

prof. dr hab. n. med. Zenon Gawor

Łódź, 28.11.2019

a) Akademia Humanistyczno-Ekonomiczna w Łodzi

Wydział Humanistyczny/kierunek Pielęgniarstwo

90-212 Łódź, ul. Sterlinga 26

b) Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii w Łodzi

Oddział Kardiologiczny

91-543 Łódź, ul. Pabianicka 62

tel. 602661365; email: [kardio-kopernik@wp.pl](mailto:kardio-kopernik@wp.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Dawida Miśkowiec**  
**„Ocena wartości diagnostycznej i prognostycznej wybranych wolnych,**  
**krążących mikroRNA ( miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133a, miRNA-208a,**  
**miRNA-499) w grupie pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym bez**  
**przetrwalego uniesienia odcinka ST”**

Rozprawa doktorska lek. med. Dawida Miśkowiec powstała w wysoce rozwojowym zespole naukowym Katedry i Kliniki Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierowanym przez prof. Jarosława Kasprzaka, który jest jednocześnie promotorem rozprawy. Oznaczenia mikroRNA zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Badania zostały zrealizowane w ramach grantu naukowego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Rozprawa doktorska rozwiązała dwa podstawowe, istotne problemy badawcze. Po pierwsze określiła wartość pięciu, wybranych z liczego panelu krążących we krwi, mikroRNA w rozpoznawaniu zawału mięśnia sercowego bez przetrwalego uniesienia odcinka ST (NSTEMI). Po drugie określiła ich wartość w zakresie prognozowania przebiegu klinicznego u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym bez uniesienia odcinka ST.

Czy rozpoznanie zawału serca jest proste?. Tylko osoba bez szerszego doświadczenia klinicznego odpowie jednoznacznie twierdząco na to pytanie. Samo już włączenie zawału

serca w szeroki zakres pojęciowy ( ostrych ) zespołów wieńcowych wydaje się takiej odpowiedzi przeczyć. Co prawda można, choć z wielką dozą ostrożności, odpowiedzieć na takie pytanie twierdząco w przypadku ostrego zawału serca z przetrwałym uniesieniem odcinka ST. Rozpoznanie tego typu zawału serca opiera się na objawach klinicznych oraz stwierdzeniu przetrwałego uniesienia odcinka ST w EKG. Wynik badania tropinin we wczesnej fazie nie wpływa na proces terapeutyczny, ponieważ pacjent i tak musi mieć wykonaną koronarografię i ewentualnie plastykę określonej tętnicy wieńcowej serca w trybie natychmiastowym. Z reguły typowe uniesienie odcinka ST przy klasycznym zespole bólowym prawie zupełnie koreluje z zamknięciem dużej nasierdziowej tętnicy wieńcowej. Choć są od tej reguły wyjątki. W swojej praktyce klinicznej spotykałem uniesienia odcinka ST w ekg z klasycznym przebiegiem profilu troponin u pacjentów z ostrym zapaleniem mięśnia sercowego.

Problem z rozpoznaniem jest o wiele trudniejszy w przypadku zawałów, czy ostrych zespołów wieńcowych, bez przetrwałego uniesienia odcinka ST. Obraz EKG nie jest w tym wypadku specyficzny. Również obrazy kliniczne mogą być niejednoznaczne. Podwyższenie troponin we krwi w takiej sytuacji nie może być też badaniem przesądającym, szczególnie we wstępnej fazie schorzenia. Świadczy bowiem jedynie o uszkodzeniu i martwicy kardiomiocytów. Ale taka sytuacja może występować nie tylko w zawale serca ale też w wielu innych stanach klinicznych, takich, jak zapalenie mięśnia sercowego, zatrucie tlenkiem węgla, zator tętnicy płucnej czy ciężka niewydolność nerek oraz inne.

Takie sytuacje wskazują, że potrzebny jest nowy laboratoryjny wskaźnik diagnostyczny, który zrewolucjonizuje diagnozę zawału serca na miarę XXI wieku, podobnie jak dokonała tego troponina w wieku XX.

Pierwsze doniesienie o możliwości wykorzystania oznaczeń troponiny w diagnostyce ostrego zawału serca pojawiło się w 1987 roku. Począwszy od ogłoszenia w 2000 roku przez ESC i ACC wspólnego stanowiska w postaci I Uniwersalnej Definicji Zawału Serca, oznaczenia troponin pełnią kluczową rolę w diagnostyce oraz stratyfikacji ryzyka w ostrych zespołach wieńcowych. Jednak w miarę nabierania doświadczeń z oceną klinicznego znaczenia troponin pojawia się coraz większa kliniczna tęsknota za laboratoryjnym wskaźnikiem, który będzie w pełni specyficzny w fazie wstępnej tylko dla rozpoznania ostrego niedokrwienia oraz martwicy kardiomiocytów na tle zamknięcia tętnicy wieńcowej w przebiegu procesu miażdżycowego. Dobrze by było, gdy ten wskaźnik pozwalał także jednoznacznie określić ilościowo obszar martwicy czy ostrego niedokrwienia a także , gdyby miał dodatkowo duży potencjał prognostyczny. Oczywiście ważnym elementem jest to , by był lepszy od oznaczeń

troponin , obecnie wykorzystywanych jako diagnostyczny standard laboratoryjny w zawale serca.

Ta kliniczna potrzeba przejawia się w wielu pracach badawczych ,próbujących poszukiwać nowych, szybkich oraz wysoce czułych i specyficznych wskaźników laboratoryjnych przydatnych do diagnostyki jak i do prognozowania przebiegu ostrych zespołów wieńcowych. W ten istotny trend badawczy w kardiologii ostrych zespołów wieńcowych wpisuje się rozprawa doktorska lek. med. Dawida Miśkowiec. Doktorant postanowił określić wartość diagnostyczną oraz prognostyczną mikroRNA w ostrym zawale serca bez przetrwałego uniesienia odcinka ST. MikroRNA ,jednoniciowe struktury kwasu rybonukleinowego, odkryte w 1993 roku, złożone są z 20-25 nukleotydów. Po komplementarnym przyłączeniu się do wybranych fragmentów matrycowego RNA ( mRNA) blokują proces translacji a tym samym proces składania w komórce aminokwasów w łańcuchy białkowe. Począwszy od odkrycia budzą szerokie nadzieje diagnostyczne i terapeutyczne w wielu dziedzinach medycyny, w tym w kardiologii. Rocznie powstają tysiące prac poświęconych mikroRNA ( przykładowo w 2017 opublikowano ich na świecie prawie 9 tysięcy). W ludzkim genomie istnieje wiele różnych mikroRNA oraz możliwość przyłączania ich do wielu różnych miejsc na cząsteczkach mRNA. Istotne zmiany w profilu mikro RNA obserwowano w wielu procesach chorobowych, w tym nowotworowych, zapalnych, kardiologicznych czy neurologicznych. Były kliniczne oraz doświadczalne projekty badawcze z terapeutycznym wykorzystaniem syntetycznych odpowiedników ludzkiego mikroRNA w onkologii czy kardiologii. Migracja mikroRNA na zewnątrz komórek do krwi obwodowej zachodzi podczas ich uszkodzenia. Stąd powstało założenie, że oznaczanie mikro RNA może być przydatne w diagnozowaniu zawału serca.

Lek. med. Dawid Miśkowiec w okresie od lipca 2013 roku do sierpnia 2015 roku włączył do badań łącznie 150 pacjentów, w tym 47 pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową serca ( według aktualnej nomenklatury określanej jako przewlekły zespół wieńcowy), jako grupę kontrolną oraz 103 chorych z ostrym zespołem wieńcowym bez przetrwałego uniesienia odcinka ST ( OZW NSTEMI), w tym u 52 rozpoznano świeży zawał serca bez przetrwałego uniesienia odcinka ST ( NSTEMI) a u 51 niestabilną dławicę piersiową ( UA). Jak wynika z podrozdziału 5.8- strona 37 ( „ Obserwacja kliniczna”) pacjentów objęto roczną obserwacją. Ta informacja nie jest jednak ścisła, ponieważ Doktorant nadal prowadził po 1 roku obserwację odległą. Potwierdzeniem tego stwierdzenia może być podana w wynikach badań na stronie 76 rozprawy doktorskiej śmiertelność ogólna w

badanej populacji, która wynosiła 13,3% w okresie średnio aż 796 +/- 417 dni, czyli w obserwacji trwającej zdecydowanie ponad 2 lata.

Badania, będące podstawą rozprawy doktorskiej, były prowadzone na grupach pacjentów hospitalizowanych w Oddziale Kardiologicznym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Władysława Biegańskiego w Łodzi. Procedura włączania pacjentów do pracy badawczej, będącej podstawą rozprawy doktorskiej, oparta została na aktualnie obowiązujących standardach w badaniach klinicznych. Jej opis, zamieszczony w metodyce rozprawy doktorskiej lek. med. Dawida Miśkowiec, może stanowić bardzo dobry przykład dydaktyczny w tej dziedzinie.

Doktorant w momencie planowania projektu badawczego w 2013 roku, wybrał 5 cząsteczek mikro RNA, które na podstawie przeglądu literatury wydawały się być najbardziej swoiste dla komórek mięśnia sercowego. Były to: miRNA-1, miRNA-21, miRNA-208a, miRNA-133a oraz miRNA-499. Ich ilościowa analiza została wykonana w pozaszpitalnym Centralnym Laboratorium Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Krew z żyły obwodowej pacjentów z OZW-NSTE pobierano na oznaczenie ilościowe mikroRNA dwukrotnie - przy przyjęciu na oddział oraz po 3-4 godzinach. U pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (według aktualnych standardów przewlekłym zespołem wieńcowym) krew na powyższe oznaczenia pobierano tylko jednorazowo. Obok tego metodyka badawcza obejmowała ocenę cech klinicznych pacjenta, w tym czynników ryzyka sercowo-naczyniowego oraz zmiennych związanych z hospitalizacją, w tym ustalenie indywidualnych wyników wyjściowych skal ryzyka TIMI a także Grace. W panelu badawczym istotną rolę spełniała ponadto analiza wyników wysokoczułych badań troponiny T, które były referencyjną metodą rozpoznania zawału serca a także wyników CK-MB oraz echokardiografii, wykonywanej w 1 dobie pobytu oraz po 12 miesiącach. Pacjenci pozostawali w długotrwałej obserwacji klinicznej pod kątem wystąpienia pierwszorzędných punktów końcowych.

Przedstawiona w rozdziale 6.1 („Wyniki”) analiza statystyczna wyników badań została dokonana przez Doktoranta w sposób prawie optymalny. Jednak opis metodyki analiz statystycznych mógłby być bardziej rozbudowany.

Doktorant uzyskał w zakresie stężeń niektórych miRNA charakterystyczne różnice między poszczególnymi grupami pacjentów. W zakresie miRNA-1 różnice były między pacjentami z NSTEMI a chorymi z niestabilną dławicą piersiową oraz ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (przewlekłym zespołem wieńcowym). W zakresie miRNA-133a najwyższe wartości stwierdzono u pacjentów z NSTEMI a najniższe ze stabilną postacią

choroby niedokrwiennej serca ( przewlekłym zespołem wieńcowym). W zakresie miRNA-208a wartości nieoznaczalne stwierdzono u 68% pacjentów stabilnych , u 65% pacjentów z UA oraz u 33% osób z NSTEMI. Natomiast w zakresie miRNA-499 najwyższe stężenia obserwowano u pacjentów z NSTEMI. W zakresie miRNA-21 nie wykazano różnic między grupami.

Najwyższą wartość diagnostyczną pierwszego oznaczenia ekspresji wśród analizowanych miRNA w rozpoznawaniu NSTEMI wykazywało miRNA-133a , charakteryzując się 78,4% czułością i 75,0% swoistością. MiRNA-499 miało 42,9% czułość oraz 100 % swoistość. Natomiast miRNA-1 cechowało się 57,1% czułością oraz 87,4% swoistością. Generalnie oceniane miRNA we krwi pobranej u pacjentów bezpośrednio po przyjęciu charakteryzowały się niższą wartością diagnostyczną w rozpoznawaniu zawału serca niż wysokoczuła troponina T, zarówno w zakresie czułości jak i specyficzności , za wyjątkiem 100% specyficzności miRNA-499. Podobny trend wykazywały oznaczenia miRNA wykonane po 3-4 godzinach od przyjęcia.

Trudno jednak było oczekiwać innego wyniku, skoro wysokoczuła troponina T stanowiła referencyjną metodę rozpoznania NSTEMI oraz była podstawą kwalifikacji do grupy z NSTEMI . Przy poszukiwaniu nowych wskaźników diagnostycznych jest to niestety stale spotykany problem , który praktycznie metodycznie jest nierozwiązywalny ( to problem tzw. złotego standardu diagnostycznego).

Poziomy miRNA-1 i miRNA-133a istotnie korelowały z typem sercowym białka wiążącego wolne kwasy tłuszczowe ( h-FABP ),co wskazywać może na ich związek z niedokrwinnym uszkodzeniem kardiomiocytów. Choć te korelacje Doktorant stwierdził jedynie w wyjściowych oznaczeniach wykonanych przy przyjęciu pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym do szpitala. Ponadto miRNA- 1, miRNA- 133a i miRNA-499 wykazywały silne korelacje z troponiną , czego nie stwierdzono przy miRNA-21 i miRNA-208a.

Ważnym osiągnięciem badawczym Doktoranta było wykazanie istotnej wartości w zakresie prognozowania odległego dla miRNA-1, miRNA-133a oraz miRNA-499. Podwyższona ekspresja wymienionych cząsteczek we krwi obwodowej u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym bez przetrwałego uniesienia odcinka ST wiązała się z częstszym występowaniem złożonego punktu końcowego. Doktorant w wynikach i wnioskach podkreśla szczególne znaczenie prognostyczne dla oznaczeń miRNA-499 wykonywanych we wczesnej fazie ostrego zespołu wieńcowego. Ryzyko wystąpienia złożonego punktu końcowego u pacjentów z wyjściowo podwyższonymi wartościami miRNA-499 było bardzo wysokie, osiągając wartość współczynnika ryzyka HR= 2,4.

To jedno z wielu bardzo interesujących obserwacji badawczych, które poczynił w rozprawie doktorskiej lek med. Dawid Miśkowiec.

Biorąc pod uwagę widoczną bardzo wysoką wiedzę Doktoranta w dziedzinie problematyki, jaką stanowią mikroRNA, chciałbym Go prosić o próbę osobistego wyjaśnienia przyczyn różnych profili ekspresji wybranych mikroRNA w poszczególnych grupach pacjentów z OZW oraz z przewlekłym zespołem wieńcowym. Ponieważ mikroRNA dotyczą podstaw funkcjonowania wielu różnych komórek człowieka, powstaje pytanie, czy charakterystyczny panel mikroRNA u pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi bez przetrwałego uniesienia odcinka ST jest skutkiem tego schorzenia czy też, być może, pierwotną jego przyczyną. Jeśli są tym drugim, to Doktorant mógłby przedstawić kolejny, równie interesujący, projekt badawczy związany z mikroRNA w chorobie niedokrwiennej serca. Podstawą takiego projektu mogłyby być wstępne i bardzo interesujące wyniki badań mikroRNA wykonane u kilkudziesięciu pacjentów z przewlekłym zespołem wieńcowym. Powstaje też pytanie o możliwy wpływ zastosowanego leczenia w fazie wstępnej ostrego zespołu wieńcowego na określone profilowanie ekspresji mikroRNA a także wpływ wcześniejszych terapii, w tym szczególnie według mnie leczenia statynami.

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera 146 stron tekstu. Składa się z 11 rozdziałów. Piśmiennictwo zawiera 134 pozycje literaturowe. Wyniki badań zostały przedstawione na 22 rycinach oraz w 19 tabelach.

Wstęp rozprawy doktorskiej zawiera dwa podrozdziały opisujące definicję, epidemiologię oraz diagnostykę ostrych zespołów wieńcowych bez przetrwałego uniesienia odcinka ST. Trzeci, bardzo interesujący, podrozdział wstępu dotyczy obszaru mikroRNA. Istotnym elementem tej części jest stwierdzenie Doktoranta, że funkcja miRNA w mięśniu sercowym, w którym doszło do ostrego niedokrwienia nie jest do końca zbadana. Bardzo ciekawą częścią rozprawy doktorskiej jest rozdział zatytułowany jako „Dyskusja”. Obydwa te rozdziały (czyli wstęp oraz dyskusja) odzwierciedlają bardzo szeroką wiedzę Doktoranta ogólnie w zakresie kardiologii ale też szczególnie w zakresie ostrych zespołów wieńcowych i mikroRNA, opartą na cytowanych licznych źródłach bibliograficznych. Osiem istotnych wniosków opartych jest na uzyskanych wynikach badań.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że Doktorant przedstawił bardzo interesującą rozprawę naukową. Postawił ważne cele badawcze. Zorganizował odpowiednio szerokie grupy pacjentów, koniecznych do prowadzenia badań. Prowadził długotrwałą obserwację kliniczną pacjentów, potwierdzając tym swoje praktyczne umiejętności jako kardiologa.

Założone cele lek. med. Dawid Miśkowiec w sposób odpowiedni zrealizował. Wyniki badań należy uznać za wysoce wartościowe naukowo. Przynoszą one kolejny, istotny wkład w dziedzinie poznawania diagnostycznych oraz prognostycznych zalet i wad mikroRNA w obszarze kardiologii. To jest najbardziej istotna wartość tej rozprawy doktorskiej.

Kończąc recenzję mogę stwierdzić, że była dla mnie bardzo interesującym i przyjemnym zadaniem, ponieważ rozprawa doktorska obejmuje nowoczesną tematykę naukową, została doskonale zrealizowana oraz zawiera ważne wnioski badawcze.

Lek. med. Dawid Miśkowiec rozwiązał samodzielnie istotny problem naukowy. Wykazał się bardzo dobrą ogólną wiedzą teoretyczną w zakresie kardiologii.

W związku z powyższym a także w oparciu o bardzo pozytywną moją ocenę rozprawy doktorskiej zwracam się do Pani Dziekan oraz Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie lek. med. Dawida Miśkowiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z tych powodów zwracam się ponadto z wnioskiem o przyznanie wyróżnienia rozprawie doktorskiej lek. med. Dawida Miśkowiec .

  
prof. dr hab. n. med. ZENON GAWRON  
KARDIOLOG  
specjalista chorób wewnętrznych  
Łódź, ul. Piotrkowska 193 m.10