

**„Ocena wartości diagnostycznej i prognostycznej  
wybranych mikroRNA (miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133a,  
miRNA-208a, miRNA-499) w grupie pacjentów z ostrym  
zespołem wieńcowym bez przetrwałego uniesienia  
odcinka ST”**

**lek. Dawid Miśkowiec**

**Rozprawa na tytuł doktora nauk medycznych**

**Promotor pracy:**

**Prof. dr hab. n. med. Jarosław D. Kasprzak**

**Badanie zostało zrealizowane w ramach grantu naukowego**

**Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Diamentowy Grant”**

**– numer projektu badawczego: DIA012942**

**Katedra i Klinika Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

**Wydział Lekarski**

**Łódź 2020**

## **STRESZCZENIE**

### **Wstęp**

*MikroRNA (miRNA) są małymi, niekodującymi cząsteczkami RNA. Ich główną funkcją w organizmie jest kontrola posttranskrypcyjnej ekspresji genów. Odkrycie krążących miRNA oraz coraz liczniejsze doniesienia o konkretnych stanach chorobowych układu sercowo-naczyniowego, którym towarzyszą ich jakościowe i ilościowe zmiany w krążeniu otwierają wiele możliwości ich wykorzystania w diagnostyce i prognozowaniu ryzyka. Największego potencjału wykorzystania miRNA w praktyce klinicznej upatruje się w stanach chorobowych przebiegających z ostrym niedokrwieniem mięśnia sercowego. W populacji pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym bez przetrwałego uniesienia odcinka ST (NSTEMI-ACS) często obserwuje się nietypowy charakter dolegliwości oraz niediagnostyczny zapis elektrokardiograficzny. Poszukiwanie nowych biomarkerów pozwalających na poprawę obecnie stosowanych algorytmów diagnostycznych, jak również umożliwiających precyzyjniejsze szacowanie ryzyka sercowo-naczyniowego w tej trudnej z klinicznego punktu widzenia grupie pacjentów wydaje się szczególnie istotne z uwagi na możliwość poprawy rokowania w tej populacji chorych.*

### **Cel pracy**

- 1. Ocena wartości diagnostycznej panelu wybranych, wolnych, krążących mikro-RNA (miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133a, miRNA-208a, miRNA-499) w rozpoznawaniu zawału serca mięśnia sercowego bez przetrwałego uniesienia odcinka ST (NSTEMI) względem klasycznych biomarkerów uszkodzenia mięśnia sercowego;*
- 2. Ocena wartości prognostycznej panelu wybranych, wolnych, krążących mikro-RNA (miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133a, miRNA-208a, miRNA-499) w przewidywaniu wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych takich jak zgon, ostry zespół wieńcowy niezakończony zgonem lub nieplanowana rehospitalizacja z przyczyn sercowo-naczyniowych;*

### **Materiały i metody**

*Do badania włączono grupę 103 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym bez przetrwałego uniesienia odcinka ST (ang. non-ST segment elevation acute coronary syndromes, NSTEMI-ACS) - grupa badana oraz 47 pacjentów z stabilną chorobą niedokrwinną serca (ang. stable coronary artery disease, SCAD) - grupa kontrolna. W grupie badanej zawał serca bez przetrwałego uniesienia odcinka ST (ang. non-ST segment elevation myocardial infarction, NSTEMI) rozpoznano ostatecznie u 52 pacjentów, a niestabilną dławicę piersiową (ang. unstable angina, UA) u 51 chorych. Podstawowym kryterium włączenia do grupy badanej było wystąpienie spoczynkowych dolegliwości dławicowych w czasie <24h od momentu przyjęcia do szpitala oraz brak przetrwałego uniesienia odcinka ST w EKG. Ocenę ilościową panelu 5 wolnych krążących mikroRNA: miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133a, miRNA-208a oraz miRNA-499 wykonano u wszystkich zrekrutowanych do badania pacjentów. W grupie NSTEMI-ACS ilościowe oznaczenie miRNA wykonano dwukrotnie: przy przyjęciu do szpitala oraz po 3-4 godzinach od przyjęcia oraz jednokrotnie w grupie kontrolnej.*

Pacjentów poddano długoterminowej obserwacji klinicznej pod kątem wystąpienia pierwszorzędowych punktów końcowych takich jak: zgon, ostry zespół wieńcowy niezakończony zgonem lub rehospitalizacji z przyczyn sercowo-naczyniowych oraz złożonego punktu końcowego na który składała się kombinacja powyższych. Po 12 miesiącach wykonano kontrolne badanie echokardiograficzne w grupie pacjentów z NSTEMI-ACS.

### **Wyniki**

Trzy spośród analizowanych miRNA (miRNA-1, miRNA-133a oraz miRNA-499) charakteryzowały się istotnie wyższymi stężeniami u pacjentów z zawałem serca względem chorych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca, a stężenia dwóch spośród nich (miRNA-133a oraz miRNA-208a) istotnie różniły się pomiędzy chorymi z niestabilną dławicą piersiową, a pacjentami ze stabilną chorobą niedokrwienną serca. Żadne z analizowanych miRNA, nie charakteryzowało się wyższą wartością diagnostyczną w rozpoznawaniu zawału mięśnia sercowego bez przetrwałego uniesienia odcinka ST (NSTEMI), niż standardowo wykorzystywane markery uszkodzenia mięśnia sercowego, takie jak wysokoczuła troponina sercowa (ang. high sensitivity cardiac troponin T, hs-cTnT) oraz izoenzym kinazy kreatyninowej (CK-MBmass).

Ponadto wykazano, że ekspresja miRNA-1, miRNA-133a oraz miRNA-499 istotnie korelowała ze stężeniami markerów uszkodzenia mięśnia sercowego, takimi jak hs-cTnT, CK-MBmass oraz typem sercowym białka wiążącego wolne kwasy tłuszczowe (ang. heart-type fatty acid binding protein, h-FABP) wskazując jednoznacznie na ich związek z niedokrwiennym uszkodzeniem kardiomiocytów. Niemniej jednak, nie wykazano związku pomiędzy podwyższoną ekspresją żadnego z analizowanych miRNA we wczesnej fazie NSTEMI-ACS, a pogorszeniem funkcji skurczowej lewej komory serca w obserwacji 12-miesięcznej.

Odnotowanie u pacjenta podwyższonych wartości miRNA-133a (powyżej wartości mediany dla całej badanej populacji) we wczesnej fazie NSTEMI-ACS okazało się być niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia ponownego ostrego zespołu wieńcowego (HR=6.31, 95% CI 1.83 – 21.8), a podwyższone wartości miRNA-499 we wczesnej fazie NSTEMI-ACS wiązały się z istotnym wzrostem ryzyka rehospitalizacji z przyczyn sercowo-naczyniowych (HR=1.84, 95% CI 1.06 – 3.2) oraz wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zgon lub zawał serca niezakończony zgonem i/lub rehospitalizacji z przyczyn krążeniowych) (HR=1.8, 95% CI 1.05 – 3.08), nawet po skorygowaniu o pozostałe kliniczne czynniki ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego oraz choroby współistniejące.

### **Wnioski**

Podwyższone stężenia miRNA-133a oraz miRNA-499 we wczesnej fazie NSTEMI-ACS wiążą się z częstszym występowaniem niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych w obserwacji odległej.

## **SUMMARY**

### **Introduction**

*MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNA molecules. Their main role in the human body is to control the post-transcriptional expression of genes. The discovery of circulating miRNAs and the increasing number of reports indicating their qualitative and quantitative dysregulation in the specific diseases of the cardiovascular system, shed new light on many possibilities of using circulating miRNAs in diagnostic process and risk stratification. The main miRNA's use potential in clinical practice is seen in disease states related with the acute myocardial ischemia. Non-diagnostic electrocardiography (ECG) and atypical symptoms are often observed in the population of patients with acute coronary syndrome without persistent ST segment elevation (NSTEMI-ACS). The search for new biomarkers allowing to improve the recently used diagnostic algorithms, and to estimate more precisely the cardiovascular risk in this group of patients is highly warranted. It seems to be particularly important due to the possibility of improving the prognosis.*

### **Aims of the study**

- 1. Assessment of the diagnostic value of selected, free, circulating micro-RNAs (miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133a, miRNA-208a, miRNA-499) in the diagnosis of myocardial infarction without persistent ST-segment elevation (NSTEMI);*
- 2. Assessment of the prognostic value of selected, free, circulating micro-RNAs (miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133a, miRNA-208a, miRNA-499) in predicting major adverse cardiovascular events such as death, non-fatal acute coronary syndrome or unplanned rehospitalisation for cardiovascular reasons;*

### **Materials and methods**

*The study included a group of 103 patients with non-ST segment elevation acute coronary syndromes (NSTEMI-ACS) - the study group, and 47 patients with a stable coronary artery disease (SCAD) - the control group. In the study group, non-ST segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) was finally diagnosed in 52 patients, and unstable angina (UA) in 51 patients. The study group was composed of patients with a resting angina symptoms within 24 hours before the hospital admission and without the persistent ST-segment elevation on the ECG. The quantification of 5 free circulating microRNAs: miRNA-1, miRNA-21, miRNA-133a, miRNA-208a and miRNA-499 was performed in the NSTEMI-ACS group miRNA's twice: on admission to hospital and 3-4 hours after admission, and once in the control group.*

*Patients were followed-up for the primary endpoints of death, non-fatal acute coronary syndrome or cardiovascular rehospitalisation and a composite endpoint composed of a combination of the above. Echocardiographic follow-up was performed after 12 months in a group of patients with NSTEMI-ACS.*

## **Results**

*Three of the analyzed miRNAs (miRNA-1, miRNA-133a and miRNA-499) had significantly higher concentrations in patients with myocardial infarction compared to patients with SCAD, and the concentrations of two of them (miRNA-133a and miRNA-208a) were significantly higher in patients with unstable angina when compared to patients with SCAD. None of the analyzed miRNAs showed a higher diagnostic value to identify myocardial infarction without persistent ST segment elevation (NSTEMI) than the standard markers of myocardial damage, such as high sensitivity cardiac troponin T, hs-cTnT) and the isoenzyme of creatine kinase (CK-MBmass).*

*It was also shown that the expression of miRNA-1, miRNA-133a and miRNA-499 correlated significantly with the concentrations of myocardial damage markers such as hs-cTnT, CK-MBmass and the heart-type fatty acid protein (h-FABP), clearly indicating their relationship with ischemic damage of cardiomyocytes. Nevertheless, no association was found between the increased expression of any of the analyzed miRNAs in the early phase of NSTEMI-ACS and the deterioration of left ventricular systolic function in the 12-month follow-up.*

*The elevated miRNA-133a (above the median value for the entire study population) in the early phase of NSTEMI-ACS was an independent risk factor of acute coronary syndrome recurrence (HR = 6.31, 95% CI 1.83 - 21.8), and elevated miRNA-499 was associated with a significantly higher risk of cardiovascular rehospitalisation (HR=1.84, 95% CI 1.06-3.2) and predicted a composite endpoint (non-fatal death or myocardial infarction and/or rehospitalisation with cardiovascular disease) (HR = 1.8, 95% CI 1.05 - 3.08), even after adjusting for other clinical risk factors of cardiovascular disease.*

## **Conclusions**

*The increased values of miRNA-133a and miRNA-499 in the early phase of NSTEMI-ACS were associated with a significantly higher incidence of major adverse cardiac events in long-term follow-up.*