojrzenie na rolę powtarzanych okresowo pomiarów CIMT w tętnicach szyjnych u chorych w prewencji wtórnej tj. u chorych wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego.

Już niewielka progresja zmian miażdżycowych w tętnicach szyjnych, bo wynosząca zaledwie 0,003 mm /rok istotnie zwiększa ryzyko ponownych zdarzeń sercowo-naczyniowych w grupie pacjentów po zawale serca. Oceniając zmiany miażdżycowe w tętnicach szyjnych jesteśmy w stanie ocenić ryzyko MACCE zarówno w grupie pacjentów z chorobą wieńcową jak i miażdżycą tętnic poza wieńcowych. Uzyskanie regresji CIMT okazało się najwartościowszym parametrem klinicznym istotnie wpływającym na zmniejszenie ryzyka MACCE, CIE, ACS w obserwacji odległej. Redukcja CIMT potwierdza skuteczność OMT u indywidualnego chorego. Natomiast progresja CIMT u chorych leczonych farmakologicznie wskazuje na fakt konieczności intensyfikacji naszych działań pro zdrowotnych. Podsumowując, analiza dynamiki progresji/regresji CIMT, cytokin zapalnych, oraz miRNA, pozwala na określenie grup związanych z redukcją ryzyka, jak również wystąpienia ponownych zdarzeń sercowo-naczyniowych w obserwacji prospektywnej.

WNIOSKI

1. Z wyjątkiem aktywności miR-134-5p, którego ekspresja była 3,8-krotnie wyższa w grupie STEMI w porównaniu do NSTEMI, nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji miRNA w zależności od prezentacji ACS w badaniu elektrokardiograficznym.
2. Ekspresja miRNA wydzielanych pod wpływem ostrego niedokrwienia serca może przyczyniać się do identyfikacji pacjentów z niedrożną tętnicą dozawałową, tj. wymagających pilnej koronarografii i rewaskularyzacji wieńcowej.
3. Wysoką swoistość w identyfikacji niedrożnej tętnicy dozawałowej wykazano dla miR-134-5p (mechanizm ACS związany z pęknięciem blaszki, aktywacją płytek i powstaniem skrzepu), miR-124-3p oraz miR-34a-5p, związanych z proliferacją komórek, promowaniem apoptozy i włóknieniem pozawałowym, oraz miR-133a-3p i miR-133b wydzielanych z uszkodzonych kardiomiocytów i będących odzwierciedleniem ich stopnia uszkodzenia.
4. U pacjentów z ostrym niedokrwieniem mózgu i serca obserwowano podobną ekspresję osoczowych miR-1-3p, miR-133a-3p oraz miR-133b co mogłoby wskazywać na wspólny mechanizm ostrego niedokrwienia w destabilizacji i pęknięciu blaszki miażdżycowej.
5. Ekspresja niektórych miRNA zależy od lokalizacji niedokrwienia. Możliwe, że wyższe stężenia miR-16-5p oraz miR-122-5p u chorych z CIE, można tłumaczyć rolą aktywacji makrofagów, apoptozy, i uszkodzeniem śródbłonna dominujących w ostrym niedokrwieniu mózgu w przebiegu zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej. Natomiast wyższą aktywność miR-124-3p, miR-134-5p, miR-34a-5p, miR-208b-3p oraz miR-499-5p u chorych z ACS można wytłumaczyć ich wysoką swoistością dla kardiomiocytów i rolą zakrzepu w tętnicy wieńcowej.
6. W obserwacji 5-letniej, wyższe ryzyko MACCE występowało u chorych z wyższą ekspresją miR-208b (promotor niewydolności serca), a CVD ze wzrostem ekspresji miR-133b i promowaniem apoptozy. Natomiast ekspresja miR-499 oraz miR-34a wiązały się z redukcją ryzyka MACCE, co w przypadku miR-34a, można tłumaczyć zahamowaniem apoptozy poprzez zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego p53 oraz bezpośrednim hamowaniem Bcl-2, Cdk-4 oraz receptora Met.

7. Wyściowa ocena grubości kompleksu intima-media u chorych po ACS nie jest czynnikiem rokowniczym przyszłych MACCE. Dopiero, ocenia zmiany CIMT w seryjnych pomiarach w obserwacji odległej może być przydatnym parametrem rokowniczym.

8. Ryzyko MACCE, ponownego zawału serca i wystąpienia dławicy piersiowej de novo, wiąże się niezależnie z roczną progresją CIMT $> 0,003$ mm/rok (czułość: 80-84,5%, swoistość: 47-49,3%), stężeniem kreatyniny w surowicy i hiperlipidemią w wywiadzie.

9. Pomimo stosowania BMT i zaleceń pro zdrowotnych modyfikacji stylu życia zgodnie z wytycznymi towarzystw kardiologicznych, redukcję zmian miażdżycowych w tętnicach szyjnych obserwuje się u mniej niż 1/3 chorych po ACS.

10. Przeżycie wolne od MACCE w 1, 3 i 5 roku obserwacji, u pacjentów, u których uzyskano istotną redukcję miażdżycy w tętnicach szyjnych wyniosło 100%, 97,8% i 88,4% (1 kwartył Δ CIMT $< - 0,014$ mm/rok) w porównaniu do pacjentów z dużą progresją zmian miażdżycowych: 92,6%, 76,6% i 61,0% (4 kwartył Δ CIMT $> 0,056$ mm/rok).

11. Systematyczna kontrola CIMT może być przydatnym narzędziem w prognozowaniu przyszłych MACCE u chorych po ACS w prewencji wtórnej. Redukcja CIMT potwierdza skuteczność BMT u indywidualnego chorego. Natomiast progresja CIMT u chorych leczonych farmakologicznie wskazuje na fakt konieczności intensyfikacji działań pro zdrowotnych

PIŚMIENNICTWO

1. Mendis S, Puska P, Norrving. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Geneva World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/44701>
2. Poloński L1, Gasior M, Gierlotka M, Kalarus Z, Cieśliński A, Dubiel JS, Gil RJ, Rużyło W, Trusz-Gluza M, Zembala M, Opolski G. Polish Registry of Acute Coronary Syndromes (PL-ACS). Characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndromes in Poland. *Kardiol Pol.* 2007 Aug;65(8):861-72; 873-4.
3. André R, Bongard V, Elosua R, Kirchberger I, Farmakis D, Häkkinen U, Fusco D, Torre M, Garel P, Araújo C, Meisinger C, Lekakis J, Malmivaara A, Dovali M, Pereira M, Marrugat J, Ferrières J. International differences in acute coronary syndrome patients' baseline characteristics, clinical management and outcomes in Western Europe: the EURHOBOP study. *Heart.* 2014 Aug;100(15):1201-7.
4. Eisen A, Giugliano RP, Braunwald E. Updates on Acute Coronary Syndrome: A Review. *JAMA Cardiol.* 2016 Sep 1;1(6):718-30.
5. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik L, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med.* 2016 Jul; 4(13): 256.
6. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, et al. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation.* 1994; 90(1): 583–612.
7. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016; 37(3): 267–315.
8. Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2018; 39(2): 119–177.
9. Antman EM. Time is muscle: translation into practice. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1216-21.
10. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, et al. European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines, EACTS Clinical Guidelines Committee, Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions, Authors/Task Force members. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for

Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J*. 2014; 35(37): 2541–2619.

11. Krishnaswamy A, Lincoff AM, Menon V. Magnitude and consequences of missing the acute infarct-related circumflex artery. *Am Heart J* 2009;158:706–712.

12. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD; ESC Scientific Document Group. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2018 Aug 25.

13. Ooi DS, Isotalo PA, Veinot JP. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase-MB, troponin I, and troponin T with cardiac pathology. *Clin Chem*. 2000; 46(3): 338–344.

14. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008;3:e3694.

15. Stepien E, Kablak-Ziembicka A, Czyz J, et al. Microparticles, not only markers but also a therapeutic target in the early stage of diabetic retinopathy and vascular aging. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:677-688.

16. Kaneda R, Fukuda K. MicroRNA is a new diagnostic and therapeutic target for cardiovascular disease and regenerative medicine. *Circ J* 2009;73:1397-1398.

17. Costa MC, Leitão AL, Enguita FJ. Biogenesis and Mechanism of Action of Small Non-Coding RNAs: Insights from the Point of View of Structural Biology *Int. J Mol Sci* 2012; 13: 10268-10295.

18. Long G, Wang F, Duan Q et al. Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction. *PLoS One* 2012;7:e50926.

19. Menghini R, Casagrande V, Federici M. MicroRNAs in endothelial senescence and atherosclerosis. *J Cardiovasc Transl Res* 2013;6:924-930.

20. Dong S, Cheng Y, Yang J, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem* 2009; 284:29514–29525.

21. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010;31:2765-2773.

22. Vogel B, Keller A, Frese KS et al. Refining diagnostic microRNA signatures by whole-miRNome kinetic analysis in acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2013;59:410-418.

23. Costa M; Cortez-Dias N; Carrilho-Ferreira P et al. miR-375: novel biomarker for early prognostic stratification of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2012; 93(Supl):S11.

24. Engström AE, Vis MM, Bouma BJ, et al. Right ventricular dysfunction is an independent predictor for mortality in ST-elevation myocardial infarction patients presenting with cardiogenic shock on admission. *Eur J Heart Fail*. 2010; 12(3): 276–282.

25. Cheng JM, Helming AM, van Vark LC, et al. A simple risk chart for initial risk assessment of 30-day mortality in patients with cardiogenic shock from ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2016; 5(2): 101–107.
26. Lancellotti P, Price S, Edvardsen T, et al. The use of echocardiography in acute cardiovascular care: Recommendations of the European Association of Cardiovascular Imaging and the Acute Cardiovascular Care Association. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2014
27. Sutton NR, Li S, Thomas L, et al. The association of left ventricular ejection fraction with clinical outcomes after myocardial infarction: Findings from the Acute Coronary Treatment and Intervention Outcomes Network (ACTION) Registry-Get With the Guidelines (GWTG) Medicare-linked database. *Am Heart J*. 2016; 178: 65–73.
28. Ng VG, Lansky AJ, Meller S, et al. The prognostic importance of left ventricular function in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: the HORIZONS-AMI trial. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2014; 3(1): 67–77.
29. Smolina K, Wright FL, Rayner M, et al. Long-term survival and recurrence after acute myocardial infarction in England, 2004 to 2010. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2012; 5: 532–40.
30. Jernberg T, Hasvold P, Henriksson M, et al. Cardiovascular risk in post-myocardial infarction patients: nationwide real world data demonstrate the importance of a long-term perspective. *Eur Heart J*. 2015; 36: 1163–70.
31. Campo G, Saia F, Guastaroba P, et al. Prognostic impact of hospital readmissions after primary percutaneous coronary intervention. *Arch Intern Med*. 2011; 171: 1948–9.
32. Rapsomaniki E, Thuresson M, Yang E, et al. Using big data from health records from four countries to evaluate chronic disease outcomes: a study in 114 364 survivors of myocardial infarction. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2016; 2: 172–83.
33. Johansson S, Rosengren A, Young K, et al. Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017; 17: 53.
34. De-li Dong, Bao-feng Yang. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy, myocardial fibrosis and heart failure. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2011; 1 June 2011: 1-7.
35. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:872-875, doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.011.
36. Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013;13:12, doi: 10.1186/1471-2261-13-12.

37. De Rosa R, De Rosa S, Leistner D, et al. Transcoronary Concentration Gradient of microRNA-133a and Outcome in Patients With Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology*. 2017; 1:15-24
38. Aboyans V, Jean-Baptiste Ricco, Marie-Louise EL Bartelink, et al. ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2017; 39: 763-816.
39. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, et al. ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. The Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2013; 34: 2949-3003.
40. Sgarbossa E.B., Pinski S.L., Barbagelata A. et al.: Electrocardiographic diagnosis of evolving acute myocardial infarction in the presence of left bundle branch block. *N. Engl. J. Med*. 1996; 334: 481–487.
41. Galiuto L, Badano L, Fox K, Sicari R, Zamorano JL. *The EAE Textbook of Echocardiography*. Oxford University Press, London, 2011.
42. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. TIMI Study Group. *N Engl J Med* 1985; 312: 932-936.

STRESZCZENIE POLSKIE

Większość przypadków STEMI nie budzi wątpliwości w postawieniu właściwego rozpoznania i natychmiastowym wdrożeniu rewaskularyzacji. W pozostałych przypadkach czyli UA i NSTEMI problem jest już znaczący, niejednokrotnie prowadząc do przedłużania pobytów w izbach przyjęć, gdzie pacjent potencjalnie zagrożony oczekuje na diagnozę. Większość przypadków „ostrego” zamknięcia naczyń naczyniowych jesteśmy w stanie ocenić po obrazie elektrokardiogramu jednak wciąż zdarzają się przypadki gdzie EKG jest zawodną metodą. Również takie markery jak troponina mogą być w pierwszym oznaczeniu prawidłowe. Na chwilę obecną nie dysponujemy wiarygodnymi alternatywnymi testami obrazowymi i laboratoryjnymi, na podstawie których można przyspieszyć rozpoznanie i wdrożyć terapie.

Rosnące zainteresowanie miRNA rodzi nadzieję, iż zostaną zidentyfikowane nowe markery identyfikujące ostre zamknięcie tętnicy dozwolowej, a następnie uda się wyselekcjonować miRNA, które mają wartość rokowniczą po zawale serca i mogły by być wykorzystane jako potencjalne cele terapeutyczne.

Pomimo wdrożenia zaleceń farmakologicznych i modyfikacji stylu życia u chorych po zawale serca, redukcja ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych jest suboptymalna. W rejestrach tylko około 50% chorych, gdzie wdrożono optymalne leczenie, po zawale serca stosowało zalecono leki w prawidłowych dawkach, po 1-5 lat stosowania ok 40-70% z nich utrzymują stosowne dawki a tylko około 60% osiąga zalecane cele terapeutyczne (np. wartość LDL, ciśnienia tętniczego krwi, masy ciała).

Wobec tych danych, wydaje się, że należy poszukiwać wskaźników odpowiedzi na leczenie w obiektywnych badaniach obrazowych i laboratoryjnych, które pozwoliły by oceniać dynamikę zachodzących procesów aterosklerotycznych jak również mieć bezpośredni wgląd w blaszki miażdżycowe.

Dotychczasowe badania wykazały przydatność kliniczną oceny kompleksu intima-media tętnic szyjnych (CIMT – carotid intima-media thickness) w przewidywaniu ryzyka sercowo-naczyniowego, tj. zgonu sercowo-naczyniowego, zawału serca czy udaru niedokrwiennego mózgu. Natomiast dane dotyczące wielokrotnej oceny CIMT w czasie i dynamiki zmian grubości CIMT u chorych po zawale serca w aspekcie jego wartości klinicznej w prognozowaniu zmian ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych dotychczas stanowi przedmiot kontrowersji.

Cele pracy. Głównym celem pracy było wyodrębnienie diagnostycznych i rokowniczych wskaźników u chorych z zawałem serca.

Celami szczegółowymi pracy były:

- 1) Ocena ekspresji wybranych osoczowych miRNA związanych z niedokrwieniem mięśnia sercowego w ostrym zespole wieńcowym

- 2) Ocena ekspresji miRNA u chorych z ostrym zespołem wieńcowym z uniesieniem i bez uniesienia odcinka ST
- 3) Ocena zależności pomiędzy czynnikami demograficznymi, biochemicznymi z uwzględnieniem białek ostrej fazy i cytokin prozapalnych oraz miRNA u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego w obserwacji krótko- i długoterminowej
- 4) Próba wyodrębnienia miRNA ulegających ekspresji w zależności od typu zawału serca, obrazu klinicznego i angiograficznego
- 5) Ocena wartości prognostycznej zmian grubości kompleksu intima-media tętnic szyjnych u pacjentów po zawale mięśnia sercowego, stabilną chorobą wieńcową lub inną lokalizacją istotnych zmian miażdżycowych
- 6) Próba wyodrębnienia miRNA związanych z ryzykiem zdarzeń sercowo-naczyniowych w obserwacji odległej

Materiał. Do badania włączono 215 chorych po zawale serca (154 mężczyzn, w wieku $63,3 \pm 9,8$ lat), u których wykonano rewaskularyzację mięśnia sercowego oraz 71 kolejnych pacjentów (47 mężczyzn, w wieku $69,5 \pm 9,6$ lat), po niedawno (do 3 miesięcy) przebyłym epizodzie niedokrwinnym mózgu (CIE) związanym z istotnym ICAS, przyjętych w celu rewaskularyzacji tętnic szyjnych. U losowo wybranych 43 pacjentów z ACS pobrano krew do analizy miRNA.

Kryteria wyłączenia obejmowały: w grupie ACS: pacjenci z ostrą niewydolnością serca lub z zastoinową niewydolnością serca w klasach NYHA III i IV, ze zdiagnozowanym ACS, ale normalnymi tętnicami wieńcowymi. W grupie CIE: poprzednie CIE, brak spójności między stroną ICAS a neurologicznymi zmianami w tomografii komputerowej lub deficytach neurologicznych, stwierdzone podczas konsultacji neurologicznych. Pacjenci, którzy otrzymali leczenie fibrynolityczne z prawidłowymi tętnicami dogłównymi ponieważ może to sugerować inne niż ICAS etiologia CIE. Inne ogólne kryteria wykluczenia obejmowały pacjentów, którzy mieli zdiagnozowaną chorobę nowotworową, przeszłe lub obecne ogólnoustrojowe zapalenie, takie jak czynne przewlekłe zapalenie stawów, znaną lub podejrzaną infekcję bakteryjne lub wirusowe, pacjenci, którzy nie chcą brać udziału w niniejszym badaniu.

W badaniach z CIMT, dodatkowym kryterium wyłączenia była niemożność uzyskania diagnostycznego obrazu ultrasonograficznego umożliwiające ocenę CIMT.

Badania wchodzące w skład niniejszego cyklu publikacji zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Protokoły badań zostały ocenione i zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną. Wszyscy uczestnicy wyrazili zgodę na udział w badaniu.

Metodyka. U wszystkich chorych lub w odpowiednich podgrupach zostały wykonane: analiza

kliniczna obejmująca występowanie klasycznych czynników ryzyka miażdżycy, wywiad dotychczasowego przebiegu choroby, wykonanie zapisów EKG, pomiaru ABI, badań laboratoryjnych (stężenie kreatyniny, glukozy, profil lipidowy, stężenie hs-CRP, hs-TnT), ocena ekspresji osoczowych miRNA (miR-1, -16, -34a, -122, -124, -208b, 133a/b, -375, and -499), badanie ultrasonograficzne tętnic dogłowych metodą Doppler Duplex z pomiarem CIMT i blaszek miażdżycowych, badanie echokardiograficzne oraz koronarografię i rewaskularyzację.

W 2 spośród 3 prac oryginalnych, pacjenci zostali poddani obserwacji prospektywnej z oceną częstości występowania zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych (CVD), ACS i CIE, a także MACCE. Okres obserwacji wyniósł średnio 57 ± 25 (zakres 6 do 84 miesięcy).

Wyniki. W grupie pacjentów z ACS, w której analizowano obraz angiograficzny i ekspresję miRNA, stwierdzono: zamkniętą tętnicę wieńcową u 12 (75%) pacjentów spośród 16 z elektrokardiograficznym obrazem STEMI, oraz u 15 (56%) spośród 27 w grupie NSTEMI, co wskazuje na fakt, że zapis krzywej EKG nie determinuje obrazu angiograficznego tętnicy dozawałowej. Z wyjątkiem miR-134, którego poziom był 3,83-krotnie wyższy w grupie STEMI ($p < 0,025$) nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w ekspresji innych analizowanych miRNA pomiędzy chorymi z STEMI vs. NSTEMI. Natomiast, stwierdzono istotne statystycznie różnice w ekspresji miRNA, w zależności od obserwowanego przepływu w tętnicy dozawałowej. Pacjenci z zamkniętą IRA mieli 7-krotnie ($p < 0,05$) oraz 4,57-krotnie ($p < 0,05$) istotnie wyższe poziomy swoistych dla serca osoczowych miR-133a i miR-133b. Podobnie, specyficzne dla mózgu miRNA: miR-34a, -124 i -134 wykazały odpowiednio 5,50- ($p < 0,05$), 2,55- ($p < 0,025$) i 3,45-krotny ($p < 0,05$) wzrost w grupie z zamkniętą IRA w porównaniu do chorych z obecnym przepływem w dozawałowej tętnicy wieńcowej w skali TIMI 2 i 3.

Stężenie miR-134 charakteryzowała 87,5% czułość i 59,3% swoistość (AUC: 0,725, $p = 0,002$) dla różnicowania STEMI vs NSTEMI. Na podstawie ekspresji miR-134, 11 pacjentów prawidłowo zaklasyfikowano jako STEMI, a 20 jako NSTEMI.

Natomiast analizując drożność tętnicy dozawałowej, najsilniejszym diagnostycznym miRNA okazały się: miR-124 (AUC 0,787; $p < 0,001$; czułość 59%; swoistość 87%), miR-133b (AUC 0,704; $p = 0,006$; czułość 63%; swoistość 81%), miR-34a (AUC 0,697; $p = 0,009$; czułość 56%; swoistość 87%), miR-134 (AUC 0,686; $p = 0,016$; czułość 67%; swoistość 69%) i miR-133a (AUC: 0,640; $p = 0,049$; czułość 52%; swoistość 94%).

U pacjentów z ACS vs. CIE stwierdzono statystycznie wyższe stężenia osoczowego miR-124-3p (log 2-DCt $0,571 \pm 0,07$ vs. $-0,638 \pm 0,06$; $p < 0,001$), miR-134-5p (log 2-DCt $0,288 \pm 0,09$ vs. $-0,02 \pm 0,07$; $p = 0,012$), miR-208b--3p (log 2-DCt $-0,899 \pm 0,08$ vs. $-1,998 \pm 0,149$; $p < 0,001$), miR-34a-5p (log 2-DCt $0,238 \pm 0,08$ vs. $-0,248 \pm 0,07$; $p < 0,001$) i miR-499-5p (log 2-DCt $-0,899 \pm 0,08$

vs. $-1,176 \pm 0,07$; $p < 0,001$), a mniejszy poziom miR-16-5p ($\log 2\text{-DCt } -0,072 \pm 0,08$ vs. $1,962 \pm 0,103$, $p < 0,001$) i miR-122-5p ($\log 2\text{-DCt } -0,076 \pm 0,08$ vs. $1,892 \pm 0,09$; $p < 0,001$). Natomiast obserwowano u pacjentów z ACS i CIE podobne poziomy osoczowych miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b i miR-375.

W tej grupie podczas czteroletniego okresu obserwacji MACCE wystąpił u 23 (20,5%) pacjentów. W grupie CIE było osiem CVD (jedna z powodu CIE i siedem z powodu zawału serca) i pięć CIE niezakończonych zgonem. W grupie ACS było 10 ponownych ACS niezakończonych zgonem, podczas gdy nie odnotowano CVD ani CIE. Wykazano następujące predyktory MACCE: miR-208b-3p (HR = 1,225, 95% CI 1,092-1,375; $p = 0,001$), miR-34a-5p (HR = 0,963, 95 % CI 0,935-0,992, $p = 0,012$) i miR-499-5p (HR = 0,077, 95% CI 0,025-0,239; $p < 0,001$). Ponadto miR-208b, miR-34a i miR-499 uznano za niezależne czynniki ryzyka dla MI, CIE, oraz CVD. Wzrost poziomu miR-133b został zidentyfikowany jako czynnik ryzyka przyszłego CVD (HR = 1,009; CI 1,003–1,015; $p = 0,004$).

W grupie 215 pacjentów z ACS poddanych rewaskularyzacji po średnio 5 letniej obserwacji MACCE odnotowano u 65 (30,2%) pacjentów, w tym 10 CVD (9 MI zakończonych zgonem, 1 CIE zakończony zgonem), 42 MI niezakończone zgonem i / lub 15 CIE niezakończone zgonem. Ponowny MI wystąpił u 12 (5,6%) pacjentów w pierwszym roku obserwacji oraz u 26 (12,1%) pacjentów po 3 latach. Ponadto nawrót dławicy piersiowej odnotowano u 30 (14%) pacjentów (u 20 (9,3%) z nich z powodu CLP, a u 10 (4,7%) z powodu restenozy w stencie). Pacjenci z MACCE wraz CLP vs pacjenci bez zdarzeń sercowo-naczyniowych częściej chorowali na nadciśnienie tętnicze ($p=0,026$), mieli wyższe stężenie kreatyniny ($p=0,049$), hs-CRP ($p=0,001$) w surowicy oraz posiadali większą ilość czynników ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych ($p=0,058$).

W tej grupie wyjściowa wartość CIMT była podobna u pacjentów z MACCE i wolnych od MACCE ($1,43 \pm 0,40$ mm vs. $1,45 \pm 0,44$ mm, $p = 0,486$). Po średnio $36,5 \pm 29,3$ miesięcy zanotowano 2,7-krotnie większy roczny wzrost CIMT u pacjentów z MACCE vs bez MACCE ($0,024 \pm 0,12$ mm vs. $0,009 \pm 0,16$ mm / rok; $p < 0,001$). Podobne wnioski dotyczyły re-oceny CIMT przeprowadzonej po średnio $53,3 \pm 37,1$ miesięcy ($0,050 \pm 0,1$ mm vs. $0,001 \pm 0,1$ mm / rok, $p < 0,001$).

U pacjentów, u których roczna zmiana CIMT wskazywała na istotną redukcję zmian miażdżycowych (1. kwartyl dla rocznej zmiany CIMT) obserwowano istotnie niższą liczbę ponownych zawałów serca i wystąpienia dławicy piersiowej de novo, w porównaniu z osobami z roczną zmianą CIMT w 2., 3. i 4. kwartylu ($p = 0,008$) oraz w porównaniu do czwartego kwartyłu ($p < 0,001$). Krzywa przeżycia Kaplana-Meiera dla pierwszego kwartylu wynosiły odpowiednio 100%, 97,8% i 88,4%, a dla czwartego kwartyłu: 92,6%, 76,6% i 61,0% (odpowiednio w pierwszym, trzecim i piątym roku obserwacji).

Ryzyko MACCE było związane z roczną progresją CIMT $> 0,003$ mm / rok (HR 1,01; 95% CI 1,003 – 1,017; $p=0,006$) i poziomem kreatyniny w surowicy (HR 3,00; 95% CI 1,496 – 6,016; $p < 0,001$).

Roczny przyrost CIMT > 0,003 mm/rok, poziom kreatyniny w surowicy i hiperlipidemia w wywiadzie były niezależnie związane z ryzykiem ponownego zawału serca (odpowiednio: HR 4,59; 95% CI 1,591 – 13,217; p=0,005; HR 1,01; 95% CI 1,003 – 1,017; p=0,004; HR 3,15; 95% CI 1,271 – 7,784; p=0,013), oraz zawału serca + nawrotu stenokardii spowodowany CLP (HR 2,95; 95% CI 1,378 – 6,323; p<0,001; HR 1,01; 95% CI 1,004 – 1,018; p=0,002; HR 3,50; 95% CI 1,759 – 6,964; p=0,005). Progresja CIMT > 0,003 mm /rok wiązała się także ze wzrostem ryzyka MACCE. Roczny wskaźnik progresji CIMT wynoszący 0,003 mm / rok był najlepszym predyktorem MACCE, ponownego MI i CLP, z zadowalającą czułością (między 80% a 84,5%), ale małą swoistością od 47% do 49,3% (AUC między 0,638 a 0,673).

Wnioski

Z wyjątkiem aktywności miR-134-5p, którego ekspresja była 3,8-krotnie wyższa w grupie STEMI w porównaniu do NSTEMI, nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji miRNA w zależności od prezentacji ACS w badaniu elektrokardiograficznym.

Ekspresja miRNA wydzielanych pod wpływem ostrego niedokrwienia serca może przyczyniać się do identyfikacji pacjentów z niedrożną tętnicą dozawałową, tj. wymagających pilnej koronarografii i rewaskularyzacji wieńcowej

Wysoką swoistość w identyfikacji niedrożnej tętnicy dozawałowej wykazano dla miR-134-5p (mechanizm ACS związany z pęknięciem blaszki, aktywacją płytek i powstaniem skrzepu), miR-124-3p oraz miR-34a-5p, związanych z proliferacją komórek, promowaniem apoptozy i włóknieniem pozawałowym, oraz miR-133a-3p i miR-133b wydzielanych z uszkodzonych kardiomiocytów i będących odzwierciedleniem ich stopnia uszkodzenia.

U pacjentów z ostrym niedokrwieniem mózgu i serca obserwowano podobną ekspresję osoczowych miR-1-3p, miR-133a-3p oraz miR-133b co mogłoby wskazywać na wspólny mechanizm ostrego niedokrwienia w destabilizacji i pęknięciu blaszki miażdżycowej.

Ekspresja niektórych miRNA zależy od lokalizacji niedokrwienia. Możliwe, że wyższe stężenia miR-16-5p oraz miR-122-5p u chorych z CIE, można tłumaczyć rolą aktywacji makrofagów, apoptozy, i uszkodzeniem śródbłonna dominujących w ostrym niedokrwieniu mózgu w przebiegu zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej. Natomiast wyższą aktywność miR-124-3p, miR-134-5p, miR-34a-5p, miR-208b-3p oraz miR-499-5p u chorych z ACS można wytłumaczyć ich wysoką swoistością dla kardiomiocytów i rolą zakrzepu w tętnicy wieńcowej.

W obserwacji 5-letniej, wyższe ryzyko MACCE występowało u chorych z wyższą ekspresją miR-208b (promotor niewydolności serca), a CVD ze wzrostem ekspresji miR-133b i promowaniem apoptozy. Natomiast ekspresja miR-499 oraz miR-34a wiązały się z redukcją ryzyka MACCE, co w przypadku miR-34a, można tłumaczyć zahamowaniem apoptozy poprzez zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego p53 oraz bezpośrednim hamowaniem Bcl-2, Cdk-4 oraz receptora Met.

Wyjściowa ocena grubości kompleksu intima-media u chorych po ACS nie jest czynnikiem rokowniczym przyszłych MACCE. Dopiero, ocena zmiany CIMT w seryjnych pomiarach w obserwacji odległej może być przydatnym parametrem oceny.

Ryzyko MACCE, ponownego zawału serca i wystąpienia dławicy piersiowej de novo, wiąże się niezależnie z roczną progresją CIMT $> 0,003$ mm/rok (czułość: 80-84,5%, swoistość: 47- 49,3%). Wykazano, że stężenie kreatyniny w surowicy i hiperlipidemia w wywiadzie są niezależnie związane z ryzykiem zdarzeń sercowo-naczyniowych.

Pomimo stosowania BMT i zaleceń pro zdrowotnych modyfikacji stylu życia zgodnie z wytycznymi towarzystw kardiologicznych, redukcję zmian miażdżycowych w tętnicach szyjnych obserwuje się u mniej niż 1/3 chorych po ACS.

Przeżycie wolne od MACCE, w 1, 3 i 5 roku obserwacji, u pacjentów, u których uzyskano istotną redukcję miażdżycy w tętnicach szyjnych wyniosło 100%, 97,8% i 88,4% (1 kwartył Δ CIMT $< - 0,014$ mm/rok) w porównaniu do pacjentów z dużą progresją zmian miażdżycowych: 92,6%, 76,6% i 61,0% (4 kwartył Δ CIMT $> 0,056$ mm/rok).

Systematyczna kontrola CIMT może być przydatnym narzędziem w prognozowaniu przyszłych MACCE u chorych po ACS w prewencji wtórnej. Redukcja CIMT potwierdza skuteczność BMT u indywidualnego chorego. Natomiast progresja CIMT u chorych leczonych farmakologicznie wskazuje na fakt konieczności intensyfikacji działań pro zdrowotnych

ABSTRACT

In most cases of STEMI we have no doubts in the right diagnosis and implementation of revascularization. In other cases, ie UA and NSTEMI, the problem is already significant, often leading to extending stays in emergency rooms where the patient potentially at risk awaits a diagnosis. Most cases of "acute" occlusion of the epicardial vessels can be assessed after the ECG, but there are still cases where ECG is an unreliable method. Also markers such as troponin in the first assay can be at right level. At the moment, we do not have reliable alternative imaging and laboratory tests, on the basis of which we can accelerate the diagnosis and implementation of therapies.

The growing interest of miRNA gives the hope that new markers will be identified that indicate acute occlusion of the infarct-related artery, and then manage to select miRNAs that have prognostic value after myocardial infarction and could be used as potential therapeutic targets.

Despite the implementation of pharmacological recommendations and lifestyle modifications in patients after myocardial infarction, the reduction in the risk of cardiovascular events is suboptimal. In the registers, only about 50% of patients after MI, where optimal treatment was implemented, used prescribed drugs in the correct doses.

In view of these data, it seems that we should look for indicators of response to treatment in objective imaging and laboratory tests that would allow to evaluate the dynamics of atherogenic processes as well as to have direct insight into atherosclerotic plaques.

Previous studies have demonstrated the clinical usefulness of carotid intima-media thickness (CIMT) assessment in predicting cardiovascular risk, i.e. cardiovascular death, myocardial infarction or ischemic stroke. However, data on multiple CIMT assessment over time and the dynamics changes of CIMT in patients after myocardial infarction in terms of its clinical value in predicting cardiovascular events so far it has been the subject of controversy.

Objectives. The main goal of the study was to identify diagnostic and prognostic indicators in patients with myocardial infarction.

The detailed objectives of the work were:

- 1) Evaluation of selected plasma miRNAs associated with myocardial ischemia in acute coronary syndrome
- 2) Evaluation of miRNA expression in patients with STEMI or NSTEMI
- 3) Assessment of the relationship between demographic and biochemical factors including acute phase proteins and proinflammatory cytokines and miRNA in patients with myocardial infarction in short- and long-term observation
- 4) Attempt to isolate miRNAs expressed depending on the type of myocardial infarction, clinical and angiographic picture

5) Evaluation of the prognostic value of CIMT changes in patients after myocardial infarction, stable coronary disease or other location of significant atherosclerotic lesions

6) Attempt to isolate miRNAs associated with the risk of cardiovascular events in long-term follow-up

Material. The study included 215 patients with MI (154 men, aged 63.3 ± 9.8 years) who underwent revascularization and 71 consecutive patients (47 men, aged $69,5 \pm 9.6$ years), after a recent (up to 3 months) CIE associated with significant ICAS, admitted for the purpose of revascularization of the carotid arteries. In randomly selected 43 patients with MI, blood was collected for miRNA analysis. Patients were enrolled at the Department of Invasive Cardiology, E. Szczeklik's Hospital, Tarnow and Department of Interventional Cardiology, Jagiellonian University School of Medicine, the John Paul II Hospital, Krakow

Methods. In all patients or in appropriate subgroups: clinical analysis including the occurrence of classic atherosclerosis risk factors, previous history of cardiovascular disease, performed interventions and pharmacological treatment, ECG, ABI measurement, laboratory tests (creatinine, glucose, lipid profile, hs-CRP concentration, hs-TnT), evaluation of plasma miRNA expression (miR-1, -16, -34a, -122, -124, -208b, 133a / b, -375, and -499), ultrasound examination of the Doppler Duplex arteries with measurement CIMT and atherosclerotic plaques, echocardiography and coronary angiography with subsequent coronary revascularisation.

In 2 out of the 3 original papers, patients were prospectively observed with the assessment of the incidences of CVD, ACS and CIE, as well as MACCE. The follow-up period was 57 ± 25 months (range 6 to 84 months).

Results. In the first study enrolling subgroup of patients with ACS, in which the angiographic images and miRNA expression were analysed, there were: occluded coronary arteries in 12 (75%) patients out of 16 with STEMI, and 15 (56%) out of 27 in the NSTEMI group, which indicates the fact that the ECG does not determine the angiographic picture of the infarct-related artery. With the exception of miR-134, whose level was 3.83 times higher in the STEMI group ($p < 0.025$), no statistically significant difference in the expression of other analyzed miRNAs was seen between patients with STEMI vs. NSTEMI. In contrast, discrimination of patients according to the target vessel occlusion criteria revealed that patients with the occluded IRA had significantly higher levels of circulating cardiac specific miR-133a and miR-133b, with the change fold: 7.00 ($p < 0.05$) and 4.57 ($p < 0.05$), respectively (Fig. 1). Similarly, brain specific miR-34a, -124 and -134 showed significant increase in the occluded group: 5.50 ($p < 0.05$), 2.55 ($p < 0.025$) and 3.45 ($p < 0.05$), respectively.

In case of the STEMI/NSTEMI group, the most predictive miRNA (miR-134) achieved AUC values of up to 0.725. Using miR-134 discrimination, 11 subjects were correctly classified as STEMI and 20 as NSTEMI with a sensitivity of 87.5% and specificity of 59.3% (AUC: 0.725, $p=0.002$).

The strongest diagnostic miRNA of patency of the infarct-related artery were: miR-124 (AUC 0.787, $p < 0.001$, sensitivity 59%, specificity 87%), miR-133b (AUC 0.704, $p = 0.006$, sensitivity 63%, specificity 81%), miR-34a (AUC 0.697, $p = 0.009$, sensitivity 56%, specificity 87%), miR-134 (AUC 0.686, $p = 0.016$, sensitivity 67%, specificity 69%) and miR-133a (AUC: 0.640; $p = 0.049$, sensitivity 52%, specificity 94%).

In the second study, in ACS patients, as compared to CIE patients, there was a statistically significant increase of circulating miR-124-3p (log 2-DCt 0.571 ± 0.07 vs. -0.638 ± 0.06 ; $p < 0.001$), miR-134-5p (log 2-DCt 0.278 ± 0.09 vs. -0.02 ± 0.07 ; $p = 0.012$), miR-208b- 3p (log 2-DCt -0.899 ± 0.08 vs. -1.998 ± 0.149 ; $p < 0.001$), miR-34a-5p (log 2-DCt 0.238 ± 0.08 vs. -0.248 ± 0.07 ; $p < 0.001$), and miR-499-5p (log 2-DCt -0.899 ± 0.08 vs. -1.176 ± 0.07 ; $p < 0.001$). Decreased levels of miR-16-5p (log 2-DCt -0.072 ± 0.08 vs. 1.962 ± 0.103 ; $p < 0.001$) and miR-122- 5p (log 2-DCt -0.076 ± 0.08 vs. 1.892 ± 0.09 ; $p < 0.001$) were found. In contrast, patients with ACS and CIE have similar plasma levels of miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b and miR-375.

During a four-year follow-up period, MACCE occurred in 23 (20.5%) subjects. In the CIE group there were eight CVDs (one due to CIE and seven due to MI) and five non-fatal CIEs. In the ACS group there were 10 non-fatal MIs, while no CVD or CIE were noted.

The multivariate Cox proportional hazard analysis revealed the following predictors of MACCE: miR-208b-3p (HR = 1.225, 95% CI 1.092–1.375; $p = 0.001$), miR-34a-5p (HR = 0.963, 95% CI 0.935–0.992; $p = 0.012$), and miR-499-5p (HR = 0.077, 95% CI 0.025–0.239; $p < 0.001$). Furthermore, the levels of circulating miR-208b, miR-34a, and miR-499 occurred as independent risk factors for composite and each individual end-point (MI, CIE, and CVD). Levels of miR-133b were identified as risk factors of future CVD (HR = 1.009; CI 1.003–1.015; $p = 0.004$).

In the last study, in a group of 215 patients with ACS undergoing revascularization, during median 60 months follow-up period, MACCE was recorded in 65 (30.2%) patients, including 10 CVDs (9 MIs/sudden cardiac, 1 IS), 42 non-fatal MIs and/or 15 non-fatal ISs. Recurrent MI occurred in 12 (5.6%) subjects during first year of follow-up, and in 26 (12.1%) at 3 years. Additionally, angina recurrence in CCS classes II-III was noted in 30 (14%) patients, of which new angina due to CLP was observed in 20 (9.3%) patients, while due to in-stent restenosis in 10 (4.7%), as evidenced with coronary angiography. Subjects in whom MACCE plus CLP occurred, as compared to MACCE-free subgroup were more often hypertensive ($p=0.026$), had higher levels of serum creatinine ($p=0.049$) and hs-CRP ($p=0.001$), and

higher mean number of cardiovascular risk factors among hypertension, hyperlipidaemia, diabetes, cigarette smoking ($p=0.058$).

Initial CIMT values were similar in patients who suffered MACCE and event-free patients (1.43 ± 0.40 mm vs. 1.45 ± 0.44 mm; $p=0.486$). At first CIMT reassessment during the mean follow-up period of 36.5 ± 29.3 months, patients in whom MACCE occurred had 2.7-fold greater annual CIMT growth as compared to event-free subset of patients (0.024 ± 0.12 vs. 0.009 ± 0.16 mm/year; $p<0.001$). Similar findings concerned the final CIMT reassessment performed during the mean follow-up period of 53.3 ± 37.1 months (0.050 ± 0.1 vs. 0.001 ± 0.1 mm/year; $p<0.001$, respectively).

In patients in whom annual CIMT change showed clear carotid atherosclerosis reduction (1st quartile for annual CIMT change), significantly lower number of recurrent MI and new angina due to CLP was observed, as compared to subjects with annual CIMT changes in the 2nd, 3rd and 4th quartiles ($p=0.008$ by log rank test), and as compared to the 4th quartile ($p<0.001$ by log rank test). The Kaplan-Meier free-survival curves were 100, 97.8 and 88.4% at 1, 3 and 5 years for 1st quartile, while 92.6, 76.6 and 61.0% for the 4th quartile, respectively.

Risk of MACCE was associated independently with the annual CIMT progression >0.003 mm/y (HR 1.01; 95% CI 1.003 – 1.017; $p=0.006$) and serum creatinine level (HR 3.00; 95% CI 1.496 – 6.016; $p<0.001$). Recurrent MI, as well as recurrent MI and new angina due to CLP were associated with the annual CIMT progression >0.003 mm/y, serum creatinine level, and history of hyperlipidaemia.

The CIMT change occurred an independent indicator of MACCE, recurrent MI and MI plus CLP with an optimal cut-off value of CIMT progression rate of >0.003 mm/year for all study end-points. Yet, the annual CIMT progression rate of 0.003 mm/year was the best predictor of MACCE, recurrent MI and CLP, associated with fairly good sensitivity (between 80% and 84.5%), it demonstrated only mild specificity between 47% and 49.3% (AUC between 0.638 and 0.673).

Conclusions.

With the exception of miR-134, whose level was 3.83 times higher in the STEMI group, no statistically significant difference in the expression of other analyzed miRNAs was seen between patients with STEMI vs. NSTEMI.

Expression of miRNA secreted in of acute cardiac ischemia may contribute to the identification of patients with culprit occlusion, i.e. requiring urgent coronary angiography and coronary revascularization

High specificity in the identification of occluded infarct-related artery was demonstrated for miR-134-5p (ACS mechanism associated with plaque rupture, platelet activation and clot formation), miR-124-3p and miR-34a-5p, associated with cell proliferation, promotion of apoptosis and post-infarction

fibrosis and miR-133a-3p and miR-133b secreted from damaged cardiomyocytes and reflecting their degree of damage.

In patients with acute cerebral and heart ischemia, similar expression of plasma miR-1-3p, miR-133a-3p and miR-133b was observed, which could indicate a common mechanism of acute ischemia in the destabilization and rupture of atherosclerotic plaque.

The expression of some miRNAs depends on the location of ischemia. It is possible that higher concentrations of miR-16-5p and miR-122-5p in CIE patients can be explained by the role of macrophage activation, apoptosis, and endothelial injury dominating in acute cerebral ischemia in the course of internal carotid artery stenosis. However, the higher activity of miR-124-3p, miR-134-5p, miR-34a-5p, miR-208b-3p and miR-499-5p in patients with ACS can be explained by their high specificity for cardiomyocytes and the role of a thrombus in the coronary artery.

In a 5-year follow-up, higher MACCE risk occurred in patients with higher expression of miR-208b (heart failure promoter) and CVD with increased miR-133b expression and promotion of apoptosis. In contrast, the expression of miR-499 and miR-34a was associated with the reduction of MACCE risk, which in the case of miR-34a, can be explained by the inhibition of apoptosis by inhibiting the activity of the transcription factor p53 and direct inhibition of Bcl-2, Cdk-4 and the Met receptor.

The initial assessment of intima-media thickness in patients after ACS is not a prognostic factor of future MACCE. It is only, when assessing CIMT changes in serial measurements in a long-term observation, can be a useful evaluation parameter.

The risk of MACCE, recurrent myocardial infarction and de novo angina pectoris is associated with an annual CIMT progression of > 0.003 mm / year (sensitivity: 80-84.5%, specificity: 47- 49.3%). It has been shown that serum creatinine and hyperlipidemia are independently associated with the risk of cardiovascular events.

Despite the use of BMT and pro-health recommendations for lifestyle modification in accordance with the guidelines of cardiological societies, reduction of atherosclerotic lesions in carotid arteries is observed in less than one third of patients after ACS.

The MACCE-free survival at 1, 3 and 5 years of follow-up in patients with significant carotid atherosclerosis reduction was 100%, 97.8% and 88.4% (1 quartile Δ CIMT $< - 0.014$ mm / year) compared to patients with high progression of atherosclerotic lesions: 92.6%, 76.6% and 61.0% (4 quartile Δ CIMT > 0.056 mm / year).

Systematic CIMT control can be a useful tool in predicting future MACCE in patients after ACS in secondary prevention. CIMT reduction confirms the effectiveness of BMT in an individual patient. In contrast, CIMT progression in pharmacologically treated patients indicates the need to intensify pro-health activities.

PRACE WCHODZĄCE W CYKL PUBLIKACJI

Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome

Jacek Gacoń, Anna Kabłak-Ziembicka, Ewa Stępień, Francisco J. Enguita, Izabela Karch, Bogusław Derlaga, Krzysztof Żmudka, Tadeusz Przewłocki

DOI: 10.5603/KP.a2015.0174

Kardiol Pol 2016;74(3):280-288.

Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome

Jacek Gacoń¹, Anna Kablak-Ziembicka², Ewa Stępień³, Francisco J. Enguita⁴, Izabela Karch², Bogusław Derlaga¹, Krzysztof Żmudka², Tadeusz Przewlocki⁵

¹Department of Invasive Cardiology, The Edward Szczeklik Hospital, Tarnow, Poland

²Department of Interventional Cardiology, Institute of Cardiology, Jagiellonian University Medical College, John Paul II Hospital, Krakow, Poland

³Department of Medical Physics, Faculty of Physics, Astronomy, and Applied Informatics, Jagiellonian University, Krakow, Poland

⁴Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

⁵Department of Cardiac and Vascular Diseases, Department of Interventional Cardiology, Institute of Cardiology, Jagiellonian University Medical College, John Paul II Hospital, Krakow, Poland

Abstract

Background: Coronary artery occlusion does not always manifest with ST-elevation, and some patients can have patent coronary vessel.

Aim: We evaluated circulating microRNA (miRNA) profiles to discriminate subjects with infarct-related artery (IRA) occlusion.

Methods and results: Patients (n = 43) with uncomplicated acute coronary syndrome and positive troponins were classified with respect to patent vs. occluded IRA or ST-elevation vs. non-ST elevation MI (STEMI vs. NSTEMI). Expression levels of serum miRNAs (miR-1, -16, -34a, -122, -124, -208b, -133a/b, -375, and -499) were analysed. Out of 16 STEMI and 27 NSTEMI patients, IRA occlusion was noted in 12 and 15 patients, respectively. The remaining four STEMI and 12 NSTEMI patients had patent IRA. STEMI patients had higher troponin T levels and a 3.83-fold higher miR-134 expression (p < 0.025). Patients with the occluded vs. patent IRA had higher levels of miR-133a (fold change: 7.00), miR-133b (4.57), miR-34a (5.50), miR-124 (2.55), and miR-134 (3.45) but no difference in troponin T levels. Receiver operator characteristic analysis identified decision-making miRNAs in occluded vessels: miR-124 (AUC: 0.787, p < 0.001), miR-133b (AUC: 0.704, p = 0.006), and miR-134 (AUC: 0.686, p = 0.016). With respect to STEMI, only miR-134 showed a discriminating value (AUC: 0.725, p = 0.002).

Conclusions: The degree of IRA occlusion determines circulating miRNA expression, and specific miRNAs may be useful in indicating patients requiring urgent coronary revascularisation.

Key words: acute coronary syndrome, mRNA, infarct-related artery, STEMI, NSTEMI, occluded

Kardiol Pol 2016; 74, 3: 280–288

INTRODUCTION

In acute coronary syndrome (ACS), early detection and implementation of a specific treatment and revascularisation determines preservation of the viable myocardium, according to the principle “time is muscle”. Prompt regaining of the culprit vessel patency to restore myocardial perfusion significantly reduces the early and late mortality, and minimises the number of adverse events related to the post-ACS remodelling [1].

Currently, the ACS management focuses on: (1) electrocardiography (ECG), which distinguishes between ST-elevation (STEMI) and non-ST-elevation myocardial infarction (NSTEMI), (2) provided symptoms, and (3) positive tests for myocardial necrosis. Usually, STEMI is accompanied by epicardial coronary artery occlusion, whereas myocardial necrosis without ST-elevation is associated with the patent but stenosed coronary vessel [2].

Address for correspondence:

Jacek Gacoń, MD, Department of Invasive Cardiology, The Edward Szczeklik Hospital, ul. Szpitalna 13, 33–100 Tarnów, Poland, e-mail: jgacon@o2.pl

Received: 06.01.2015 Accepted: 03.08.2015 Available as AoP: 09.09.2015

Kardiologia Polska Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne 2016

However, numerous data indicate the possibility of infarct-related coronary artery (IRA) occlusion in the absence of ST-elevation, or specific changes connected with circumflex artery occlusion (such as ST abnormalities cause mirror changes in the V1–V3 leads or ST elevation in additional V7–V9 leads), which unfortunately leads to delays in diagnosis and revascularisation therapy [2].

Nevertheless, apart from ECG no specific markers have been proposed that could differentiate ACS with patent or occluded IRA. Recently, new potential diagnostic and prognostic biomarkers in ACS patients have emerged, e.g. heart-specific fatty acid-binding protein, copeptin, and matrix metalloproteinase-9 or carotid intima-media thickness [3, 4]. Particularly, when combined with cardiac-specific troponin they have the potential to improve the accuracy of diagnostics and prognosis in ACS. However, none of them is useful to distinguish between a patent and occluded infarct artery.

Circulating microRNAs (miRNAs) are recognised as small non-coding RNAs released from the ischaemic, damaged cells or as an instrument of communication in microvesicles. Those molecules consist of 19 to 25 non-coding nucleotides that regulate gene expression by hybridising to messenger RNAs (mRNAs) and causing mRNA degradation or translational inhibition [5]. Both atherosclerosis initiation and progression are regulated by these small non-coding sequences. Recent studies have shown that some miRNAs expression levels are modulated in ischaemic conditions [6]. Among them, serum levels of several miRNAs, are thought to be associated with organ ischaemia: abundant in human heart (miR-1, miR-133a/b, miR-208b and miR-499-5p), brain-secreted (miR-34a, miR-124 and miR-134), liver (miR-122), and pancreas (miR-375) [7]. Our selection criteria for miRNAs were mainly set based on previous reports analysing the potential usefulness of miRNAs as novel biomarkers of myocardial damage [8, 9]. The serum miR-16 recommended for humans was used as a housekeeping miR in our study [10].

The purpose of our research was to evaluate the levels of selected serum miRNAs (miR-1, -34a, -122, -124, 133a/b, -134, -208b, -375, and -499-5p), as well as markers depending on the ST changes on ECG and IRA patency in subjects with uncomplicated ACS admitted for coronary angiography and possible intervention procedure. Particularly, we intended to evaluate the impact of IRA occlusion on the expression of circulating miRNAs.

METHODS

Study group

The study comprised 43 consecutive patients ($n = 34$ male) in mean age 57.5 ± 9.9 years (range 40–79) admitted to the Department of Invasive Cardiology, The Edward Szczylik Hospital in Tarnow (Poland). Subjects had diagnosed uncomplicated myocardial infarction according to the European

Society of Cardiology (ESC)/American Heart Association (AHA) redefined guidelines. All patients underwent urgent coronary angiography and subsequent coronary intervention according to accepted ESC/AHA guidelines.

Inclusion criteria were as follows: age over 18 years old, and the presence of an infarct-related lesion in coronary artery identified during routine coronary angiography. Exclusion criteria included: any clinical signs of heart failure (in Killip classes II, III, and IV) observed before catheterisation, prior fibrinolysis, mechanical or electrical complications of ACS, left bundle branch block on ECG, anticoagulation, known malignant disease, active or chronic infection, or other inflammatory disease (e.g. systemic inflammation such as active chronic arthritis). All subjects signed an informed consent form in accordance with the requirements of the institutional local Ethics Committee. The study was performed consistent with the requirements of the Declaration of Helsinki.

According to ECG criteria, subjects were classified as STEMI ($n = 16$) and NSTEMI ($n = 27$). Moreover, according to angiographic image, subjects were allocated to groups with patent vs. occluded IRA.

The distribution of classic risk factors (diabetes, hyperlipidaemia, arterial hypertension, smoking current or previous) was recorded (Table 1). Definitions of hypertension, diabetes, and hyperlipidaemia were adopted from the scientific statements of the ESC (<http://www.escardio.org>).

Coronary angiography and revascularisation procedure

Coronary angiography was performed from the femoral or radial approach by the Seldinger technique. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) flow grade scale was used to assess the target vessel patency. During coronary angiography, patients were classified into two groups with respect to flow grades. Patients who had TIMI flow grade 0 or 1 constituted the occluded IRA group, and patients revealing 2 or 3 TIMI flow comprised the IRA patent group, as previously described. All cineangiograms were reviewed by two independent observers.

Dual antiplatelet therapy (loading dose of acetylsalicylic acid [ASA] 300 mg and clopidogrel 600 mg) was administered upon ACS recognition before coronary angiography. During the procedure unfractionated heparin was administered according to patient weight and activated clotting time. IIb/IIIa glycoprotein inhibitors were used at the operator's discretion. Other medications, such as analgesics and beta-blockers were administered according to clinical indications.

During revascularisation procedure, thrombectomy was attempted in the case of coronary occlusion or visible thrombus formation. IRA was routinely stented, predilatation, and bare metal or drug eluting stent choice depended on the clinical circumstances and operator's decision.

Table 1. Patients characteristics

	STEMI (n = 16)	NSTEMI (n = 27)	P	Occluded (n = 27)	Patent (n = 16)	P
Epidemiology						
Age [years]	57.5 ± 9.64	57.6 ± 10.42	0.97	58.9 ± 11.22	55.2 ± 7.50	0.25
Male	14 (87%)	20 (74%)	0.29	23 (85%)	11 (68%)	0.20
Body mass index [kg/m ²]	30.1 ± 4.83	28.1 ± 4.95	0.19	29.1 ± 4.83	28.5 ± 5.28	0.69
Hypertension	13 (81%)	20 (74%)	0.59	21 (77%)	12 (75%)	0.78
Diabetes	9 (53%)	11 (40%)	0.32	13 (46%)	7 (43%)	0.95
Smoking	10 (62%)	19 (70%)	0.59	19 (70%)	10 (62%)	0.59
PAOD	1 (5%)	5 (18%)	0.26	4 (14%)	2 (12%)	0.83
Previous IS	1 (5%)	0 (0%)	0.18	0 (0%)	1 (6%)	0.18
Biochemistry						
hs-TnT _{max} (Q1–Q3) [ng/mL]	2.40 (0.73–7.93)	0.38 (0.16–1.62)	0.006	0.77 (0.16–3.06)	0.72 (0.22–2.72)	0.92
Creatinine [mmol/L]	78 ± 15.52	77 ± 15.0	0.84	77 ± 14.1	79 ± 16.9	0.70
Glucose (Q1–Q3) [mmol/L]	6.6 (6.0–9.4)	6.9 (5.5–7.8)	0.46	6.7 (5.9–7.9)	6.8 (5.7–9.6)	0.90
Total cholesterol [mmol/L]	5.5 ± 0.91	5.7 ± 1.64	0.65	5.7 ± 1.22	5.4 ± 1.7	0.37
LDL-C (Q1–Q3) [mmol/L]	3.3 (2.88–4.16)	4.0 (3.2–4.4)	0.31	3.8 (3.1–4.3)	3.6 (3.0–4.3)	0.92
HDL-C (Q1–Q3) [mmol/L]	1.2 (1.0–1.5)	1.1 (0.9–1.4)	0.59	1.2 (0.9–1.4)	1.1 (0.9–1.4)	0.96
Triglycerides (Q1–Q3) [mmol/L]	1.0 (0.8–2.1)	1.5 (1.0–2.9)	0.34	1.2 (0.9–2.0)	1.5 (0.8–2.5)	0.65
Various						
ABI (Q1–Q3)	1.13 (0.99–1.19)	1.04 (0.88–1.21)	0.31	1.08 (0.96–1.19)	1.05 (0.90–1.21)	0.73
LVEF (Q1–Q3) [%]	55 (52–63)	57 (51–63)	0.59	55 (50–60)	56 (52–60)	0.54
Pain onset (Q1–Q3) [h]	3 (1.7–6)	9 (5–20)	< 0.001	6 (3–13)	7 (3.5–19)	0.53

Values are given as mean and standard deviation (SD), median with interquartile interval (Q1–Q3), or the number and percentage (%). Bold value denotes statistically significant differences between both groups; ABI — ankle-brachial index; HDL-C — high-density lipoprotein cholesterol; hs-TnT_{max} — highly-sensitive troponin T; LDL-C — low-density lipoprotein cholesterol; LVEF — left ventricular ejection fraction; PAOD — peripheral artery occlusive disease; IS — ischaemic stroke

Laboratory tests

The standard blood tests included serum glucose, hs-C-reactive protein, fibrinogen levels and lipid profile assessment. Serial hs-troponin T levels (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) were obtained, and the maximum hs-troponin T values were analysed (hs-TnT_{max}).

MicroRNA extraction

Blood samples for candidate miRNAs were collected on patient admission to the cardiac unit, after heparin treatment. Samples were allowed to coagulate for 30 min, centrifuged, and sera were frozen at –80°C until miRNA and selected biomarkers analysis. Extraction of miRNA was performed by means of the miRNeasy Serum/Plasma Kit (kat. No 217184, Qiagen) with the initial lysis by Trizol LS Reagent (kat. No 10296-028, Invitrogen). The RNA yield and concentrations were determined by capillary electrophoresis on an Agilent Bioanalyser 2100 with the Eukaryote Total RNA Pico Chip (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara CA). An average 60 ± 31.9 pg/mL of total RNA from 300 mL of serum was recovered.

Profiling of candidate miRNAs

At the time of the study, Exiqon LNA primers were used to quantify 10 mature miRNAs using the ViiA 7 real-time polymerase chain reaction (PCR) system equipped with a 384-well reaction plate (Life Technologies). RNA was converted to cDNA using the Universal cDNA Synthesis Kit (kat. No. EQ-203300, Exiqon). Before synthesis, RNAs were spiked with a synthetic miRNA that served as a control for the cDNA synthesis reaction. Real-time PCR was performed in triplicate with SYBR Green master mix Universal RT (kat. No. EQ-203400, Exiqon) using standard conditions. The organ-specific candidate miRNAs were selected: cardiac and skeletal muscle (miR-1, -133a, -133b, -208b, -499), brain-related (miR-34a, -124, -134), liver (miR-122), pancreas (miR-375), and a reference miR for serum (miR-16).

Data were processed by the delta-delta-Ct method (2^{-ΔΔCt}), using a global normalisation approach as implemented in the open source DataAssist software (Life Sciences). The fold changes (RQ) in patented vs. occluded vessels and STEMI vs. NSTEMI patients were calculated. Hierarchical clustering of median-normalised miRNA values was performed using Cluster 3.0 software [11].

Statistical analysis

It was established whether the continuous data followed the normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables are presented as the mean value \pm standard deviation (SD). Categorical variables were expressed as absolute values, percentages, or both and compared by means of χ^2 or Fisher test. Differences between mean values were verified using the Student's t test when the distribution of variables was normal, in other cases applying the test Mann-Whitney U. The fold-change analysis of miRNA levels was performed by the non-parametric Kolmogorov-Smirnov test for datasets comparison. Differences in qualitative variables (categorical) were verified by χ^2 test. A p value less than 0.05 was considered statistically significant. Clinical accuracy of significant miRNAs was assessed using receiver operator characteristic (ROC), and the area under the curve (AUC) was calculated for each of the miRNAs of interest separately using DeLong's method. For those cutoffs, positive and negative predictive values, as well as sensitivity and specificity, were calculated. Analyses were performed with Statistica Version 10 (StatSoft, Inc.) and Excel (Microsoft) software.

RESULTS

The entire group of ACS patients was thoroughly allocated into four partially overlapping subgroups. According to ECC criteria, there were 16 STEMI and 27 NSTEMI patients identified. IRA occlusion was noted in 12 (75%) out of 16 subjects with STEMI, and in 15 (55.6%) out of 27 patients with NSTEMI ($p = 0.002$). The remaining four (25%) patients with STEMI and 12 (44.4%) with NSTEMI had patent IRA.

Patients with STEMI had significantly higher maximum hs-TnT levels, as compared to NSTEMI subjects (Table 1). Despite the high proportion of IRA occlusion in patients with NSTEMI, NSTEMI patients had significantly longer time from

symptoms onset to revascularisation procedures compared to STEMI (Table 1).

In our study group, we did not find any other differences between STEMI and NSTEMI patients, as well as patent vs. occluded IRA (Table 1).

Circulating miRNAs in ACS patients

Analysis of average cycle threshold (Ct) for each of the miRNAs revealed that miR-208 and miR-499 had relatively low abundance in serum (40.0). For miR-1, -122, -124, -133a, -133b, -134, -16, -34a, and -375 average Ct values were 39.41, 37.27, 34.96, 37.53, 35.75, 36.09, 37.25, 36.04 and 33.85, respectively. The maximum allowable Ct was 40.0.

There was no statistical significance in the miRNA fold levels in STEMI vs. NSTEMI subjects, except for miR-134, the level of which was 3.83-fold higher in the STEMI group ($p < 0.025$) (Fig. 1). Additionally, the comparison of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ for every selected miRNAs was performed, which confirmed statistical significance for miR-134 (Fig. 1).

Discrimination of patients according to the target vessel occlusion criteria revealed that patients with occluded IRA had significantly higher levels of circulating cardiac and/or muscle-specific miR-133a and miR-133b, with the change fold: 7.00 ($p < 0.05$) and 4.57 ($p < 0.05$), respectively (Fig. 1). Similarly, brain-specific miR-34a, -124, and -134 showed significant increase in the occluded group: 5.50 ($p < 0.05$), 2.55 ($p < 0.025$), and 3.45 ($p < 0.05$), respectively (Fig. 1). The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ comparison confirmed that significance (Fig. 1).

Clustering of circulating miRNAs to enhance diagnostic discrimination of ACS patients

For enhancement of the diagnostic discrimination of ACS patients the common pattern from unsupervised hierarchical clustering was applied. The analysis of the 10 miRNA levels

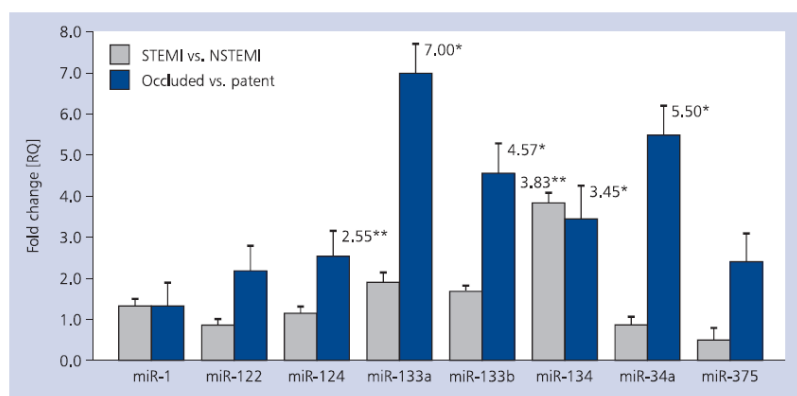


Figure 1. Comparison of analysed microRNA expressions in patients with acute coronary syndrome (ACS) by fold change (RQ) analysis significance in microRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in ST elevation myocardial infarction (STEMI) and non-ST elevation myocardial infarction (NSTEMI) patients, and patients with patent vs. occluded target vessel; * $p < 0.05$; ** $p < 0.025$

(ΔCt plus) with the Euclidian distance measurement was performed. As shown in Figure 2, the algorithm clustered the patients with occluded and patent vessel with several outliers. The discrimination pattern did not exhibit clear motives, but it plainly demonstrated that significant miRNAs (miR-34a, -124, -133a, -133b, -134) are upregulated in most subjects with occluded IRA. In case of STEMI vs. NSTEMI, the discrimination pattern expressed less organised clustering (Fig. 2).

ROC analysis of significant miRNAs in ACS patients

To evaluate the predictive value of upregulated miRNAs, the ROC curves were calculated for each of the best miRNAs. In the case of the STEMI/NSTEMI group, the most predictive miRNA (miR-134) achieved AUC values of up to 0.725 (Fig. 3A, Table 2). Using miR-134 discrimination, 11 subjects were correctly classified as STEMI and 20 as NSTEMI with a sensitivity of 87.5% and specificity of 59.3% (AUC: 0.725, $p = 0.002$).

The following predictors of IRA occlusion were identified by ROC analysis (Table 2): miR-124 (AUC 0.787), miR-133b (AUC 0.704), miR-34a (AUC 0.697), miR-134 (AUC 0.686), and miR-133a (AUC 0.640).

DISCUSSION

In the present study, we compared serum profile of candidate miRNAs in 43 patients with troponin-positive ACS classified as STEMI ($n = 16$) and NSTEMI ($n = 27$). After the angiography, patients were re-classified in terms of TIMI flow grade in IRA. Importantly, although in the STEMI group there were significantly more patients with occluded IRA than in the NSTEMI group, 56% of NSTEMI subjects presented with occluded target vessel. Thus, these two classifications did not match each other (Fig. 4).

The potential clinical significance of our finding is that increased levels of some miRNAs might be associated with IRA occlusion, thus miRNAs expression might indicate subjects in whom coronary angiography should be performed without further delay due to artery occlusion. This finding is particularly important in patients with NSTEMI or non-diagnostic ECG, in whom the decision to perform coronary intervention can be urgently implemented to improve the survival and clinical outcome. In some patients the target vessel may have opened spontaneously during a period preceding interventional procedures. In such patients increase in circulating miRNAs may be the additional criterion to predict post-ischaemic complications [12].

Circulating skeletal muscle and cardiac-derived miRNAs have been extensively related with cardiac conditions [6, 9, 13–15]. However, the utility of emergent miR-1, -208, and -499 in ACS diagnostics or differentiation has been tempered [5, 8, 14]. In the work by Wang et al. [5], as well as Widera et al. [8], higher expression of miR-208a was found in patients with cardiac ischaemia, as compared to healthy subjects or

subjects with unstable angina, respectively. Taking into consideration such uncertainties, we have focused on the identification and potential use of non-cardiac miRNAs in the serum. Interestingly, a dramatic increase of circulating liver-specific miR-122 levels has been also related with cardiogenic shock in model systems [16]. Other miRNAs from apparently unrelated origin have been implicated in cardiac-related events. For instance, the brain-enriched miR-34a was described as an apoptosis-promoting factor after myocardial infarction [17], and the pancreatic miR-375 was characterised as a miRNA involved in embryonal heart development in mice [18]. Moreover, this evidence suggests a possible cross-talk communication between organs and distant control mediated by miRNAs. In order to cover some of these relationships and to analyse them in the context of ACS, small panel of miRNAs was selected for analysis in the patient cohort, containing miRNAs from several origins: skeletal muscle miRNAs (miR-1, miR-133a and miR-133b), cardiac-specific miRNAs (miR-208b and miR-499), pancreatic (miR-375), liver-specific (miR-122), and brain-enriched miRNAs (miR-34a, miR-124, and miR-134). In addition, miR-16 was also quantified as a possible housekeeping circulating miRNA taking into consideration the fact that miR-16 has been shown in some cases not to be a perfect normaliser, not because of the Ct levels but because of its variability among samples.

We observed that circulating heart-enriched miRNAs (miR-133a, -133b) were significantly elevated in patients with an occluded culprit coronary artery, in comparison to those with patent IRA. This finding might be explained by the fact that a degree of miR-133 family upregulation correlates with the extent of myocardial damage [7, 19], which should be higher in occlusions. Nevertheless, troponin levels did not differ significantly between patent vs. occluded IRA, thus this issue requires further elucidation. Moreover, the discriminating power of the miR-133 family was moderate; the AUC values ranged between 0.640 and 0.704 for miR-133a and miR-133b, respectively.

Surprisingly, the brain-related miRNAs were the most specific for IRA occlusion, particularly miR-124, for which the ROC analysis showed an AUC value of 0.787, which makes it a reasonable marker. The other discriminating brain-related miRNAs, of lesser value, were miR-34 (AUC 0.697) and miR-134 (AUC 0.686).

This finding might indicate that expression of the brain miRNAs might be more specific for organ ischaemia and perhaps related to the underlying mechanisms of ischaemia, like platelets activation, inflammation, or endothelial dysfunction. MiR-124 is associated with monocyte/macrophage cells, and it is reported to be most strongly associated with pro-inflammatory pathways [20]. Also, miR-34a is an important player in endothelial senescence, cardiac contractile function, and apoptosis. *In vitro*, miR-34a suppresses the expression of PNUTS (protein phosphatase 1 nuclear-targeting

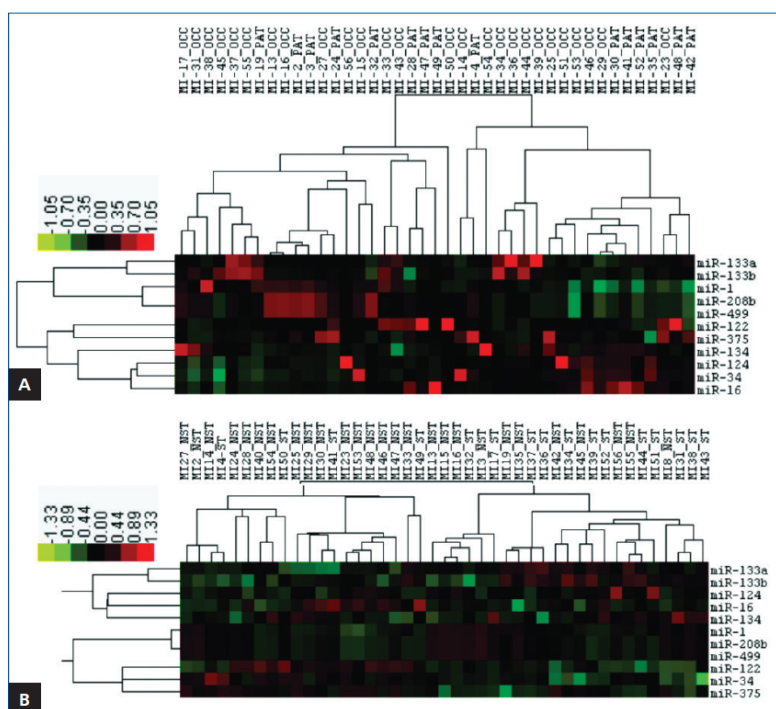


Figure 2. Hierarchical clustering of median-normalised microRNA expression data in serum samples from selected patients. Patients are depicted by a code followed by an abbreviation of the working group to which they belong: OCC — occluded; PAT — patent; ST — ST elevation myocardial infarction (STEMI); NST — non ST elevation myocardial infarction (NSTEMI); **A.** Patent vs. occluded patients; **B.** STEMI vs. non-STEMI patients

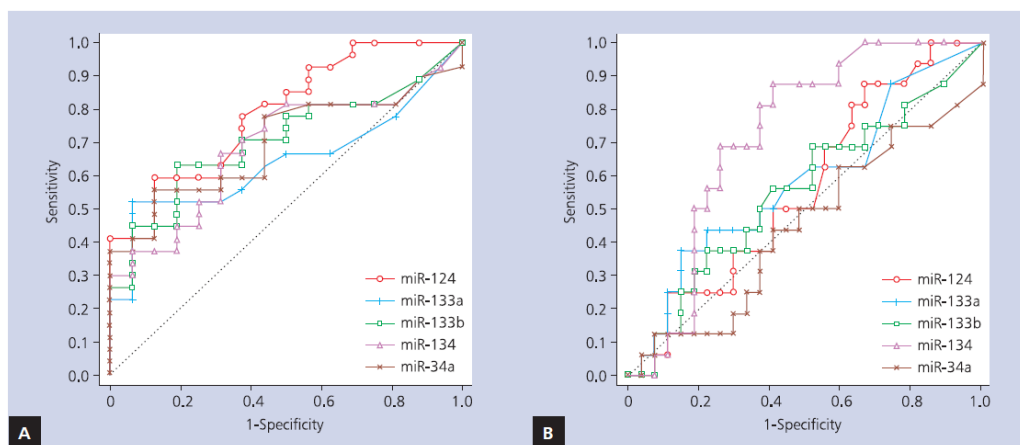


Figure 3. Receiver operator characteristic curves analysis in acute coronary syndrome (ACS) patients for selected microRNAs; **A.** MicroRNAs discriminating value for patent vs. occluded infarct related artery in ACS; **B.** MicroRNAs discriminating value for ST elevation myocardial infarction (STEMI) vs. non-ST elevation myocardial infarction (NSTEMI) patients

Table 2. Results of receiver operator characteristic analysis for differentiating complications in acute coronary syndrome patients

MicroRNA	AUC	95% CI	Standard error	Sensitivity [%]	Specificity [%]	PPV [%]	NPV [%]	P
STEMI vs. NSTEMI patients								
miR-34a	0.447	0.270–0.623	0.090	12.5	93	50	64	0.555
miR-124	0.438	0.264–0.611	0.089	87.5	33.3	43.8	81.8	0.464
miR-133a	0.582	0.418–0.747	0.084	37.5	85.2	60	69.7	0.327
miR-133b	0.553	0.378–0.729	0.089	68.8	48.1	44	72.2	0.552
miR-134	0.725	0.571–0.878	0.076	87.5	59.3	56	88.9	0.002
Patent vs. occluded IRA								
miR-34a	0.697	0.539–0.854	0.080	55.6	87.5	88.2	53.8	0.009
miR-124	0.787	0.649–0.924	0.070	59.3	87.5	88.9	56	< 0.001
miR-133a	0.640	0.474–0.805	0.084	51.9	93.8	93.3	53.6	0.049
miR-133b	0.704	0.547–0.860	0.080	63.0	81.3	85	56.5	0.006
miR-134	0.686	0.524–0.848	0.083	66.7	68.8	78.3	55	0.016

AUC — the area under the receiver-operator characteristic curve; CI — confidence interval; IRA — infarct related artery; NPV — negative predictive value; PPV — positive predictive value; STEMI — ST segment elevation myocardial infarction; NSTEMI — non-ST segment elevation myocardial infarction

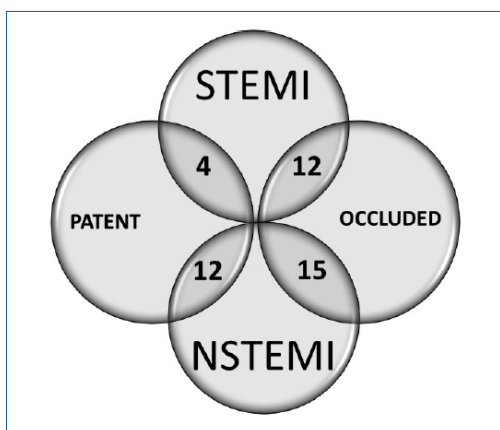


Figure 4. Distribution of acute coronary syndrome (ACS) patients, according to their clinical and vascular complications; STEMI — ST elevation myocardial infarction; NSTEMI — non-ST elevation myocardial infarction

subunit), which inhibits telomere shortening, DNA damage response, and apoptosis, possibly also in cardiomyocytes [21]. Interestingly, a recent report has indicated that the expression of miR-134 was 3.5-fold higher in the peripheral blood mononuclear cells of unstable angina pectoris patients, compared to those with stable angina pectoris [22].

On the other hand, it may be assumed that upregulation of brain miRNAs starts signalling pathways for targeted tissues/cells in response to occluded IRA. For example, there is increasing evidence for overlapping miRNA functions in

different disease entities, such as cancer, and neurodegenerative or cardiovascular disease [23]. Although there is a huge concentration of miR-124 in the brain tissue, particularly in the cortical neurons, miR-124 leads to the repression of numerous non-neuronal miRNAs (i.e. connected with such biochemical pathway as lipolysis), expressed at low levels in the brain and at high levels in other tissues. Thus, miR-124 may play a key role in signalling, resulting in the direct binding to hundreds of transcripts [20]. Existing data from studies of miR-124 and miR-134 are scarce and certainly require re-evaluation, especially in patients with ACS. In an observational study of patients with myocardial infarction, miR-134 was significantly higher in acute myocardial infarction patients than in healthy controls, and increased miR-134 levels were strongly associated with increased risk of mortality or heart failure within six months (odds ratio 2.28, 95% confidence interval 1.03–11.32 $p < 0.001$) [24].

In our study, we found significant increase of these two NeuroMirs, and additionally miR-34a, thus we may take into consideration that there is a possible link between brain and a heart during ischaemia, on the intercellular communication level, via extracellular vesicles.

It is interesting that this miRNA expression profile was not replicated if patients were arranged according to STEMI/NSTEMI criteria, indicating again the possible heterogeneity of ACS. With respect to the STEMI vs. NSTEMI group, only miR-134 showed a moderate discriminating value (AUC 0.725, sensitivity 87.5%, specificity 59.3%, $p = 0.002$). However, neither of them was superior to hs-cTnT for the diagnosis [25].

Former studies indicated higher levels of miR-1 and miR-499 in subjects with ACS as compared to healthy cohort; however, in the present study their expression did not differen-

tiate subjects with NSTEMI/STEMI or patent/occluded IRA [25]. Those miRNAs are thought to be highly specific for cardiomyocytes, but, as some studies indicate, their levels are greatest in later phases of ACS and the post-myocardial infarction period, rather than on symptom presentation. It has been reported that miR-1 and miR-499 levels increased from 100-fold to 300-fold within 12 h after onset of symptoms, making them probably late markers of necrosis, and correlated with troponin T level or creatinine kinase-MB [25]. However, neither miR-499 nor miR-208 was associated with long-term mortality [26]. In these specific miRNAs, other factors may have an impact on the miRNAs expression, like time from symptom to coronary angiography and blood sample collection, or patient-specific factors (age, body mass index, medications) [26]. In our study we did not find any correlation between epidemiologic factors, treatment, and miRNA levels, although the influence of specific drugs or obesity cannot be excluded.

Limitation of the study

Some limitations of our study merit consideration. Firstly, we sampled patients' blood after heparin treatment. It is always an issue whether patient heparinisation affects laboratory analysis. In coagulation tests, heparin influence is substantial; in the case of molecular analysis, the miRNA extraction methods normally diminish the potential inhibition caused by heparin in a treatment dose. Secondly, we limited our investigation to a clinical cohort of ACS subjects without healthy controls. Thirdly, there was no kinetic analysis of circulating miRNA signatures. The time course of circulating miRNA levels may bring us some additional information about the dynamic changes of the human miRNome during ACS and may refine clinical diagnosis in such patients [6]. Nevertheless, we focused our interest on patients with ACS to find any significant differences in miRNA signatures corresponding to IRA occlusion not assuming to have deeper insight into post-ischæmic events and repair mechanism.

CONCLUSIONS

In the present study, except for miR-134, there were no obvious differences in the miRNA profile in patients with STEMI and with NSTEMI. The most important entity for miRNA expression is target vessel occlusion. Patent arteries produce less circulating NeuroMirs and miR-34a, both cardiac and brain specific. It may suggest a different pathomechanism of cell damage during myocardial infarction-related ischaemia, even in distant organs. Our observation may help to elucidate the mechanisms of ACS.

This study was supported by the KNOW project 2012–2017 (Faculty of Medicine Jagiellonian University Medical College as National Leading Centre) for E. Stepień's visiting grant in Universidade de Lisboa.

Conflict of interest: none declared

References

1. Antman EM. Time is muscle: translation into practice. *J Am Coll Cardiol*, 2008; 52: 1216–1221. doi: 10.1016/j.jacc.2008.07.011.
2. Krishnaswamy A, Lincoff AM, Menon V. Magnitude and consequences of missing the acute infarct-related circumflex artery. *Am Heart J*, 2009; 158: 706–712. doi: 10.1016/j.ahj.2009.08.024.
3. Kehl DW, Iqbal N, Fard A et al. Biomarkers in acute myocardial injury. *Transl Res*, 2012; 159: 252–264. doi: 10.1016/j.trsl.2011.11.002.
4. Kablak-Ziembicka A, Przewlocki T, Pieniazek P et al. The role of carotid intima-media thickness assessment in cardiovascular risk evaluation in patients with polyvascular atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2010; 209: 125–130. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.019.
5. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*, 2010; 31: 659–666. doi: 10.1093/eurheartj/ehq013.
6. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2010; 31: 2765–2773. doi: 10.1093/eurheartj/ehq167.
7. Orenes-Piñero E, Montoro-García S, Patel JV et al. Role of microRNAs in cardiac remodelling: new insights and future perspectives. *Int J Cardiol*, 2013; 167: 1651–1659. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.09.120.
8. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, 2011; 51: 872–875. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.011.
9. Oerlemans ML, Mosterd A, Dekker MS et al. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO Mol Med*, 2012; 4: 1176–1185. doi: 10.1002/emmm.201201749.
10. Song J, Bai Z, Han W et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci*, 2012; 57: 897–904. doi: 10.1007/s10620-011-1981-7.
11. de Hoon MJL, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open Source Clustering Software. *Bioinformatics* 2004; 20: 1453–1454. doi: 10.1093/bioinformatics/bth078
12. Devaux Y, Vausort M, McCann GP et al. A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction. *PLoS One*, 2013; 8: e70644. doi: 10.1371/journal.pone.0070644.
13. Eitel I, Adams V, Dieterich P et al. Relation of circulating MicroRNA-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J*, 2012; 164: 706–714. doi: 10.1016/j.ahj.2012.08.004.
14. Corsten MF, Dennert R, Jochems S et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010; 3: 499–506. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.957415.
15. D'Alessandra Y, Carena MC, Spazzafumo L et al. Diagnostic potential of plasmatic MicroRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One*, 2013; 8: e80345. doi: 10.1371/journal.pone.0080345.
16. Andersson P, Gidlöf O, Braum OO et al. Plasma levels of liver-specific miR-122 is massively increased in a porcine cardiogenic shock model and attenuated by hypothermia. *Shock*, 2012; 37: 234–238. doi: 10.1097/SHK.0b013e31823f1811.
17. Fan F, Sun A, Zhao H et al. MicroRNA-34a promotes cardiomyocyte apoptosis post myocardial infarction through down-regulating aldehyde dehydrogenase 2. *Curr Pharm Des*, 2013; 19: 4865–4873. doi: 10.2174/13816128113199990325.
18. Cao L, Kong LP, Yu ZB et al. MicroRNA expression profiling of the developing mouse heart. *Int J Mol Med*, 2012; 30: 1095–1104. doi: 10.3892/ijmm.2012.1092.
19. De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R et al., Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation*, 2011; 124: 1936–1944. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.037572.
20. Sonntag KC, Woo TUW, Krichevsky AM. Converging miRNA functions in diverse brain disorders: A case for miR-124 and miR-126. *Exp Neurol*, 2012; 235: 427–435. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.11.035.
21. Boon RA, Iekushi K, Lechner S et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature*, 2013; 495: 107–110. doi: 10.1038/nature11919.
22. Hoekstra M1, van der Lans CA, Halvorsen B et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 394: 792–797. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.075.
23. Du L, Pertsemliadis A. Cancer and neurodegenerative disorders: pathogenic convergence through microRNA regulation. *J Mol Cell Biol*, 2011; 3: 176–180. doi: 10.1093/jmcb/mjq058.

24. He F, Lv P, Zhao X et al. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*, 2014; 394: 137–144. doi: [10.1007/s11010-014-2089-0](https://doi.org/10.1007/s11010-014-2089-0).
25. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J et al. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*, 2011; 118: 217–226. doi: [10.1159/000328869](https://doi.org/10.1159/000328869).
26. Goretti E, Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Association between circulating microRNAs, cardiovascular risk factors and outcome in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2013; 168: 4548–4550. doi: [10.1016/j.ijcard.2013.06.092](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.092).

Cite this article as: Gacoń J, Kablak-Ziembicka A, Stępień E et al. Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome. *Kardiologia Polska*, 2016; 74: 280–288. doi: [10.5603/KPa.2015.0174](https://doi.org/10.5603/KPa.2015.0174)

Decyzyjne mikroRNA (miR-124, -133a/b, -34a i -134) u pacjentów z zamkniętym naczyniem odpowiedzialnym za zawał z ostrym zespołem wieńcowym

Jacek Gacoń¹, Anna Kablak-Ziembicka², Ewa Stępień³, Francisco J. Enguita⁴, Izabela Karch², Bogusław Derlaga¹, Krzysztof Żmudka², Tadeusz Przewłocki⁵

¹Oddział Kardiologii Inwazyjnej, Specjalistyczny Szpital im. Edwarda Szczeklika, Tarnów

²Oddział Kliniczny Kardiologii Interwencyjnej, Instytut Kardiologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Szpital im. Jana Pawła II, Kraków

³Instytut Fizyki, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁴Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugalia

⁵Klinika Chorób Serca i Naczyń, Instytut Kardiologii, Oddział Kliniczny Kardiologii Interwencyjnej, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Szpital im. Jana Pawła II, Kraków

Streszczenie

Wstęp: Zamknięcie tętnicy wieńcowej nie zawsze manifestuje się uniesieniem odcinka ST w elektrokardiogramie, a zawał serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI) nie jest równoznaczny z zamkniętą tętnicą odpowiedzialną za zawał (IRA).

Cel: Celem pracy była ocena profilu krążących mikroRNA (miRNA), które różnicują pacjentów z zamkniętą IRA.

Metody i wyniki: Pacjenci (n = 43) z niepokrzywanym troponino-dodatnim ostrym zespołem wieńcowym podzielono na grupy z drożną vs. zamkniętą IRA oraz z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST vs. bez uniesienia odcinka ST (STEMI vs. NSTEMI). W surowicy analizowano poziomy ekspresji następujących miRNA: miR-1, -16 -34a, -122, -124, -208b, -133a/b, -375 i -499. Spośród 16 pacjentów ze STEMI i 27 z NSTEMI okluzję IRA stwierdzono odpowiednio u 12 i 15 pacjentów. U pozostałych 4 chorych z STEMI i 12 z NSTEMI stwierdzono drożną IRA. W grupie STEMI stwierdzono wyższe stężenie troponiny T i 3,83-krotnie większą ekspresję miR-134 (p < 0,025). W grupie z niedrożną vs. drożną IRA stwierdzono wyższy poziom miR-133a (krotność zmian: 7,00), miR-133b (4,57), miR-34a (5,50), miR-124 (2,55) i miR-134 (3,45), ale nie odnotowano różnicy stężeń troponiny T. Za pomocą krzywej ROC zidentyfikowano decyzyjne miRNA zamkniętej IRA: miR-124 (AUC: 0,787; p < 0,001), miR-133b (AUC: 0,704; p = 0,006) i miR-134 (AUC: 0,686; p = 0,016). W grupie STEMI tylko miR-134 wykazało wartość różnicującą (AUC: 0,725; p = 0,002).

Wnioski: Stopień zwężenia IRA określa poziom ekspresji krążących miRNA, a specyficzne miRNA mogą być użyteczne w podjęciu decyzji o pilnej rewaskularyzacji wieńcowej.

Słowa kluczowe: ostry zespół wieńcowy, mRNA, tętnica odpowiedzialna za zawał, STEMI, NSTEMI, okluzja

Kardiologia Polska 2016; 74, 3: 280–288

Adres do korespondencji:

lek. Jacek Gacoń, Oddział Kardiologii Inwazyjnej, Specjalistyczny Szpital im. Edwarda Szczeklika, ul. Szpitalna 13, 33–100 Tarnów, e-mail: jgacoon@o2.pl

Praca wpłynęła: 06.01.2015 r. Zaakceptowana do druku: 03.08.2015 r. Data publikacji AoP: 09.09.2015 r.

**Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis
and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study**

Jacek Gacoń, Rafał Badacz, Ewa Stępień, Izabela Karch, Francisco J. Enguita, Krzysztof
Żmudka, Tadeusz Przewłocki, Anna Kablak-Ziembicka

DOI: 10.5603/KP.a2017.0243

Kardiol Pol 2018;76(2):362-369.

Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study

Jacek Gacori^{1,2}, Rafał Badacz², Ewa Stępień³, Izabela Karch², Francisco J. Enguita⁴, Krzysztof Żmudka², Tadeusz Przewłocki², Anna Kablak-Ziembicka²

¹Department of Invasive Cardiology, E. Szczekliki Hospital, Tarnow, Poland

²Department of Interventional Cardiology, Jagiellonian University School of Medicine, John Paul II Hospital, Krakow, Poland

³Department of Medical Physics, Faculty of Physics, Astronomy, and Applied Computer Science, Jagiellonian University, Krakow, Poland

⁴Institute of Molecular Medicine, Faculty of Medicine of Lisbon, University of Lisbon, Lisbon, Portugal

Abstract

Background: Circulating microRNAs (miRs) levels are potentially important diagnostic and prognostic biomarkers in acute coronary syndrome (ACS) or cerebral ischaemic events (CIE) resulting from internal carotid artery stenosis (ICAS).

Aim: This four-year prospective study aimed to compare the levels of circulating miRs in ACS vs. CIE patients, and investigate miRs potentially associated with risk of recurrent cardiovascular events.

Methods: The circulating miRs levels (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-34a-5p, miR-122-5p, miR-124-3p, miR-133a-3p, miR-133b, miR-134-5p, miR-208b-3p, miR-375, and miR-499-5p) were compared in 43 (34 men, 57.6 ± 10.1 years) patients with ACS, and in 71 (47 men, 69.5 ± 9.6 years) with CIE due to ICAS. A four-year prospective evaluation of miRs associated with risk of cardiovascular death (CVD), myocardial infarction (MI), CIE, or all (CVD/MI/CIE) was performed.

Results: In ACS vs. CIE patients, the levels of miR-124-3p ($p < 0.001$), miR-134-5p ($p = 0.012$), miR-208b-3p ($p < 0.001$), miR-34a-5p ($p < 0.001$), and miR-499-5p ($p < 0.001$) were higher, while levels of miR-16-5p ($p < 0.001$) and miR-122-5p ($p < 0.001$) were lower. Levels of miR-1-3p ($p = 0.195$), miR-133a-3p ($p = 0.333$), miR-133b ($p = 0.056$), and miR-375 ($p = 0.055$) were non-statistically different. During follow-up (median 57 months, Q1–Q3: 54–60), CVD/MI/CIE occurred in 23 subjects, including eight CVDs, five non-fatal CIEs, and 10 non-fatal MIs. The multivariate Cox proportional hazard analysis (relative risk [RR]; 95% confidence interval [CI]) revealed that miR-208b-3p (1.225; 1.092–1.375), miR-34a-5p (0.963; 0.935–0.992), and miR-499-5p (0.077; 0.025–0.239) were independently associated with risk of CVD/MI/CIE, as well as risk of each event. Furthermore, miR-133b (1.009; 1.003–1.015) was associated with risk of CVD.

Conclusions: This study shows that although most investigated miRs levels differ significantly between patients with ACS and CIE, similar levels of circulating miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b, and miR-375 were observed; furthermore, we identified several common miRs as possible risk factors for recurrent cardiovascular events.

Key words: circulating miRs, acute coronary syndrome, cerebral ischaemic event, prognostic miRs

Kardiol Pol 2018; 76, 2: 362–369

INTRODUCTION

Endothelial senescence is thought to play a vital role in atherosclerosis [1]. Mechanisms of senescence include endothelial dysfunction, arterial stiffness, and endothelial microvesicle release, which seem to be vectors transferring

macromolecules from originated to descending cells, including a specific group of regulatory factors — microRNAs (miRs) [2]. This family of small noncoding RNAs interacts with selected targeted mRNAs and typically represses their activity [3].

Address for correspondence:

Anna Kablak-Ziembicka, MD, PhD, Department of Interventional Cardiology, Jagiellonian University School of Medicine, John Paul II Hospital, ul. Prądnicka 80, 31–202 Kraków, Poland, e-mail: kablakziembicka@op.pl

Received: 29.05.2017

Accepted: 16.11.2017

Available as AoP: 08.12.2017

Kardiologia Polska Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne 2018

www.kardiologiapolska.pl

Atherosclerosis can be regulated by a variety of miRs having an impact on vascular inflammation, smooth muscle cell proliferation, and plaque progression [4]. Eventually these processes lead to atherothrombotic events that may manifest as acute coronary syndrome (ACS), cerebral ischaemic event (CIE) due to large vessel atherosclerotic disease, e.g. internal carotid athero-occlusive disease (ICAS) or limb ischaemia [5, 6].

Acute coronary syndrome occurs in approximately 50% of patients without prodromal symptoms, while unfavourable clinical course following ACS is associated with myocardium remodelling due to cardiomyocyte necrosis resulting in the development of heart failure, arrhythmia, and sudden cardiac death recurrent myocardial ischaemia and atherosclerosis progression [5, 6]. In clinical practice, several imaging and laboratory prognostic biomarkers are in use to assess a risk of congestive heart failure, sudden cardiac death or recurrent ACS, including B-type natriuretic peptides, cardiac troponins, growth-differentiation factor-15, galectin-3, heart magnetic resonance imaging or echocardiographic study showing left ventricle remodelling, as well as reperfusion time [6, 7].

Cerebral ischaemic event associated with ICAS, has the most unfavourable prognosis, about 30% of affected subjects die due to CIE during the first year after the event and 30% become permanently disabled [8]. Recurrent CIE in the same cerebral territory is observed in 10–25% of patients within the first year [8]. However, brain computed tomography displays infarcted zone ischaemia, which is usually related to the degree of neurological deficits, and further prognosis is unpredictable due to a limited number of laboratory specific biomarkers, as yet [8].

Despite great progress in the management of atherothrombotic complications (revascularisation, medications improving survival), new potential biomarkers of ACS and CIE risk are of utmost importance.

Nowadays, promising biomarker candidates include circulating miRs that are involved in the regulatory mechanisms of physiological and pathological processes, such as smooth muscle cell proliferation and differentiation, apoptosis, metabolism, as well as neoangiogenesis and inflammation [4, 9, 10]. Furthermore, the release of cytokines and miRs as a consequence of the ischaemic event in one territory may lead to destabilisation of atherosclerotic plaques in another arterial territory [11, 12].

The present study aimed to compare the circulating miRs levels in ACS vs. CIE patients, and prospectively investigate them as potential biomarkers associated with risk of recurrent cardiovascular events. We aimed to identify circulating miRs that may be the prognostic markers of patients' survival following ACS and CIE resulting from ICAS in respect to further cardiovascular events (new ACS, new CIE, and cardiovascular death [CVD]). Our choice for selection of particular miRs was based on database research, taking into consideration their abundance in the organs affected by the disease (heart or brain) as well as peripheral tissues (liver or pancreas) and serum stability.

METHODS

Groups subsets

Prospective evaluation included 114 patients with CIE (group I, 71 patients) or ACS (group II, 43 patients) resulting from the atherothrombotic plaque, referred to our institution between January 2011 and December 2012 for interventional management (carotid artery revascularisation or coronary angiography and subsequent coronary intervention).

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was reviewed and approved by a Local Ethics Committee.

Inclusion criteria

In ACS subjects at least one infarct-related lesion in a coronary artery must have been identified during coronary angiography performed prior to coronary artery revascularisation with a primary percutaneous coronary angioplasty with stent implantation.

In CIE subjects, appropriate neurological symptoms, an associated ICAS exceeding 70% lumen reduction in the territory of cerebral ischaemia, and brain imaging findings relevant to the symptoms and ICAS were required.

All patients obtained medical treatment according to guidelines of the European Society of Cardiology, and the Society of Neurology.

Exclusion criteria included

In the ACS group: patients with acute heart failure or with congestive heart failure in New York Heart Association classes III and IV, as well as patients with diagnosed ACS but with normal coronary arteries were not included into the study. In the CIE group: previous CIE, lack of the consistency between ICAS site and neurological lesions on brain computed tomography or neurological deficits identified during neurologic consultation were grounds for exclusion because this might suggest aetiology of CIE other than ICAS. Also excluded were patients with normal carotid arteries, or patients referred for thrombolysis for acute stroke. Finally, patients with asymptomatic ICAS were not included into the present study.

Other general exclusion criteria included a history of cancer, systemic inflammatory conditions such as arthritis, and known or suspected bacterial or viral infections.

Every patient was subjected for a full-spectrum laboratory analysis (miRs, biochemical parameters, and selected biomarkers) before revascularisation.

Acquisition of medical records

The distribution of classic risk factors (diabetes, hyperlipidaemia, arterial hypertension, smoking current or previous, renal kidney disease, peripheral occluded arterial disease) was recorded. Definitions of the above were adopted from the scientific statements of the European Society of Cardiology (<http://www.escardio.org>).

Coronary angiography and revascularisation procedure

Coronary angiography was performed from the femoral or radial approach. A loading dose of aspirin of 300 mg, followed by 75 mg/day was given indefinitely, and a loading dose of clopidogrel of 600 mg, followed by 75 mg/day for 12 months. During the procedure unfractionated heparin was administered according to patient weight and activated clotting time. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors were used at the operator's discretion. Other medications, such as analgesics and beta-blockers were administered as indicated. During the revascularisation procedure, the target vessel was routinely stented, and predilatation and stent choice depended on the clinical circumstances and the operator's decision.

Neurological assessment

Neurological examination was provided in all subjects with CIE on admission to our Department by a consultant neurologist. The data of CIE (ischaemic stroke or transient ischaemic attack) were obtained from a stroke unit, and sourced from available medical documentation, obtained from brain imaging either with computed tomography or magnetic resonance imaging to assess the degree of cerebral infarction, if any, and to exclude other disorders that might cause the symptoms (e.g. subdural hematoma, tumour).

Patients were referred to carotid artery stenting (CAS) or carotid endarterectomy (CEA) on the basis of a multidisciplinary working team including a consultant neurologist, vascular surgeon, endovascular specialist, cardiologist, and radiologist, taking into account the clinical presentation, accompanying comorbidities (e.g. renal dysfunction, respiratory tract disease, access site, coronary artery disease), anatomic assessment (limited surgical access, prior cervical irradiation, prior ipsilateral CEA, and contralateral carotid occlusion), data from imaging workup, and method feasibility and safety.

Angiography and ICAS revascularization

Patients were selected for CAS if they had symptomatic > 70% lumen stenosis by quantitative carotid angiography using the Coroscop system (Siemens AG, Munich, Germany) equipped with Quantcor version 4.0 quantitative analysis software. The degree of ICAS was assessed according to North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) criteria by measuring the vessel diameter in the point of maximal stenosis compared with the plaque-free vessel diameter distally from the lesion. Angiograms were performed in at least two orthogonal projections that best displayed the lesion.

The detailed CAS technique was at the operator's discretion, provided that the 'tailored-CAS' algorithm was applied, allowing for optimal choice of neuroprotection device and stent type depending on the lesion morphology and the neurological status of the patient [13]. CEA technique was at the operator's discretion, with preference of eversion technique whenever feasible. Periprocedural medical management

contained antiplatelet treatment. All patients obtained optimal medical treatment in concordance with recommendations of respective societies.

Laboratory tests

The standard blood tests included high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), fibrinogen levels, and lipid profile.

miRNA extraction

Serum samples were collected on patient admission. Samples were allowed to coagulate for 30 min, centrifuged, and sera were frozen at -80°C until miRNA and selected biomarkers analysis. Extraction of miRNA was performed by means of the miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) with the beginning lysis by Trizol LS Reagent (Invitrogen). The RNA yield and concentrations were determined by capillary electrophoresis on the Agilent Bioanalyser 2100 with the Eukaryote Total RNA Pico Chip (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). An average 60 ± 31.9 pg/ μL of total RNA from 300 μL of serum was recovered.

Profiling of candidate miRNAs

At the time of the study, Exiqon LNA primers were used to quantify 10 mature miRNAs using the Viia7 real-time polymerase chain reaction (PCR) system equipped with a 384-well reaction plate (Life Technologies). RNA was converted to cDNA using the Universal cDNA Synthesis Kit (Exiqon) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed in triplicate with SYBR Green master mix Universal RT (Exiqon) using standard conditions. The organ-specific candidate miRNAs were selected as follows: cardiac and skeletal muscle-related (miR-1-3p, -133a-3p, -133b, -208b-3p, -499-5p), brain-related (miR-34a-5p, -124-3p, -134-5p), liver-specific (miR-122-5p), pancreas-specific (miR-375), and miR-16-5p. The fold changes (RQ) were calculated and statistically significant variations between groups of samples filtered by the calculation of adjusted p-values using the Benjamini-Hochberg false discovery rate.

Follow-up

The incidences of CVD, myocardial infarction (MI), and recurrent CIE, as well as composite end-point (CVD/MI/CIE), were recorded prospectively in 112 patients during a mean follow-up period of 53.8 ± 14.9 months, median 57 (Q1–Q3: 54–60) months. The minimum follow-up period was three months, due to CVD.

Myocardial infarction was diagnosed according to criteria of the European Society of Cardiology. Diagnosis of CIE was to be given by a neurologist to ensure reliability. CVD was defined as a fatal CIE, fatal MI, or other CVD (i.e. any sudden or unexpected death unless proven as non-cardiovascular on autopsy).

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean \pm one standard deviation, and categorical variables are expressed as frequen-

Table 1. Characteristics of study groups

	Patients with acute coronary syndrome (n = 43)	Patients with ischaemic stroke (n = 71)	p
Age [years]	57.6 ± 10.1	69.4 ± 9.6	< 0.001
Male	34 (79.1%)	47 (66.2%)	0.142
Smoking	29 (67.4%)	43 (60.6%)	0.465
Diabetes	20 (46.5%)	29 (40.8%)	0.558
Arterial hypertension	33 (76.7%)	67 (94.4%)	0.005
Dyslipidaemia	36 (83.7%)	60 (82.2%)	0.785
Creatinine [μ mol/L]	77 ± 15	90.9 ± 32.9	0.010
Chronic renal failure (eGFR < 60 mL/min)	6 (14%)	17 (23.9%)	0.201
Concomitant arterial occlusive disease:			
Carotid stenosis > 50%	3 (7%)	71 (100%)	< 0.001
Significant CAD*	43 (100%)	37 (52.1%)	< 0.001
PAOD	6 (14%)	18 (25.3%)	0.15
Previous PCI	3 (6.9%)	6 (8.4%)	0.777
Previous CABG	1 (2.3%)	3 (4.2%)	0.593
Previous MI	3 (6.9%)	13 (18.3%)	0.091
Previous CIE	1 (2.3%)	0 (0%)	0.197
LDL-cholesterol [mmol/L]	3.8 ± 1.3	2.7 ± 1.0	< 0.001
hs-CRP [g/L]	10.3 ± 16	4.7 ± 5.9	0.010
Fibrinogen [g/L]	4.0 ± 1.8	3.9 ± 1.2	0.709

Data are shown as mean and standard deviation or number (percentage). *Significant CAD or carotid artery stenosis — angiographically diagnosed at least 50% lumen reduction; CABG — coronary artery bypass grafting; CAD — coronary artery disease; CIE — cerebral ischemic event; eGFR — estimated glomerular filtration rate; hsCRP — high-sensitivity C-reactive protein; LDL — low-density lipoprotein; MI — myocardial infarction; PAOD — peripheral artery occlusive disease; PCI — percutaneous coronary intervention

cies and percentages. Means of analysed parameters across groups were tested with analysis of variance (ANOVA) test, and frequencies were compared by the χ^2 test for independence. The normal distribution of studied variables was determined by the Shapiro-Wilk test. Differences between mean values of miRs were verified using the Mann-Whitney U test because the distribution of variables was found not to be normal.

The potential independent prognostic markers of cardiovascular events during the follow-up period were established from the 30 variables with univariate analysis (miRs, age, gender, atherosclerosis risk factors, type of ischaemic event). If there was a trend toward difference ($p < 0.1$), they were entered into a multivariate Cox proportional hazard analysis model. The results of the multivariate logistic regression analysis were expressed as hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (95% CI). Statistical analyses were performed with Statistica 12.0 software. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$.

RESULTS

Group I comprised 71 consecutive subjects (47 men, mean age 69.5 ± 9.6 years) who suffered from CIE with a significant ICAS on angiography (mean stenosis degree $83.9 \pm 15\%$), and who underwent successful carotid artery revascularisation.

Group II comprised 43 consecutive patients (34 men, mean age 57.6 ± 10.1 years) admitted with ACS, who underwent coronary angiography and subsequent coronary intervention according to guidelines. The detailed study group characteristics are presented in Table 1. In brief, patients with CIE were older ($p < 0.001$), more often hypertensive ($p = 0.005$), and they had higher creatinine levels ($p = 0.01$), as compared to ACS subjects. There was higher levels of hs-CRP ($p = 0.01$) and low-density lipoprotein cholesterol ($p < 0.001$) in the ACS vs. CIE groups (Table 1).

In ACS patients, as compared to CIE patients, there was a statistically significant increase of circulating miR-124-3p ($\log 2^{-\Delta\Delta Ct} 0.571 \pm 0.07$ vs. -0.638 ± 0.06 ; $p < 0.001$), miR-134-5p ($\log 2^{-\Delta\Delta Ct} 0.278 \pm 0.09$ vs. -0.02 ± 0.07 ; $p = 0.012$), miR-208b-3p ($\log 2^{-\Delta\Delta Ct} -0.899 \pm 0.08$ vs. -1.998 ± 0.149 ; $p < 0.001$), miR-34a-5p ($\log 2^{-\Delta\Delta Ct} 0.238 \pm 0.08$ vs. -0.248 ± 0.07 ; $p < 0.001$), and miR-499-5p ($\log 2^{-\Delta\Delta Ct} -0.899 \pm 0.08$ vs. -1.176 ± 0.07 ; $p < 0.001$; Fig. 1). Decreased levels of miR-16-5p ($\log 2^{-\Delta\Delta Ct} -0.072 \pm 0.08$ vs. 1.962 ± 0.103 ; $p < 0.001$) and miR-122-5p ($\log 2^{-\Delta\Delta Ct} -0.076 \pm 0.08$ vs. 1.892 ± 0.09 ; $p < 0.001$) were found (Fig. 1).

Prospective evaluation was available for 112 subjects. CIE and ACS patients were considered together, as one group.

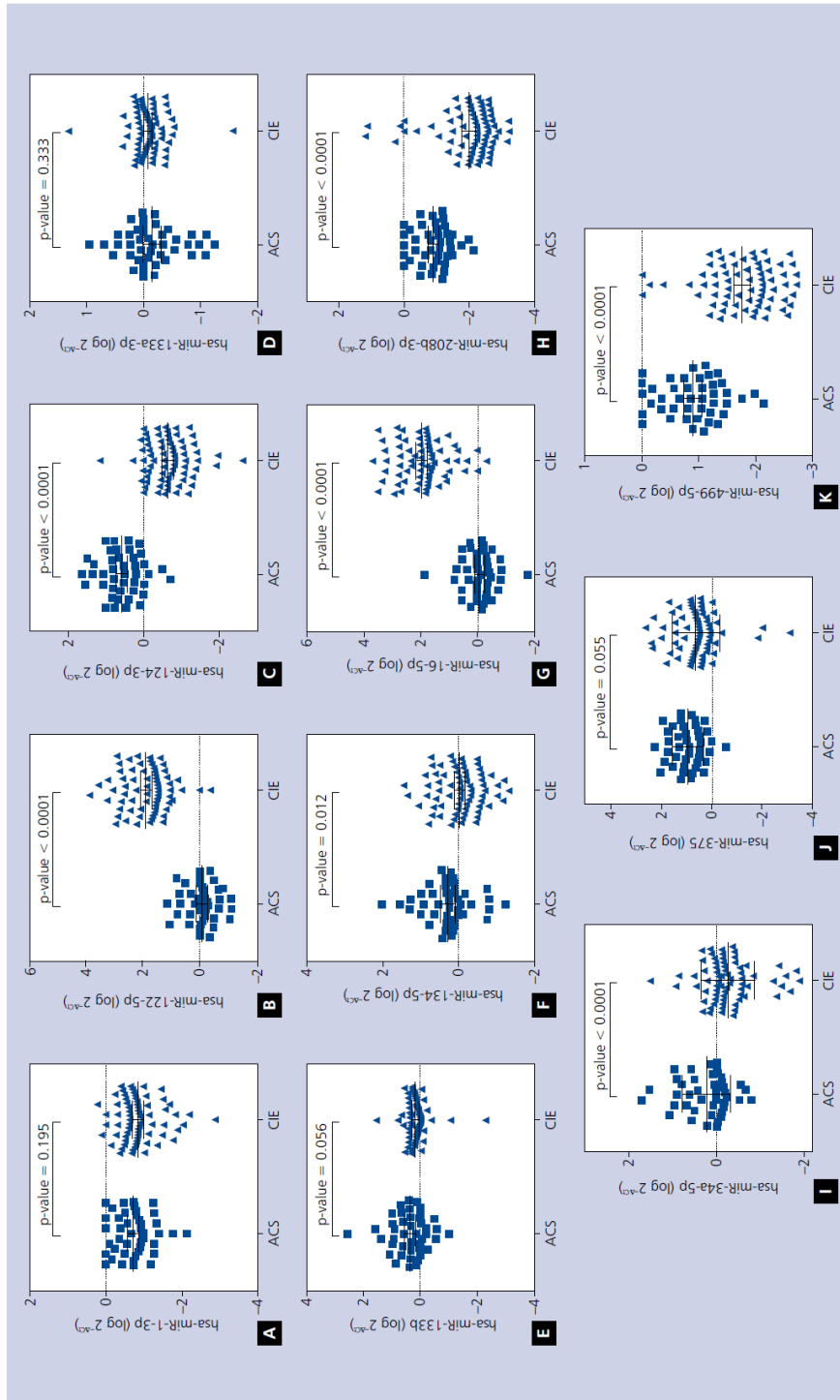


Figure 1. Circulating levels of selected miRNAs in patients with acute coronary syndrome (ACS) and recent cerebral ischaemic event (CIE). P-values as evaluated with the Student's t-test are shown, and the data of each group are summarised as median with 95% confidence interval representation. MiRNA levels were determined by qPCR and expressed as logarithmic values of 2^{-ΔCt}. A. hsa-miR-1-3p; B. hsa-miR-122-5p; C. hsa-miR-124-3p; D. hsa-miR-133a-3p; E. hsa-miR-133b; F. hsa-miR-134-5p; G. hsa-miR-16-5p; H. hsa-miR-208b-3p; I. hsa-miR-34a-5p; J. hsa-miR-375; K. hsa-miR-499-5p

Table 2. The independent predictors of cardiovascular events identified by multivariate Cox proportional hazard analysis

	HR	95% CI	p
CVD/MI/CIE			
miR-122-5p	1.001	0.999–1.001	0.054
miR-208b-5p	1.225	1.092–1.375	0.001
miR-34a-5p	0.963	0.935–0.992	0.012
miR-499-5p	0.077	0.025–0.239	< 0.001
CVD			
miR-133b	1.009	1.003–1.015	0.004
miR-208b-5p	1.133	1.026–1.251	0.014
miR-34a-5p	0.964	0.936–0.992	0.011
miR-499-5p	0.116	0.043–0.310	< 0.001
CIE			
miR-122-5p	1.001	1.000–1.001	0.007
miR-208b-5p	1.159	1.043–1.288	0.006
miR-34a-5p	0.971	0.944–0.998	0.037
miR-499-5p	0.139	0.054–0.358	< 0.001
miR-16-5p	1.001	1.000–1.001	0.059
MI			
miR-122-5p	1.000	0.999–1.001	0.063
miR-208b-5p	1.216	1.087–1.359	0.001
miR-34a-5p	0.962	0.933–0.991	0.010
miR-499-5p	0.074	0.024–0.226	< 0.001

CI — confidence interval; CIE — cerebral ischaemic event; CVD — cardiovascular disease; HR — hazard ratio; MI — myocardial infarction

During a four-year follow-up period, CVD/MI/CIE occurred in 23 (20.5%) subjects. In the CIE group there were eight CVDs (one due to CIE and seven due to MI) and five non-fatal CIEs. In the ACS group there were 10 non-fatal MIs, while no CVD or CIE were noted.

The multivariate Cox proportional hazard analysis revealed the following predictors of CVD/MI/CIE: miR-208b-5p (HR = 1.225, 95% CI 1.092–1.375; $p = 0.001$), miR-34a-5p (HR = 0.963, 95% CI 0.935–0.992; $p = 0.012$), and miR-499-5p (HR = 0.077, 95% CI 0.025–0.239; $p < 0.001$; Table 2).

Furthermore, the levels of circulating miR-208b, miR-34a, and miR-499 occurred as independent risk factors for composite and each individual end-point (MI, CIE, and CVD; Table 2). Levels of miR-133b were identified as risk factors of future CVD (Table 2).

DISCUSSION

The major finding in the present study is that despite the same (e.g. atherothrombotic) aetiology, resulting in an ischaemic event, the levels of several circulating miRs significantly differed between subjects with ACS and CIE. To our knowledge, this is the first study comparing serum miRs levels in subjects

with ACS vs. CIE. We identified significant differences in the increase of miR-124-3p, miR-134-5p, miR-34a-5p, miR-208b-3p, and miR-499-5p, and in the decrease of miR-16-5p and miR-122-5p in ACS vs. CIE patients. This finding might be attributed to the different mechanism of ACS and CIE, e.g. the plaque rupture with subsequent thrombus formation is observed predominantly in ACS as compared to the embolic aetiology from frequently ulcerated soft carotid artery plaque in CIE [12]. The other potential explanation is that miRs expression depends on its release from atherosclerotic plaques, platelets, cardiomyocytes, and brain cells exposed to ischaemia [14, 15].

Cipollone et al. [16] found that miR-100, -127, -133a, -133b, and -145 were significantly upregulated in symptomatic carotid plaques, while Raitoharju et al. [17] found that miR-21, -34a, -146a, -146b-5p, and -210 were the most upregulated miRNAs in atherosclerotic plaques from peripheral arteries (carotid, femoral, and abdominal aorta). In human coronary atherosclerotic plaques, at least one vascular bed, compared with a healthy arterial wall, showed different expression of miR-126, -134, -145, -146a, -198, -210, -340*, and -92a [16, 17].

Interestingly the levels of circulating miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-133b, and miR-375 were non-significantly different between ACS and CIE groups, suggesting perhaps the same release mechanism from the plaque.

miR and ACS

Olivieri et al. [18] demonstrated a 3- to 10-fold increase in expression of miR-1, miR-133a, miR-21, and miR-423-5p and over 80-fold increase of miR-499-5p, the latter was an important diagnostic marker of non-ST elevation MI (NSTEMI) in 92 elderly subjects. Adachi et al. [19], in a miR array analysis, reported that miR-499 is almost specifically expressed in the heart, concluding that miR-499 might serve as an additional promising biomarker of MI. As shown in a mouse model, also miR-208 seems to be exclusively expressed in cardiomyocytes and consequently released during cardiomyocyte death in MI [20].

Tang et al. [21] evaluated the effect of ischaemia reperfusion on miRs in the rat heart, identifying that levels of miR-1, miR-126, and miR-208 were increased, while miR-21, miR-133, and miR-195 levels were decreased. In our previous study, we found a 3.83-fold higher miR-134 expression ($p < 0.025$) in patients with ST elevation MI-ACS as compared to patients with NSTEMI-ACS [22]. While, the main variance in miR expression was associated with patent vs. occluded target lesion in a coronary artery [23].

miR and CIE

Jickling et al. [11] showed significant down-expression of miR-122, -148a, -19a, and -320, and up-expression of miR-363 and -487b in patients with any acute ischaemic

stroke compared to controls with vascular risk factors. In this study group, atrial fibrillation was similarly prevalent in CIE vs. controls (20.8% vs. 25%, $p = 0.74$), and other potential CIE aetiologies were not examined [11]. These authors concluded that certain miRs may be differentially expressed according to the subtype of ischaemic stroke, which would require a larger cohort to examine [11]. The downregulation of miR-122 in stroke is also consistent with our current findings.

Unfortunately, data regarding the relationship between destabilisation or progression of carotid artery stenosis resulting in CIE are scarcely reported. Dolz et al. [23] showed that plaque progression in asymptomatic carotid artery stenosis was associated with high likelihood of CIE and significantly higher expression of miR-199b-3p, miR-27b-3p, miR-130a-3p, miR-221-3p, and miR-24-3p. According to previous studies, miR-146a was found to be upregulated in atherosclerotic plaques obtained from human carotid arteries while miR-221, miR-100, miR-133a, or miR-145 were significantly overexpressed in unstable human carotid plaques [16, 17]. The lack of a significant difference between the levels of miR-133a observed in our study may potentially explain the common mechanism of plaque destabilisation as a process independent of plaque location.

miRs and cardiovascular prognosis

The other major finding from this study is that although miR levels differ significantly with regard to the organ exposed to ischaemia, we can identify several common miRs independently associated with future recurrent events, e.g. CVD, MI, CIE as well as composite end-point: CVD/MI/CIE. The following independent predictors of CVD/MI/CIE were identified: miR-208b (HR = 1.225, 95% CI 1.092–1.375; $p = 0.001$), miR-34a (HR = 0.963, 95% CI 0.935–0.992; $p = 0.012$), and miR-499 (HR = 0.077, 95% CI 0.025–0.239; $p < 0.001$).

This finding might be clinically very useful because an ischaemic event in one vascular territory may trigger another ischaemic event in the same or different arterial territory. Thus, identification of miRs, presumably key players in plaque transformation from the stable into the unstable or prone to rupture, may identify new therapeutic targets.

Our present study demonstrated that the levels of serum miR-208b, miR-34a, miR-133b, and miR-499 were associated with CVD risk. In the study of 444 patients with ACS by Widera et al. [24], the admission levels of miR-133a and miR-208b were significantly associated with the risk of all-cause death at six months in univariate and age- and gender-adjusted analyses. Gidlof et al. [25], in a group of 424 patients with ACS found the independent association between miR-208b (OR = 1.79, $p < 0.001$) and miR-499-5p (OR = 1.7, $p < 0.001$) with increased risk of mortality and heart failure within 30 days.

Furthermore, the levels of miR-208b, miR-34a, and miR-499 proved to be independent risk factors of composite and

particular end-points (MI, CIE, and CVD). While, the expression of miR-133b was identified as a risk factor of further CVD, and miR-16 proved to be specific for CIE incidence.

Limitations of the study

One obvious limitation is the pre-selection of miRs potentially associated with ACS or CIE, thus other miRs may also contribute to pathogenesis and prognosis in atherothrombotic events.

CONCLUSIONS

To conclude, in order to develop a target-specific therapy, it is essential to establish the exact mechanisms driving the release of specific miRs during atherosclerosis progression and remodelling. It is still not known if miRs responsible for neoangiogenesis or smooth muscle cell proliferation (miR-133a/133b) can contribute to plaque conversion from a stable to an unstable state, or if the cells exposed to ischaemia (cardiomyocytes) can release microvesicles loaded with specific miRs (miR-208 or miR-499), which remotely affect formation to increase the risk of future cardiovascular events.

Funding: The study was supported by research grant number K/ZDS/005730 to Anna Kablak-Ziembicka received from the Jagiellonian University Collegium Medicum, Krakow.

Conflict of interest: none declared

References

- Stepień E, Kablak-Ziembicka A, Czyż J, et al. Microparticles, not only markers but also a therapeutic target in the early stage of diabetic retinopathy and vascular aging. *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 16(7): 677–688, doi: [10.1517/14728222.2012.691471](https://doi.org/10.1517/14728222.2012.691471), indexed in Pubmed: 22616736.
- Faragher RGA, McArdle A, Willows A, et al. Senescence in the aging process. *F1000Res*. 2017; 6: 1219, doi: [10.12688/f1000research.10903.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.10903.1), indexed in Pubmed: 28781767.
- Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*. 2012; 13(4): 271–282, doi: [10.1038/nrg3162](https://doi.org/10.1038/nrg3162), indexed in Pubmed: 22411466.
- Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. MicroRNAs and atherosclerosis: new actors for an old movie. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012; 22(11): 937–943, doi: [10.1016/j.numecd.2012.03.007](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.03.007), indexed in Pubmed: 22748605.
- Kablak-Ziembicka A, Przewlocki T, Stepień E, et al. Relationship between carotid intima-media thickness, cytokines, atherosclerosis extent and a two-year cardiovascular risk in patients with arteriosclerosis. *Kardiologia Pol*. 2011; 69(10): 1024–1031, doi: [10.5603/KP.a2017.0243](https://doi.org/10.5603/KP.a2017.0243), indexed in Pubmed: 22006602.
- Kehl DW, Iqbal N, Fard A, et al. Biomarkers in acute myocardial injury. *Transl Res*. 2012; 159(4): 252–264, doi: [10.1016/j.trsl.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.11.002), indexed in Pubmed: 22424429.
- Luengo-Fernandez R, Paul NLM, Gray AM, et al. Oxford Vascular Study. Population-based study of disability and institutionalization after transient ischemic attack and stroke: 10-year results of the Oxford Vascular Study. *Stroke*. 2013; 44(10): 2854–2861, doi: [10.1161/STROKEAHA.113.001584](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.001584), indexed in Pubmed: 23920019.
- Lovett JK, Coull AJ, Rothwell PM. Early risk of recurrence by subtype of ischemic stroke in population-based incidence

- studies. *Neurology*. 2004; 62(4): 569–573, doi: [10.1212/01.wnl.0000110311.09970.83](https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000110311.09970.83), indexed in Pubmed: [14981172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14981172/).
9. Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008; 79(4): 581–588, doi: [10.1093/cvr/cvn156](https://doi.org/10.1093/cvr/cvn156), indexed in Pubmed: [18550634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18550634/).
 10. Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2007; 100(11): 1579–1588, doi: [10.1161/CIRCRESAHA.106.141986](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.106.141986), indexed in Pubmed: [17478730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17478730/).
 11. Jickling GC, Ander BP, Zhan X, et al. microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets. *PLoS One*. 2014; 9(6): e99283, doi: [10.1371/journal.pone.0099283](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099283), indexed in Pubmed: [24911610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24911610/).
 12. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, et al. Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(23): 2129–2138, doi: [10.1016/j.jacc.2009.09.009](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009), indexed in Pubmed: [19942084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19942084/).
 13. Pieniżek P, Tekieli L, Musiałek P, et al. Carotid artery stenting according to the tailored-CAS algorithm is associated with a low complication rate at 30 days: data from the TARGET-CAS study. *Kardiol Pol*. 2012; 70(4): 378–386, indexed in Pubmed: [22528713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22528713/).
 14. Navickas R, Gal D, Laucevičius A, et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res*. 2016; 111(4): 322–337, doi: [10.1093/cvr/cvw174](https://doi.org/10.1093/cvr/cvw174), indexed in Pubmed: [27357636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27357636/).
 15. Maitrias P, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, et al. MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque. *J Vasc Surg*. 2015; 62(5): 1245–1250, doi: [10.1016/j.jvs.2015.06.136](https://doi.org/10.1016/j.jvs.2015.06.136), indexed in Pubmed: [26238333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26238333/).
 16. Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke*. 2011; 42(9): 2556–2563, doi: [10.1161/STROKEAHA.110.597575](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.597575), indexed in Pubmed: [21817153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21817153/).
 17. Raitoharju E, Oksala N, Lehtimäki T. MicroRNAs in the atherosclerotic plaque. *Clin Chem*. 2013; 59(12): 1708–1721, doi: [10.1373/clinchem.2013.204917](https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.204917), indexed in Pubmed: [23729638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23729638/).
 18. Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013; 167(2): 531–536, doi: [10.1016/j.ijcard.2012.01.075](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.01.075), indexed in Pubmed: [22330002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22330002/).
 19. Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2010; 56(7): 1183–1185, doi: [10.1373/clinchem.2010.144121](https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.144121), indexed in Pubmed: [20395621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20395621/).
 20. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007; 316(5824): 575–579, doi: [10.1126/science.1139089](https://doi.org/10.1126/science.1139089), indexed in Pubmed: [17379774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379774/).
 21. Tang Y, Zheng J, Sun Y, et al. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int Heart J*. 2009; 50(3): 377–387, doi: [10.1536/ihj.50.377](https://doi.org/10.1536/ihj.50.377), indexed in Pubmed: [19506341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19506341/).
 22. Gacoń J, Kablak-Ziemicka A, Stepień E, et al. Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome. *Kardiol Pol*. 2016; 74(3): 280–288, doi: [10.5603/KP.a2015.0174](https://doi.org/10.5603/KP.a2015.0174), indexed in Pubmed: [26365938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26365938/).
 23. Dolz S, Górriz D, Tembl JI, et al. Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers of Stenosis Progression in Asymptomatic Carotid Stenosis. *Stroke*. 2017; 48(1): 10–16, doi: [10.1161/STROKEAHA.116.013650](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013650), indexed in Pubmed: [27899750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27899750/).
 24. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 51(5): 872–875, doi: [10.1016/j.yjmcc.2011.07.011](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.011), indexed in Pubmed: [21806992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21806992/).
 25. Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013; 13: 12, doi: [10.1186/1471-2261-13-12](https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-12), indexed in Pubmed: [23448306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23448306/).

Cite this article as: Gacoń J, Badacz R, Stepień E, et al. Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study. *Kardiol Pol*. 2018; 76(2): 362–369, doi: [10.5603/KPa2017.0243](https://doi.org/10.5603/KPa2017.0243).

The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction

DOI: 10.5114/aic.2019.81705

Postepy Kardiol Interw 2019;15(1).

Jacek Gacoń MD^{1,2}, Tadeusz Przewłocki MD PhD¹, Jakub Podolec MD PhD¹, Rafal Badacz MD¹, Piotr Pieniazek MD PhD¹, Wojciech Ryniewicz MD PhD³, Krzysztof Żmudka MD PhD¹, Anna Kabłak-Ziembicka MD PhD¹

1. Department of Interventional Cardiology, Jagiellonian University School of Medicine, the John Paul II Hospital, Krakow, Poland

2. Department of Invasive Cardiology, E. Szczeklik's Hospital, Tarnow, Poland

3. Jagiellonian University School of Medicine, Institute of Dentistry, Department of Dental Prosthetics, Krakow, Poland

Running title: carotid intima-media change and coronary lesion progression

Abstract

Despite percutaneous coronary intervention (PCI), patients after their first myocardial infarction (MI) are at high risk of ischemic event recurrence. Therefore, there is need for objective markers of atherosclerosis control, independent of prescribed pharmacotherapy and patients compliance. Potential indicator of major adverse cerebral and coronary event (MACCE) risk might be change in carotid intima-media thickness (CIMT) which addresses atherosclerosis growth.

This study aimed to evaluate associations between CIMT change and incidences of MACCE, recurrent MI and new angina due to coronary lesion progression (CLP).

Methods. CIMT assessments at baseline and during 2 follow-up visits were performed in 215 patients admitted with MI, in whom PCI was performed for an index lesion, followed by best medical treatment. The incidences of MACCE (cardiovascular death, recurrent MI, ischemic stroke), and CLP were recorded prospectively for median 60 months.

Results. MACCE was recorded in 65(30.2%) patients (52 MIs and/or 15 ISs), while new angina due to CLP in further 20(9.3%) patients. Although initial CIMT values were similar in MACCE vs MACCE-free patients (1.43 ± 0.40 vs. 1.45 ± 0.44 mm; $p=0.486$), patients in whom MACCE occurred had greater annual CIMT growth as assessed on the first (0.024 ± 0.12 vs. 0.009 ± 0.16 mm/year; $p<0.001$) and final follow-up visit (0.050 ± 0.1 vs. 0.001 ± 0.1 mm/year; $p<0.001$). An optimal cut-off value for annual CIMT change of >0.003 mm/year (sensitivity:84.5%,specificity:49.3% for MI plus CLP (AUC=0.673) occurred an independent indicator of MACCE (HR=3.00; 95%CI=1.496: 6.016), recurrent MI (HR=4.59, 95%CI=1.591: 13.217), and MI plus CLP (HR=3.50, 95%CI=1.759: 6.964).

Conclusions. Annual CIMT change might be valuable marker of atherosclerosis response to post-MI treatment.

Introduction

Despite percutaneous coronary intervention (PCI), cardiac rehabilitation and best medical therapy (BMT), survivors of first acute myocardial infarction (MI) are at high risk of a recurrent MI, or subsequent vascular event and cardiovascular death (CVD) [1,2,3].

Most studies of post-MI outcomes focus on the acute phase after the index event, with few data available for follow-up beyond the first year. Although the risk of cardiovascular events is highest in the first year post-index MI, it remains remarkable in subsequent years [4]. The relative risk for all-cause death and cardiovascular outcomes (recurrent MI, CVD) is at least 30% higher than that in a general reference population at both 1-3 years and 3-5 years after MI [5]. It is true, particularly for patients with additional risk factors such as diabetes, hypertension, or older age.

Furthermore, patients despite prescribed medications, often demonstrate poor compliance, or the dosages prescribed are generally 50% or less of the dosages used in clinical trials [6,7]. Both medication adherence and therapeutic goals are achieved in minority of patients [6,7,8].

The data reinforce the importance of secondary prevention in improving long-term prognosis of post-MI patients. However, only a few, but indirect, prognostic tools are available, for instance assessment of the left ventricle function, biochemical markers of heart failure (e.g. NT-pro-BNP) or inflammatory process activity (e.g. hs-CRP), and occlusive stenotic lesions in extra coronary vascular beds [9,10,11,12].

Yet, there is a need for direct indicators of atherosclerotic process slowing or growth, independent of prescribed pharmacotherapy and patients compliance. The potential indicator of cardiovascular risk might be carotid intima-media thickness (CIMT). Although, baseline CIMT is independently associated with extent of atherosclerosis and ischemic cardiovascular events [13,14], little is known whether CIMT change may address atherosclerosis growth in other than carotid artery territory in individual patient, and

as such whether CIMT change may be related to risk of major adverse cerebral and coronary event (MACCE), recurrent MI or recurrent angina.

Therefore, the present study aimed to evaluate the potential associations between CIMT change and the incidence of MACCE, recurrent MI and new angina due to coronary lesion progression (CLP) in patients who underwent MI.

Methods

This prospective study comprised 215 patients (154 male; mean age 63.3 ± 9.8 years) admitted with recent MI, in whom PCI was performed for an index lesion. Of note, patients were treated according to contemporary guidelines concerning coronary intervention as well as best medical treatment (BMT) afterwards.

CIMT assessments at baseline and during at least 2 follow-up visits were performed in all patients. The incidences of MACCE, cardiovascular death (CVD), recurrent MI, ischemic stroke (IS) and new onset angina were recorded prospectively for median 60 months.

Inclusion criteria were as follows: age over 18 years, acute MI with confirmed significant (at least 50% lumen reduction) stenosis in an index coronary artery.

Exclusion criteria: chronic or acute inflammatory status, active cancer, critical state, acute heart failure or with congestive heart failure in NYHA classes IV, patients not willing to participate in the present study, or suboptimal carotid artery ultrasound (e.g. massive calcifications enabling CIMT assessment).

According to current guidelines, patients were prescribed dual antiplatelet therapy and other medications, including typically a statin, beta-blocker, and ACEI/ARB, as per guidelines of the European Society of Cardiology [15].

All subjects gave their informed consent prior to enrolment in accordance with the requirements of the institutional local Ethics Committee. The study was performed consistent with the requirements of the Declaration of Helsinki.

Carotid intima-media measurement

Carotid ultrasonography was done with a high-resolution B-mode, color Doppler, and pulsed wave Doppler ultrasonography, using a Toshiba Aplio 300 ultrasound machine (Toshiba Medical Systems Co) equipped with a 4–12-MHz linear array transducer.

During hospital stay (baseline examination), all patients had the maximum carotid intima-media complex of the near and far walls measurement at 3 segments, including the distal 1 cm of the common carotid

artery, at the bifurcation, and at the level of the internal carotid artery. All measurements were expressed as mean maximum CIMT.

After initial CIMT assessment, participants were followed up 2 times with CIMT re-evaluation at mean 3 and 4.5 years.

The annual change in CIMT (mm/year) was calculated by using the following equation: annual change of CIMT = (follow-up CIMT – baseline CIMT)/observation period in years.

The difference between the follow-up and baseline CIMT was also expressed as an absolute Δ value according to the following equation: Δ CIMT = follow-up CIMT – baseline CIMT

Follow-up period and cardiovascular events

The clinical follow-up was continued beyond last CIMT re-assessment in order to establish the potential relationship between CIMT change and MACCE, recurrent MI and new onset of angina for median 60 months.

Recurrent MI was diagnosed according to contemporary criteria of the European Society of Cardiology [16]. The diagnosis of IS was established by a neurologist to ensure validity. CVD was defined as fatal IS, fatal MI, or other CVD (i.e., any sudden or unexpected death unless proven as non-cardiovascular on autopsy). The relationship between new onset angina and coronary status was established with coronary angiography in order to ensure coronary lesion progression, and exclude symptom related to stenosis recurrence (restenosis or stent thrombosis as related to different mechanisms) [17,18]. For further analysis only new angina due to coronary lesion progression (CLP) was taken into account.

Statistical analysis

The Student's t test was used for comparison of continuous variables, and a χ^2 test was used to compare proportions of categorical variables. Means of the analysed parameters across groups were tested by analysis of variance test. Frequencies were compared by a χ^2 test for independence.

The influence of CIMT change, clinical, and biochemical factors on the incidence of the following endpoints: MACCE, recurrent MI, and new angina due to CLP were assessed with a Cox univariate hazard analysis, and in cases with a trend toward a difference ($P < 0.05$), they were included in a multivariate stepwise Cox proportional hazards analysis. The results of the multivariate Cox proportional hazards analysis were expressed as hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (CI). Kaplan–Meier analysis for recurrent MI and new angina due to coronary lesion progression according to quartiles (A – lowest; D – highest quartile) of the annual CIMT change on the final ultrasonography was performed.

Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to establish the best cut-off value for annual CIMT progression rate predicting risk of MACCE, recurrent MI and CLP. The area under the

ROC curve (AUC) was calculated. Statistical analyses were performed with Statistica version 12.0 software (StatSoft, Inc, Tulsa, OK). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

During median 60 months follow-up period, MACCE was recorded in 65 (30.2%) patients, including 10 CVDs (9 MIs/sudden cardiac, 1 IS), 42 non-fatal MIs and/or 15 non-fatal ISs. Recurrent MI occurred in 12 (5.6%) subjects during first year of follow-up, and in 26 (12.1%) at 3 years. Additionally, angina recurrence in CCS classes II-III was noted in 30 (14%) patients, of which new angina due to CLP was observed in 20 (9.3%) patients, while due to in-stent restenosis in 10 (4.7%), as evidenced with coronary angiography.

The detailed clinical characteristics and assessment depending on MACCE plus CLP incidence are summarized in Table 1. Subjects in whom MACCE plus CLP occurred, as compared to MACCE-free subgroup were more often hypertensive ($p=0.026$), had higher levels of serum creatinine ($p=0.049$) and hs-CRP ($p=0.001$), and higher mean number of cardiovascular risk factors among hypertension, hyperlipidaemia, diabetes, cigarette smoking ($p=0.058$), (Table 1).

Initial CIMT values were similar in patients who suffered MACCE and event-free patients (1.43 ± 0.40 vs. 1.45 ± 0.44 mm; $p=0.486$).

At first CIMT reassessment during the mean follow-up period of 36.5 ± 29.3 months, patients in whom MACCE occurred had 2.7-fold greater annual CIMT growth as compared to event-free subset of patients (0.024 ± 0.12 vs. 0.009 ± 0.16 mm/year; $p<0.001$). Similar findings concerned the final CIMT reassessment performed during the mean follow-up period of 53.3 ± 37.1 months (0.050 ± 0.1 vs. 0.001 ± 0.1 mm/year; $p<0.001$, respectively).

In patients in whom annual CIMT change showed clear carotid atherosclerosis reduction (1st quartile for annual CIMT change), significantly lower number of recurrent MI and new angina due to CLP was observed, as compared to subjects with annual CIMT changes in the 2nd, 3rd and 4th quartiles ($p=0.008$ by log rank test), and as compared to the 4th quartile ($p<0.001$ by log rank test), Figure 1. The Kaplan-Meier free-survival curves were 100, 97.8 and 88.4% at 1, 3 and 5 years for 1st quartile, while 92.6, 76.6 and 61.0% for the 4th quartile, respectively (Figure 1).

Cox univariate regression analysis indicated several factors possibly associated with cardiovascular event risk, of which a multivariate stepwise Cox proportional hazards analysis identified that risk of MACCE was associated independently with the annual CIMT progression >0.003 mm/y and serum creatinine level (Table 2). Recurrent MI, as well as recurrent MI and new angina due to CLP were associated with the annual CIMT progression >0.003 mm/y, serum creatinine level, and history of hyperlipidaemia (Table 2).

The CIMT change occurred an independent indicator of MACCE, recurrent MI and MI plus CLP with an optimal cut-off value of CIMT progression rate of >0.003 mm/year for all study end-points (Figure 2.A,B,C). Yet, the annual CIMT progression rate of 0.003 mm/year was the best predictor of MACCE, recurrent MI and CLP, associated with fairly good sensitivity (between 80% and 84.5%), it demonstrated only mild specificity between 47% and 49.3% (AUC between 0.638 and 0.673) Table 3.

Discussion

In the first decade of XXI century, in survivors of first MI, the cumulative incidence of death was 12.1% at 1 year and 17.5% at 3 years, while recurrent MI were 5% and 8.2%, respectively [3]. In years between 2004 and 2010, in England, in all survivors of a first acute MI, the risk of a second MI was highest during the first year and the cumulative risk increased more gradually thereafter [1]. For men, 1- and 7-year cumulative risks were 5.6% and 13.9%; for women, they were 7.2% and 16.2% [1]. Data from Swedish national registries of 108 315 patients admitted to hospital with a primary MI between year 2006 and 2011, demonstrated that composite endpoint of non-fatal MI, non-fatal IS or CVD was 18.3% during the first year post-index MI [2].

In the present study, the 5-year MACCE incidence was 30.2%, and including CLP 38.6%. Recurrent MI occurred in 5.6% of subjects during first year of follow-up, and in 12.1% at 3 years. Thus, despite the attempt to implement BMT according to guidelines, our data are consistent with others in terms of MACCE incidence.

Moreover, in patients who suffered from MACCE, we found a 2.7-fold greater annual CIMT progression rate as compared to event-free subgroup of patients. Our study indicated that the annual CIMT progression rate of 0.003 mm/year is a sensitive marker of risk for MACCE, recurrent MI and CLP (sensitivity between 80% and 84.5%), however, it demonstrated only mild specificity between 47% and 49.3% (AUC between 0.638 and 0.673).

In line with our findings, in CLAS trial, patients with an annual common CIMT progression rate of 0.034 mm/year had a 2.9- fold higher CVD risk compared to those with a common CIMT progression rate of 0.011 mm/year or less [19].

Consistent with our results, Okayama et al. observed that a higher median progression rate of common CIMT (0.03 mm/year) was a significant determinant of MACCE (HR, 2.24; 95% CI, 1.25–4.03, $p<0.01$) during a mean follow-up of 7.6 years [20]. Controversially, in the IMPROVE study, assessment of 15-month progression demonstrated that only the fastest-CIMT max-progression was significantly associated with risk of subsequent vascular events [21].

We demonstrated that when patients were stratified into quartiles based on the annual change in CIMT, patients in the 1st quartile had a lower probability of recurrent MI and CLP, as compared to patients in the

other quartiles. This finding is in line with a study of Hirano et al, including 240 patients with stable coronary artery disease [22]. Furthermore, Hirano et al., showed that addition of the change in plaque-CIMT max in the follow-up period of 6 months, to conventional risk factors, resulted in a greater area under the ROC curve compared with conventional Framingham risk factors alone (0.81 and 0.70, respectively, $p=0.02$) [22].

The idea of atherosclerosis tracking through the serial CIMT assessments in patients with cardiovascular risk factors in the primary and the secondary prevention populations is very attractive as objective indicators of achieved atherosclerosis control would improve health outcome.

Many data report poor compliance and frequent under dosage of medications in patients discharged for MI. Korhonen et al, showed that only 49% of the patients adhered ($\geq 80\%$ of days covered) to all 3 medications including ACE inhibitors/ARBs, beta-blockers, and statins [23]. It is estimated that after 1, 3, and 5 years, 78, 64, and 58% of survivors who had started therapy were still receiving beta-blockers, 86, 78, and 74% were receiving ACE-inhibitors, and 85, 80, and 82% were receiving statins, respectively [7]. Furthermore, the dosages prescribed were generally 50% or less of the dosages used in clinical trials, and dosages did not increase during the observation period [7]. Patients who did not start treatment shortly after discharge had a low probability of starting treatment later [7].

Moreover, 6 months after an MI, even in patients with a high adherence to drug treatments ($\geq 90\%$ of days covered), blood pressure $<140/90$ mmHg, low density lipoprotein (LDL) <100 mg/dl (in patients on statins), HbA1c $<7\%$ (in treated diabetics), and smoking persistence were observed in 74%, 76%, 45%, and 27% of patients, respectively [24].

As we showed in the present study, CIMT change over time might serve as objective marker of atherosclerosis control, and as such, without much knowledge on patients drug adherence and achieved control of cardiovascular risk factors, might serve as additional tool to encourage lifestyle modification and motivational education programs to reduce risk of cardiovascular events.

Study limitations

The period of CIMT measurement intervals was not pre-defined. Only baseline risk factor levels and medications were used for all analyses.

Conclusions. Repeated assessment of CIMT changes might serve as reflector of achieved atherosclerosis control during follow-up as it predicts the risk of MACCE, recurrent MI, and coronary disease progression.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Smolina K, Wright FL, Rayner M, et al. Long-term survival and recurrence after acute myocardial infarction in England, 2004 to 2010. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2012; 5: 532–40.
2. Jernberg T, Hasvold P, Henriksson M, et al. Cardiovascular risk in post-myocardial infarction patients: nationwide real world data demonstrate the importance of a long-term perspective. *Eur Heart J*. 2015; 36: 1163–70.
3. Campo G, Saia F, Guastaroba P, et al. Prognostic impact of hospital readmissions after primary percutaneous coronary intervention. *Arch Intern Med*. 2011; 171: 1948–9.
4. Rapsomaniki E, Thuresson M, Yang E, et al. Using big data from health records from four countries to evaluate chronic disease outcomes: a study in 114 364 survivors of myocardial infarction. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2016; 2: 172–83.
5. Johansson S, Rosengren A, Young K, et al. Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017; 17: 53.
6. Lee YM, Kim RB, Lee HJ, et al. Relationships among medication adherence, lifestyle modification, and health-related quality of life in patients with acute myocardial infarction: a cross-sectional study. *Health Qual Life Outcomes*. 2018; 16: 100.
7. Gislason GH, Rasmussen JN, Abildstrøm SZ, et al. Long-term compliance with beta-blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and statins after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006; 27: 1153-8.
8. Urbinati S, Olivari Z, Gonzini L, et al. Secondary prevention after acute myocardial infarction: drug adherence, treatment goals, and predictors of health lifestyle habits. The BLITZ-4 Registry. *Eur J Prev Cardiol*. 2015; 22: 1548-56.
9. Gacoń J, Badacz R, Stepien E, et al. Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study. *Kardiol Pol* 2018; 76: 362-369.
10. Przewlocki T, Kablak-Ziembicka A, Tracz W, et al. Renal artery stenosis in patients with coronary artery disease. *Kardiol Pol* 2008; 66: 856-864.
11. Cannon CP, Greenberg BH. Risk stratification and prognostic factors in the post-myocardial infarction patient. *Am J Cardiol* 2008; 102: 13G-20G.
12. Badacz R, Przewlocki T, Gacoń J, et al. 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. *Adv Interv Cardiol* 2018; 14: 75–84.

13. Wrotniak L, Kablak-Ziembicka A, Karch I, et al. Multiterritory atherosclerosis and carotid intima-media thickness as cardiovascular risk predictors after percutaneous angioplasty of symptomatic subclavian artery stenosis. *J Ultrasound Med* 2016; 35: 1977-1984.
14. Bryniarski KL, Tokarek T, Bryk T, et al. Intima-media thickness and ankle-brachial index are correlated with the extent of coronary artery disease measured by the SYNTAX score. *Adv Interv Cardiol* 2018; 14: 52–58.
15. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, et al. ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. The Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2013; 34: 2949-3003.
16. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012; 33: 2551-2567.
17. Tekieli L, Pieniazek P, Musialek P, et al. Zotarolimus-Eluting Stent for the Treatment of Recurrent, Severe Carotid Artery In-Stent Stenosis in the TARGET-CAS Population. *J ENDOVASC THER* 2012; 19: 316-324
18. Briede I, Narbutė I, Kumsars I, et al. Two-year clinical outcomes after implantation of an everolimus-eluting bioresorbable scaffold (Absorb) in stable angina and acute coronary syndrome patients. Single-centre real-life registry data. *Adv Interv Cardiol* 2018; 14: 144–148.
19. Hemphill LC. The Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study (CLAS): what it tells us about niacin/colestipol therapy. *J Clin Lipidol* 2015; 9: 11-13.
20. Okayama KI, Mita T, Goshō M, et al. Carotid intima-media thickness progression predicts cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 101: 286-292.
21. Baldassarre D, Hamsten A, Veglia F, et al. Measurements of carotid intima-media thickness and of interadventitia common carotid diameter improve prediction of cardiovascular events: results of the IMPROVE (carotid intima media thickness [IMT] and IMT-progression as predictors of vascular events in a high risk European population) study. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1489–1499.
22. Hirano M, Nakamura T, Kitta Y, et al. Short-term progression of maximum intima-media thickness of carotid plaque is associated with future coronary events in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2011; 215: 507-512.
23. Korhonen MJ, Robinson JG, Annis IE, et al. Adherence Tradeoff to Multiple Preventive Therapies and All-Cause Mortality After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 70: 1543-1554.
24. Urbinati S, Olivari Z, Gonzini L, et al. BLITZ-4 Investigators. Secondary prevention after acute myocardial infarction: drug adherence, treatment goals, and predictors of health lifestyle habits. The BLITZ-4 Registry. *Eur J Prev Cardiol*. 2015; 22: 1548-1556.

Table 1. Baseline characteristics of the study group

	Study group N=215	Subjects with MACCE plus CLP N=83	MACCE-free subjects N=132	p-value
Age (years), mean (SD)	63.3 (9.8)	63.1 (9.2)	61.3 (10.1)	0.396
Men, n (%)	154 (71.6)	59 (71)	95 (72)	0.888
Hypertension, n (%)	199 (93)	81 (98)	118 (89)	0.026
Diabetes mellitus, n (%)	102 (47)	42 (51)	60 (45)	0.462
Hyperlipidemia, n (%)	194 (90)	76 (92)	118 (89)	0.601
Smoking history, n (%)	138 (64)	57 (69)	81 (61)	0.276
Number of cardiovascular risk factors among hypertension, hyperlipidemia, diabetes, cigarette smoking, mean (SD)	2.93 (0.88)	3.05 (0.78)	2.86 (0.93)	0.058
Statin, n (%)	210 (98)	80 (96)	130 (98.5)	0.320
Intermittent claudication, n (%)	66 (31)	31 (37)	35 (26)	0.093
LVEF, % (SD)	52.8 (10.1)	52.7 (10.5)	52.3 (9.9)	0.442
hs-CRP, g/L (SD)	3.12 (2.79)	3.25 (3.38)	3.06 (2.31)	0.001
Body Mass Index, kg/m ² (SD)	27.6 (3.6)	27.2 (3.8)	27.8 (3.4)	0.494
Creatinine, μmol/L (SD)	93 (33.4)	96.9 (36.7)	90.4 (27.3)	0.049
Total cholesterol, mmol/L (SD)	4.97 (1.31)	5.07 (1.41)	4.9 (1.23)	0.486
LDL-cholesterol, mmol/L (SD)	3.06 (1.1)	3.08 (1.1)	3.05 (1.1)	0.255
HDL-cholesterol, mmol/L (SD)	1.19 (0.33)	1.21 (0.36)	1.17 (0.31)	0.277
Triglycerides, mmol/L (SD)	1.74 (1.43)	1.97 (1.8)	1.6 (1.1)	0.217

Abbreviations: CAD, coronary artery disease; IS, ischemic stroke; LVEF, left ventricular ejection fraction; MI, myocardial infarction

Table 2. Multivariate stepwise Cox proportional hazards analysis. Independent risk factors of MACCE, recurrent MI and recurrent MI plus coronary lesion progression (CLP)

Cardiovascular event	Hazard ratio	95% Confidence Interval	p-value
MACCE			
Serum creatinine level	1.01	1.003 – 1.017	0.006
The annual CIMT progression >0.003mm/year	3.00	1.496 – 6.016	<0.001
Recurrent MI			
Serum creatinine level	1.01	1.003 – 1.017	0.004
Hiperlipidemia	3.15	1.271 – 7.784	0.013
The annual CIMT progression >0.003mm/year	4.59	1.591 – 13.217	0.005
Recurrent MI plus new angina due to CLP			
Serum creatinine level	1.01	1.004 – 1.018	0.002
Hiperlipidemia	3.50	1.759 – 6.964	0.005
The annual CIMT progression >0.003mm/year	2.95	1.378 – 6.323	<0.001

Abbreviations: CIMT, carotid intima-media thickness; CLP, coronary lesion progression; MAACE, major adverse cerebral and coronary events; MI, myocardial infarction

Table 3. Receiver operating characteristic (ROC) curves for the optimal annual CIMT progression rate cut-off value to predict risk of MACCE, recurrent MI and CLP

Event	Annual CIMT progression (mm/y)	AUC	95% CI	Sensitivity (%)	Specificity (%)
MACCE	0.003	0.651	0.574 – 0.728	80.3	47
Recurrent MI	0.003	0.683	0.561 – 0.716	80	47.6
Recurrent MI plus CLP	0.003	0.673	0.601 – 0.744	84.5	49.3

Abbreviations: CIMT, carotid intima-media thickness; CLP, coronary lesion progression; MAACE, major adverse cerebral and coronary events; MI, myocardial infarction

Figure 1.

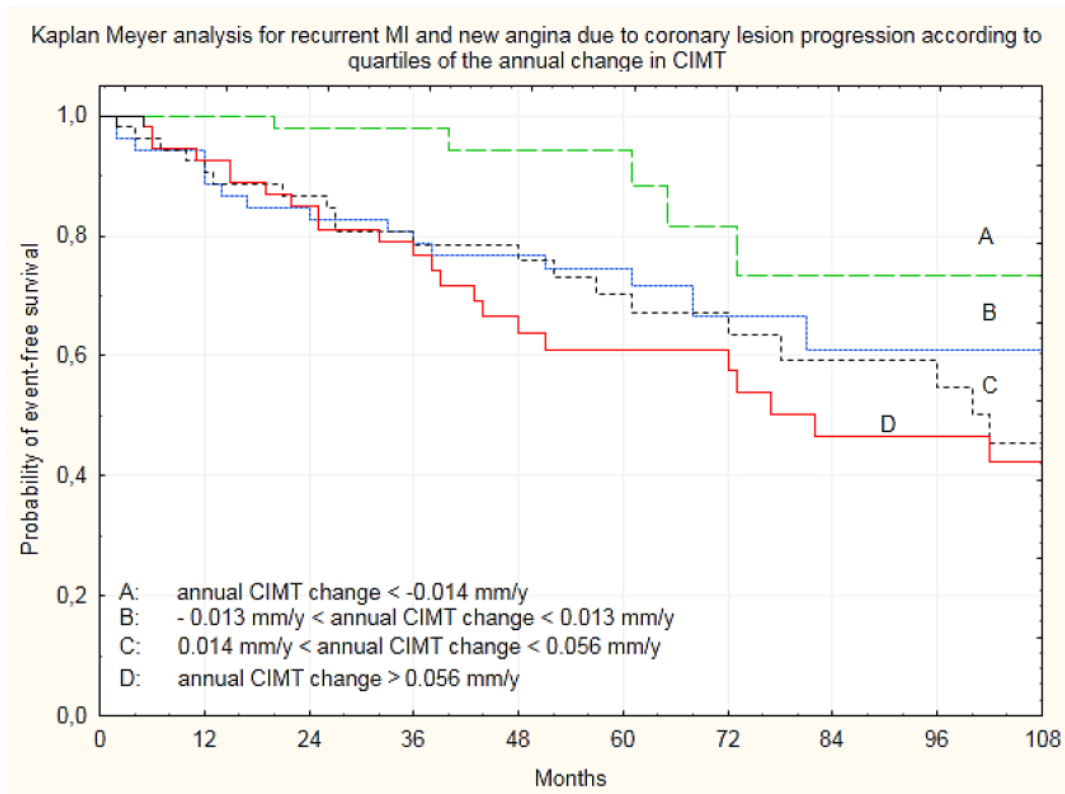


Fig. 1. Kaplan–Meier analysis for recurrent MI and new angina due to coronary lesion progression according to quartiles (A – lowest; D – highest quartile) of the annual CIMT change on the final ultrasonography. ($p < 0.001$ for A vs D by log-rank test; $p = 0.008$ for A vs B,C,D by log-rank test)

Figure 2.

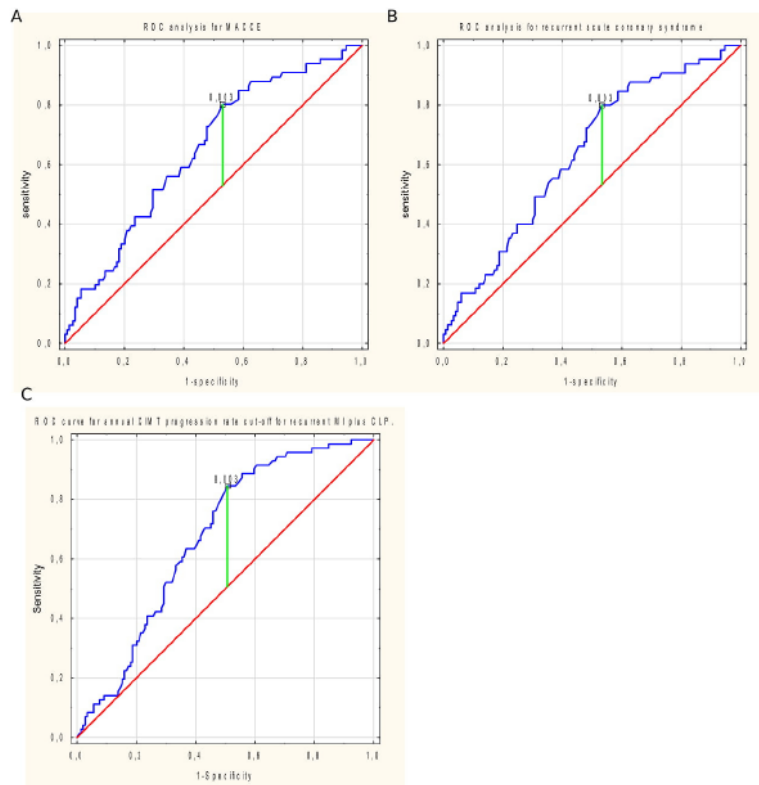


Figure 2. Receiver Operator Characteristics (ROC) curves for annual CIMT progression rate cut-offs for MACCE (A), recurrent MI (B) and CAD progression (C; recurrent MI plus new angina for coronary lesion progression)

Authors:

Jacek Gacoń, Tadeusz Przewlocki, Jakub Podolec, Rafal Badacz, Piotr Pieniazek, Wojciech Ryniewicz, Krzysztof Żmudka, Anna Kablak-Ziembicka

Decision letter:

December 09, 2018

PWKI-01175-2018-01

The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction

Dear Jacek Gacoń,

I am pleased to inform you that your manuscript, entitled: The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction, has been finally accepted for publication in our journal.

ZGODY AUTORÓW

Kraków, dnia..... 24-01-20

Prof. dr hab. med. Krzysztof Zmudka
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(A10) Analiza i ocena
dokumentacji

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

KIEROWNIK
Kliniki Kardiologii Interwencyjnej
Instytutu Kardiologii UJ CM

Prof. dr hab. med. Krzysztof Zmudka

(podpis współautora)

Kraków, dnia 27.7.2019

dr hab. med. Anna Kabalak-Ziembicka, Prof. dr h.c.
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(25%) koncepcja i projekt, analiza i interpretacja danych, pisanie i ostateczna edycja manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Anna Kabalak-Ziembicka

(podpis współautora)

Kraków, dnia 24.2.2019

Prof. Tadeusz Braciński
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(10/10) Analiza danych
konieczne poprawki manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.


(podpis współautora)

Kraków, dnia..... 2011 r.

dr. Piotr Budacz
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(1%) Analiza statystyczna
Revizja sluzych

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Jacek Gacoń
(podpis współautora)

Kraków, dnia.....*21.01.2019*.....

Dr. Jakub Podolec
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**The role of serial carotid intima-media thickness assessment as surrogate marker of atherosclerosis control in patients with recent myocardial infarction**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

*(A¹) Analiza danych, recyzja
manuskryptu*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Dr. med. Jakub Podolec
Specjalista Kardiolog
30-384 Kraków, ul. Szewarska 7/48
tel. (61) 614 35 01
2038206 980630800

(podpis współautora)

Kraków, dnia..... 24.01.2019

dr hab. med. Anna Kubiś-Liembicka-Prof. UJ.
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „ **Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(20%) koncepcja i projekt, zdobycie funduszy
analiza i interpretacja danych, pisanie i edycja
akceptacja manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Anna Kubiś-Liembicka

(podpis współautora)

dr hab. n. med. Ewa Łucja Stępień

Kraków, dnia.....24.21.2017

Profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „ **Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

.....
(15%) analiza danych, oznaczenie
tabliczki, prace u pierwszych punktach
.....

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....
Ewa Stępień
(podpis współautora)

Kraków, dnia.....24.01.2021.....

Prof. Tadeusz Pencisicki
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „ **Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(12/12) opracowanie projektu interpretacji danych
i jego wykonanie w projekcie naukowym

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.


(podpis współautora)

Kraków, dnia... 24.01.2019

Prof. dr hab. med. Krzysztof Ewardo
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „ **Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

49% prac u pisarzy i redaktorów
w tym samym zakresie pracy

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

KIEROWNIK
Kliniki Kardiologii Interwencyjnej
Instytutu Kardiologii UJ CM

Prof. dr hab. med. Krzysztof Ewardo

(podpis współautora)

dr hab. med. Anna Kabalak-Ziembicka, Prof. UJ.

Kraków, dnia 24-01-2018

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(20%) koncepcji i projekt, zabieg
funduszy, awaliu danych, pisanie
i 2) tekstu abstraktu i streszczenia

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

.....
Anna Ziembicka

(podpis współautora)

Kraków, dnia 27.01.2014

Prof. Tadeusz Świątek
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(cała) koncepcja i projekt, interpretacja danych, prace i wypracowanie manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.


(podpis współautora)

dr hab. n. med. Ewa Łucja Stępień

Kraków, dnia 27.21.2018

Profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego

.....
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome**”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(15%) analiza laboratoryjna, ocena
kierunek, prace wg projektowania
przebiegu choroby

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Ewa Stępień

.....
(podpis współautora)

Kraków, dnia 27.01.2019

Prof. dr hab. med. Krzysztof Zmudka
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to:

(70%) prace w piśmie i redagowa
artykułu, decyzja o zaakcepto

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek Jacek Gacoń jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek Jacek Gacoń przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

KIEROWNIK
Kliniki Kardiologii Interwencyjnej
Instytutu Kardiologii, UJ CM
Prof. dr hab. med. Krzysztof Zmudka

(podpis współautora)