

Lek. Joanna Jarosz-Popek

**Integracja sieci niekodujących RNA powiązanych z SGLT2 oraz krążącymi
mikroRNA jako biomarkerów w zawale mięśnia sercowego
i cukrzycy typu 2.**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Postuła

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med Ceren Eyiletlen Postuła

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2026 r.

Słowa kluczowe: cukrzyca typu 2, zawał mięśnia sercowego, empagliflozyna, inhibitory SGLT2, mikroRNA, miRNA, miR, geny.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, myocardial infarction, empagliflozin, SGLT2 inhibitors, microRNA, miRNA, miR, genes.

**Projekty badawcze oraz aktywności naukowe, w ramach których wykonano,
a następnie zaprezentowano badania do pracy doktorskiej:**

1. Kierownik Grantu Młodego Badacza WUM „Wpływ empagliflozyny na ekspresję krążących miRNA związanych z rozwojem i progresją niewydolności serca u pacjentów po zawale mięśnia sercowego” 11/M/MBM/N/21, kwota dofinansowania 21 000 PLN (2021-2022).
2. Wykonawca w Mini Grancie WUM „Wpływ terapii empagliflozyną i placebo na niekodujące RNA związane ze szlakami sirtuin u pacjentów z niewydolnością serca po zawale serca” 10/M/MG/N/21, kwota dofinansowania 8 000 PLN (2020-2023).
3. Kongres European Society of Cardiology (ESC) 2025: moderowana prezentacja e-posterowa, "MicroRNA signatures in diabetes and myocardial infarction: in silico prediction and bench-to-bedside analysis", autorzy: Joanna Jarosz-Popek, Ceren Eyileten, Zofia Wicik, Sara Ahmadova, Jolanta Siller-Matula, Dirk von Lewinski, Harald Sourij, Marek Postuła.

Podziękowania

Podziękowania składam mojemu Promotorowi, Panu prof. dr hab. n. med. Markowi Postule, za przyjęcie mnie do Zespołu i wprowadzenie w świat badań naukowych nad mikroRNA, za opiekę i wsparcie merytoryczne oraz inspirację do rozwoju naukowego.

Wyrazy wdzięczności kieruję również do mojej Promotor pomocniczej, Pani dr hab. n. med. Ceren Eyileten Postuła, za zaangażowanie, wsparcie merytoryczne, cierpliwość oraz życzliwość, które towarzyszą mi od początku naszej wspólnej pracy.

Podziękowania składam również Pani prof. dr hab. n. med. Dagmarze Mirowskiej-Guzel, Kierownik Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, za życzliwość oraz stworzenie warunków sprzyjających realizacji badań naukowych stanowiących podstawę mojej rozprawy doktorskiej.

Wyrazy najgłębszej wdzięczności kieruję do mojej Rodziny, a w szczególności do męża Tomasza za codzienne wsparcie, motywację i wiarę we mnie, kiedy mnie samej jej brakowało. Dziękuję Synkowi Tadeuszowi za to, że jest najpiękniejszą częścią mojego świata. Szczególne podziękowania i wyrazy wdzięczności kieruję również do Mojej Mamy oraz do Rodziców Męża za wsparcie, stałą obecność, wiarę we mnie i nieocenioną pomoc, bez której pogodzenie pracy naukowej z życiem rodzinnym nie byłoby możliwe.

Spis treści

1. Spis rycin	9
2. Spis tabel	10
3. Wykaz używanych skrótów	11
4. Streszczenie w języku polskim	24
5. Streszczenie w języku angielskim	28
6. Wstęp	31
6.1. Ostry zespół wieńcowy i ryzyko przebudowy lewej komory serca	31
6.2. Rola T2DM w pogorszeniu rokowania po ACS	32
6.3. Znaczenie inhibitorów SGLT2 w tym empagliflozyny w kardioprotekcji	33
6.4. MiRNA jako regulatory i biomarkery przebudowy	35
6.4.1. Krążące miRNA jako biomarkery	37
6.4.2. Znaczenie miRNA jako ogniwa łączącego T2DM, ACS oraz przebudowę lewej komory serca	39
6.5. Analiza luk badawczych i perspektywy poznawcze.	43
6.5.1. Deficyt prospektywnych badań nad interakcją miRNA-T2DM w fazie pozawałowej.	43
6.5.2. Niewyjaśnione mechanizmy epigenetycznej modulacji przez inhibitory SGLT2.	44
6.5.3. Brak zintegrowanych algorytmów wielomarkerowych.	44
6.5.4. Konieczność odróżnienia biomarkerów towarzyszących od mediatorów patofizjologicznych.	44
6.6. Uzasadnienie wyboru kierunku badawczego i tematyki pracy.	45
7. Założenia i cel pracy	48
7.1 Cele szczegółowe	49
7.2 Schemat przebiegu badania	50

7.2.1 Schemat i struktura metodologiczna badania.	50
7.3 Hipotezy badawcze	52
8. Materiały i metody	53
8.1. Projekt badania i charakter analizy	53
8.2. Zgoda komisji bioetycznej, rejestracja badania i zasady prowadzenia badania	55
8.3. Populacja badania i liczebność analizowanych podgrup	56
8.4. Kryteria włączenia i wyłączenia	58
8.5. Ocena kliniczna, laboratoryjna i echokardiograficzna	59
8.6. Punkty czasowe pobrania krwi i przygotowanie osocza	59
8.7. Izolacja RNA i kontrola jakości próbek	60
8.8. Oznaczanie ekspresji miRNA metodą qRT-PCR	60
8.9. Normalizacja ekspresji miRNA	61
8.10. Wybór miRNA i analiza bioinformatyczna	62
8.10.1 Metodyka analizy sieciowej i predykcji in silico	63
8.11 Wybór miRNA do walidacji w próbkach pobranych od pacjentów	63
8.12. Analiza statystyczna	64
8.12.1. Opis danych i porównania między grupami	64
8.12.2. Analiza zmian ekspresji miRNA w czasie	64
8.12.3. Korekta wielokrotnych porównań	65
8.12.4. Analiza ROC/AUC	65
8.12.5. Modele regresji i zmienne uwzględnione w modelach	65
8.13. Określenie wielkości próby	67
8.14. Uwagi metodologiczne do interpretacji wyników	67
9. Wyniki	68
9.1. Wyniki analizy in silico i selekcja panelu miRNA do walidacji klinicznej	68
9.1.1. Oś SGLT2-ncRNA: identyfikacja potencjalnych miRNA i powiązanych genów	68

9.1.2. Analiza in silico: klasteryzacja, sieć interakcji i wybór panelu miRNA	77
9.2. Charakterystyka populacji	80
9.3. Porównanie pacjentów z T2DM i bez T2DM	80
9.4. Zmiany ekspresji miRNA między punktem wyjściowym a 26 tygodniami leczenia empagliflozyną	86
9.5. Związek miRNA z LVEF $\leq 40\%$	88
9.6. Analizy ROC	93
9.6.1. Analizy ROC dla T2DM i HbA1c $\geq 6,5\%$	93
9.6.2. Analizy ROC dla LVEF	95
9.7. Modele wieloczynnikowe	96
9.8. Panel wielomarkerowy	97
10. Dyskusja	99
10.1. Główne wyniki i nowość pracy	99
10.2. Zgodność wyników z literaturą i interpretacja biologiczna	100
10.2.1. miR-210-5p jako marker odpowiedzi na hipoksję i zaburzeń metabolicznych	101
10.2.2. miR-195-5p jako marker komponentu metaboliczno-naczyniowego	102
10.2.3. miR-21-5p jako marker przebudowy, włóknienia i wygaszania odpowiedzi pozawałowej	103
10.2.4. miR-1-5p jako marker uszkodzenia kardiomiocytów i wczesnej dysfunkcji lewej komory	104
10.3. Czy dane wspierają efekt empagliflozyny?	105
10.4. Znaczenie kliniczne wyników	107
10.5. Ograniczenia badania	108
10.6. Dalsze kierunki badań	109
10.7. Podsumowanie dyskusji	111
11. Zakończenie	112

11.1 Podsumowanie	112
11.2. Wnioski	114
11.3. Konkluzja końcowa	115
12. Aneks	116
13. Piśmiennictwo	163
14. Opinia Komisji Bioetycznej lub Etycznej	183

1. Spis rycin

Rycina 1. Schemat analizy sygnatur miRNA u pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz różną ciężkością ostrego zawału mięśnia sercowego.

Rycina 2. Związek między krążącymi miRNA a mechanizmami patofizjologicznymi chorób układu sercowo-naczyniowego.

Rycina 3. Potencjalna rola miRNA i lncRNA w mechanizmach uszkodzenia mięśnia sercowego.

Rycina 4. Schemat stratyfikacji fenotypowej kohorty pacjentów po ACS (n=106) wg statusu metabolicznego (T2DM) oraz stopnia dysfunkcji skurczowej lewej komory serca (LVEF).

Rycina 5. Schemat rekrutacji kohorty do podbadania biomarkerowego (badanie EMMY).

Rycina 6. Niekodujące RNA jako mediatory plejotropowych efektów inhibitorów SGLT2 - synteza danych z przeglądu literatury na podstawie [1].

Rycina 7. Mechanizm działania miRNA i circRNA w powiązaniu z SGLT2 (na podstawie [1]).

Rycina 8. Sieć interakcji między genami mRNA a procesami wybranymi na podstawie piśmiennictwa.

Rycina 9. Wykresy pudełkowe przedstawiają ekspresję miRNA w zależności od obecności T2DM i zmian w czasie.

Rycina 10. Zmiany ekspresji miR-210-5p i miR-195-5p oraz ich wartość diagnostyczna oceniona metodą ROC w odniesieniu do T2DM i HbA1c $\geq 6,5\%$.

Rycina 11. Wyjściowe wykresy pudełkowe i krzywe ROC dla miR-1-5p, eGFR, NT-proBNP oraz hs-cTn w odniesieniu do ciężkości ACS zdefiniowanej jako LVEF $\leq 40\%$.

Rycina 12. Krzywe ROC dla połączonego panelu. Połączony panel parametrów (wysokie miR-1-5p, niskie eGFR, wysokie NT-proBNP) wykorzystano do wyznaczenia wyjściowej krzywej ROC dla ciężkości ACS.

2. Spis tabel

Tabela 1. Liczebność kohorty źródłowej oraz liczebność analizowanych podgrup.

Tabela 2. Zestawy TaqMan™ miRNA Assay wykorzystane w analizie qRT-PCR.

Tabela 3. Zmienne uwzględnione w analizach ROC i modelach regresji.

Tabela 4. Wyniki analizy in silico: liczba przewidywanych genów docelowych dla wyselekcjonowanych cząsteczek miRNA w ontologii procesów biologicznych (GO) i bazach chorobowych (DisGeNET i T2D database).

Tabela 5. Wyjściowa charakterystyka demograficzna, kliniczna, laboratoryjna i ekspresja miRNA w zależności od obecności T2DM.

Tabela 6. Wyjściowa charakterystyka demograficzna, kliniczna i laboratoryjna w zależności od ciężkości ACS na podstawie LVEF.

Tabela 7. Wieloczynnikowy model regresji logistycznej służący do przewidywania ciężkości ACS zdefiniowanej jako $LVEF \leq 40\%$ w punkcie wyjściowym.

Tabela 8 (Aneks). Badania in vitro, na zwierzętach i u ludzi oceniające rolę analizowanych miRNA.

3. Wykaz używanych skrótów

Skrót	Rozwinięcie w j. polskim	Rozwinięcie w j. angielskim
95% CI	95-procentowy przedział ufności	95% confidence interval
A	zwierzę / model zwierzęcy	animal
ACE-I	inhibitor konwertazy angiotensyny	angiotensin-converting enzyme inhibitor
ACS	ostry zespół wieńcowy	acute coronary syndrome
AHF	ostra niewydolność serca	acute heart failure
AKT/p-AKT	kinaza białkowa B/ufosforylowana kinaza AKT	protein kinase B / phosphorylated AKT
ALDH2	dehydrogenaza aldehydowa 2	aldehyde dehydrogenase 2
ALK5	kinaza podobna do receptora aktywiny 5	activin receptor-like kinase 5
AMI	ostry zawał mięśnia sercowego	acute myocardial infarction
AMPK	kinaza białkowa aktywowana AMP	AMP-activated protein kinase
Ang II	angiotensyna II	angiotensin II
ANRIL	antysensowny niekodujący RNA w locus INK4	antisense non-coding RNA in the INK4 locus
AP	dławica piersiowa	angina pectoris
AP-1	białko aktywujące 1	activator protein 1
APAF-1	czynnik 1 aktywujący proteazę apoptotyczną	apoptotic protease activating factor 1
ARB	antagonista/bloker receptora angiotensyny II	angiotensin receptor blocker(s)
ARNI	inhibitor receptora angiotensyny i neprylizyny	angiotensin receptor-neprilysin inhibitor
assay ID	identyfikator oznaczenia	assay identifier
ATP	adenozynotrifosforan/trifosforan adenozyny	adenosine triphosphate
AUC	pole pod krzywą ROC	area under the ROC curve

Bax	białko X związane z BCL2	BCL2-associated X protein
Bcl-2	białko chłoniaka z komórek B 2	B-cell lymphoma 2
BMI	wskaźnik masy ciała	body mass index
BMSCs	mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego	bone marrow mesenchymal stem cells
c-miRNA	krążące mikroRNA	circulating microRNA
CAD	choroba wieńcowa	coronary artery disease
Caspase-3	kaspaza 3	caspase-3
Cav3	kaweolina 3	caveolin-3
CD31	marker różnicowania CD31	cluster of differentiation 31
CDK13	kinaza zależna od cyklin 13	cyclin-dependent kinase 13
CDR132L	oligonukleotydowy inhibitor miR-132	anti-miR-132 oligonucleotide
CF / CFs	fibroblast/fibroblasty sercowe	cardiac fibroblast(s)
CHD	choroba niedokrwienna serca	coronary heart disease
CI	przedział ufności	confidence interval
CIAPIN1	inhibitor apoptozy indukowany cytokinami 1	cytokine-induced apoptosis inhibitor 1
circRNA	kolisty RNA	circular RNA
CKD	przewlekła choroba nerek	chronic kidney disease
CMECs	komórki śródbłónka mikrokrążenia sercowego	cardiac microvascular endothelial cells
Col1	kolagen typu I	collagen type I
Col15a1	łańcuch alfa 1 kolagenu typu XV	collagen type XV alpha 1 chain
Col1a1	łańcuch alfa 1 kolagenu typu I	collagen type I alpha 1 chain
Col1a2	łańcuch alfa 2 kolagenu typu I	collagen type I alpha 2 chain
Col3	kolagen typu III	collagen type III
CPS	zespół bólu w klatce piersiowej	chest pain syndrome
CRP	białko C-reaktywne	C-reactive protein
Ct	próg cyklu w reakcji qPCR	cycle threshold
CT	grupa kontrolna	control

CTGF / Ctgf	czynnik wzrostu tkanki łącznej	connective tissue growth factor
CTL	kontrola	control
CVD	choroba układu sercowo- naczyniowego	cardiovascular disease
Cx43	koneksyna 43	connexin 43
CypD	cyklofilina D	cyclophilin D
D	zastosowanie diagnostyczne	diagnostic
DAMP	wzorzec molekularny związany z uszkodzeniem	damage-associated molecular pattern
DAPA	dapagliflozyna	dapagliflozin
Dapk1	kinaza białkowa 1 związana ze śmiercią komórki	death-associated protein kinase 1
DisGeNET	baza danych powiązań gen- choroba	Disease Gene Network
DPP-4	dipeptydylopeptydaza 4	dipeptidyl peptidase-4
DPP-4i	inhibitory dipeptydylopeptydazy 4	dipeptidyl peptidase-4 inhibitors
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa	extracellular matrix
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy	ethylenediaminetetraacetic acid
EDV	objętość końcoworozkurczowa lewej komory	end-diastolic volume
EF	frakcja wyrzutowa	ejection fraction
Efan3	efryna A3	ephrin A3
eGFR	szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej	estimated glomerular filtration rate
EKG	elektrokardiografia/ elektrokardiogram	electrocardiography/ electrocardiogram
EMMY	Empagliflozyna w ostrym zawale mięśnia sercowego	EMpagliflozin in acute MYocardial infarction trial
EMPA	empagliflozyna	empagliflozin

ERK1/2	kinaza 1/2 regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ESC	Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne	European Society of Cardiology
ESV	objętość końcowoskurczowa lewej komory	end-systolic volume
EVs	pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	extracellular vesicles
FAP	białko aktywacji fibroblastów	fibroblast activation protein
FAS	receptor śmierci komórkowej Fas	Fas cell surface death receptor
Fos-AP1	kompleks Fos/AP-1	Fos/activator protein 1
Foxp3	czynn timeranskrypcyjny Foxp3	forkhead box P3
GAS5	transkrypt GAS5 związany z zatrzymaniem wzrostu	growth arrest-specific 5
GATA-4	białko wiążące GATA 4	GATA binding protein 4
GCP	Dobra Praktyka Kliniczna	Good Clinical Practice
Gig-2	gen hamujący wzrost 2	growth inhibitory gene 2
GLP-1 RA	agonista receptora glukagonopodobnego peptydu 1	glucagon-like peptide-1 receptor agonist(s)
GO	ontologia genów	Gene Ontology
GPD2	dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa 2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
GSK-3β	kinaza syntazy glikogenu 3β	glycogen synthase kinase-3β
H	człowiek	human
H/R	hipoksja/reoksygenacja	hypoxia/reoxygenation
H19	imprintowany transkrypt H19 z ekspresją allelu matczynego	H19 imprinted maternally expressed transcript
H9c2/H9C2	linia komórkowa kardiomioblastów szczura H9c2	H9c2 cardiomyoblast cell line
HbA1c	hemoglobina glikowana A1c	glycated hemoglobin A1c
HC	zdrowa grupa kontrolna	healthy control
HCM	ludzkie kardiomiocyty	human cardiomyocytes

HDL	lipoproteina o dużej gęstości	high-density lipoprotein
HE	ludzkie komórki śródbłónka	human endothelial cells
HF	niewydolność serca	heart failure
HGF	czynn timer wzrostu hepatocytów	hepatocyte growth factor
HIF1α /	czynn timer indukowany hipoksją 1 alfa	hypoxia-inducible factor 1 alpha
HIPK3	kinaza białkowa 3 oddziałująca z homeodomeną	homeodomain-interacting protein kinase 3
HK-2 cell	komórka HK-2; ludzka linia komórek cewki proksymalnej nerki	HK-2 cell; human proximal tubular epithelial cell line
HL-1	linia komórkowa mysich kardiomiocytów przedsionkowych, zdolna do spontanicznego kurczenia się i zachowująca cechy fenotypowe dojrzałych kardiomiocytów	immortalized mouse atrial cardiomyocyte cell line capable of spontaneous contraction and retaining phenotypic
HOTAIR	antysensowny RNA transkryptu HOX	HOX transcript antisense RNA
HOXA9	białko homeobox A9	homeobox A9
hs-cTn/ hsTroponina	wysokoczula troponina sercowa	high-sensitivity cardiac troponin
hsa	człowiek	Homo sapiens
hUCMSCs	ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pępowiny	human umbilical cord mesenchymal stem cells
HUVECs	komórki śródbłónka żyły pępowinowej człowieka	human umbilical vein endothelial cells
I/R	niedokrwienie/reperfuzja	ischemia/reperfusion
ICH	Międzynarodowa Rada ds. Harmonizacji	International Council for Harmonisation
ICM	kardiomiopatia niedokrwien na	ischemic cardiomyopathy

ID	identyfikator	identifier
IL-1	interleukina 1	interleukin-1
IL-17A	interleukina 17A	interleukin-17A
IL-18	interleukina 18	interleukin-18
IL-1β	interleukina 1 beta	interleukin-1 beta
IL-6	interleukina 6	interleukin-6
IP	niedokrwienne kondycjonowanie wstępne	ischemic preconditioning
IQR	rozstęp międzykwartyłowy	interquartile range
IR	niedokrwienie/reperfuzja	ischemia/reperfusion
IR-ATO	całkowita okluzja tętnicy odpowiedzialnej za zawał	infarct-related artery total occlusion
IR-BVR	rekanalizacja naczynia odpowiedzialnego za zawał	infarct-related blood vessel recanalization
Iscu	enzym składania klastrów żelazowo-siarkowych	iron-sulfur cluster assembly enzyme
ITGB3	integryna beta 3	integrin beta 3
Jagged1	ligand Notch Jagged1	Jagged canonical Notch ligand 1
JNK	kinaza N-końcowa c-Jun	c-Jun N-terminal kinase
JUN	protoonkogen Jun / czynnik transkrypcyjny Jun	Jun proto-oncogene
KBTBD7	białko 7 zawierające powtórzenia Kelch i domenę BTB	kelch repeat and BTB domain- containing protein 7
Kcnq1ot1	antysensowny transkrypt 1 przeciwległej nici KCNQ1	KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1
KIF1	członek rodziny kinezyn 1	kinesin family member 1
KIF1α	członek rodziny kinezyn 1A	kinesin family member 1A
KLF13	czynnik podobny do Krüppela 13	Krüppel-like factor 13
KLF9	czynnik podobny do Krüppela 9	Krüppel-like factor 9
KO	nokaut genu	knockout

LAD	gałąź przednia zstępująca lewej tętnicy wieńcowej	left anterior descending coronary artery
LC3-II	forma II lekkiego łańcucha 3 białka 1 związanego z mikrotubulami	microtubule-associated protein 1 light chain 3-II
LDL	lipoproteina o małej gęstości	low-density lipoprotein
LEF	niska frakcja wyrzutowa	low ejection fraction
LKB1/AMPK	kinaza wątrobową B1 / kinaza białkowa aktywowana AMP	liver kinase B1 / AMP-activated protein kinase
lncRNA	długi niekodujący RNA	long non-coding RNA
LOG10	logarytm dziesiętny	base-10 logarithm
LV	lewa komora serca	left ventricle
LV-GFP	wektor lentiwirusowy z białkiem GFP	lentiviral green fluorescent protein vector
LVEF	frakcja wyrzutowa lewej komory	left ventricular ejection fraction
LVR	przebudowa lewej komory	left ventricular remodeling
M-EVs	modyfikowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	modified extracellular vesicles
MALAT1	transkrypt 1 związany z przerzutami gruczolakoraka płuca	metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1
MAPK	kinaza białkowa aktywowana mitogenami	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów 1	monocyte chemoattractant protein-1
MCU	mitochondrialny uniporter wapniowy	mitochondrial calcium uniporter
MI	zawał mięśnia sercowego	myocardial infarction
mimic	mimetyk; syntetyczna cząsteczka naśladująca	mimic
miR, miRNA	mikroRNA	microRNA

MKK3/6	kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami 3/6	mitogen-activated protein kinase kinase 3/6
MMP / MMPs	metaloproteinaza/metaloproteina zy macierzy zewnątrzkomórkowej	matrix metalloproteinase(s)
MRA	antagonista/antagoniści receptora mineralokortykoidowego	mineralocorticoid receptor antagonist(s)
mRNA	informacyjny RNA / matrycowy RNA	messenger RNA
mt-COX1	mitochondrialna podjednostka 1 oksydazy cytochromu c	mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1
myo-miRNA	miRNA specyficzne dla mięśnia sercowego	myocardial miRNA
N-EVs	pęcherzyki zewnątrzkomórkowe kondycjonowane mononukleotydem nikotynamidu	nicotinamide mononucleotide- conditioned extracellular vesicles
NC	kontrola negatywna	negative control
ncRNA	niekodujący RNA	non-coding RNA
Ndufa4	podjednostka NDUFA4 oksydazy cytochromu c	cytochrome c oxidase subunit NDUFA4
NEDD4	ligaza ubikwitynowa NEDD4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
NEF	prawidłowa frakcja wyrzutowa	normal ejection fraction
NF-YA/cGMP	podjednostka alfa jądrowego czynnika transkrypcyjnego Y/cykliczny monofosforan guanozyny	nuclear transcription factor Y subunit alpha/cyclic guanosine monophosphate
NF-κB	jądrowy czynnik κB	nuclear factor kappa B
NLRP3	białko NLRP3 zawierające domenę pirynową	NLR family pyrin domain containing 3

Non-T2DM	bez cukrzycy typu 2	non-type 2 diabetes mellitus
NOS3	syntaza tlenku azotu 3	nitric oxide synthase 3
NOTCH	receptor Notch	Notch receptor
Notch1	receptor Notch 1	Notch receptor 1
NRCMs	kardiomiocyty noworodków szczurów	neonatal rat cardiomyocytes
NRVMs	komorowe miocyty noworodków szczurów	neonatal rat ventricular myocytes
NS	w kontekście statystycznym: wynik nieistotny statystycznie	in statistical context: not significant
NSCLC	niedrobnokomórkowy rak płuca	non-small cell lung cancer
NSTEMI	zawał mięśnia sercowego bez uniesienia odcinka ST	non-ST-segment elevation myocardial infarction
NT-proBNP	N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
OR	iloraz szans	odds ratio
P	zastosowanie prognostyczne	prognostic
p	wartość p / poziom istotności statystycznej	p-value / probability value
p38/p38 MAPK	kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenami	p38 mitogen-activated protein kinase
p53	białko supresorowe nowotworu p53	tumor protein p53
p62	sekwestosom 1	sequestosome 1
PB-sEVs	małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące z krwi obwodowej	peripheral blood-derived small extracellular vesicles
PCI	przezskórna interwencja wieńcowa	percutaneous coronary intervention
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy	polymerase chain reaction

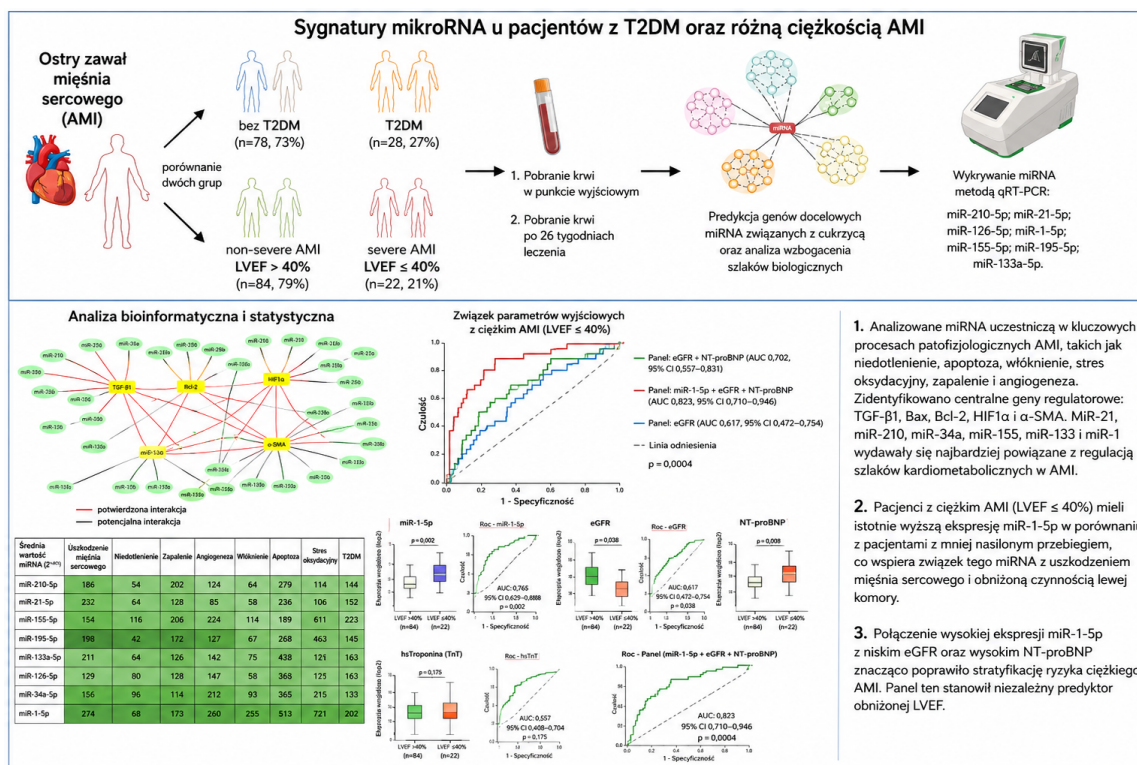
PDCD4	białko programowanej śmierci komórki 4	programmed cell death 4
PEG	glikol polietylenowy	polyethylene glycol
PI3K	kinaza 3-fosfoinozytydowa	phosphoinositide 3-kinase
PI3K/AKT	kinaza 3-fosfoinozytydowa / kinaza białkowa B	phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B
PKC	kinaza białkowa C	protein kinase C
PLA	kwas polimlekowy	polylactic acid
PTEN	homolog fosfatazy i tensyny	phosphatase and tensin homolog
Ptp1b	niereceptorowa fosfataza tyrozynowa typu 1	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1
QC	kontrola jakości	quality control
QKI	białko wiążące RNA QKI zawierające domenę KH	QKI, KH domain-containing RNA binding protein
qRT-PCR	ilościowa reakcja PCR po odwrotnej transkrypcji	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
Rap1	białko 1 związane z Ras	Ras-related protein 1
RECK	bogate w cysteinę białko indukujące rewersję	reversion-inducing cysteine-rich protein
RGD	motyw arginina–glicyna–kwas asparaginowy	arginine-glycine-aspartic acid motif
Rian	RNA imprintowany i akumulowany w jądrze	RNA imprinted and accumulated in nucleus
RNA	kwas rybonukleinowy	ribonucleic acid
ROC	krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika	receiver operating characteristic
ROS	reaktywne formy tlenu	reactive oxygen species
RT-PCR	reakcja PCR po odwrotnej transkrypcji	reverse transcription polymerase chain reaction
RUNX3	czynn timeranskrypcyjny RUNX3	runt-related transcription factor 3
SA	stabilna dławica piersiowa	stable angina

SAP	stabilna dławica piersiowa	stable angina pectoris
SCD	nagły zgon sercowy	sudden cardiac death
SD	szczep szczurów Sprague-Dawley	standard deviation
sEVs	małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	small extracellular vesicles
SGK	kinaza regulowana przez surowicę i glikokortykoidy	serum/glucocorticoid-regulated kinase
SGLT2	kotransporter sodowo-glukozowy typu 2	sodium-glucose cotransporter type 2
SGLT2i	inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego typu 2	sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors
siRNA	mały interferujący RNA	small interfering RNA
SIRT1	sirtuina 1	sirtuin 1
SIRT3	sirtuina 3	sirtuin 3
SLC5A2	gen kodujący SGLT2	solute carrier family 5 member 2
SMAD3	białko z rodziny SMAD 3	SMAD family member 3
Smad3 / Smad4 / Smad7	białka z rodziny SMAD 3/4/7	SMAD family member 3/4/7
small RNA	małe RNA	small RNA
SOCS-1	supresor sygnalizacji cytokin 1	suppressor of cytokine signaling 1
Spry1	antagonista sygnalizacji RTK Sprouty1	sprouty RTK signaling antagonist 1
STAT3	przełącznik sygnału i aktywator transkrypcji 3	signal transducer and activator of transcription 3
STEMI	zawał mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST	ST-segment elevation myocardial infarction
STRN	striatyna	striatin
SUD	nagły nieoczekiwany zgon	sudden unexpected death
T	zastosowanie terapeutyczne	therapeutic

T2D database	baza genów powiązanych z cukrzycą typu 2	Type 2 Diabetes database
T2DM	cukrzyca typu 2	type 2 diabetes mellitus
TCF7	czynn timeranskrypcyjny 7	transcription factor 7
TGF-β1	transformujący czynnik wzrostu beta 1	transforming growth factor beta 1
TGF-β2	transformujący czynnik wzrostu beta 2	transforming growth factor beta 2
TGFβ	transformujący czynnik wzrostu beta	transforming growth factor beta
TLR4	receptor Toll-podobny 4	Toll-like receptor 4
TNF	czynnik martwicy nowotworów	tumor necrosis factor
TNFα / TNF-α	czynnik martwicy nowotworów alfa	tumor necrosis factor alpha
TnI	troponina I	troponin I
TNRC6a	adaptor 6A zawierający powtórzenia trójnukleotydowe	trinucleotide repeat-containing adaptor 6A
TnT	troponina T	troponin T
total RNA	całkowite RNA	total RNA
TP53INP1	jądrowe białko 1 indukowane przez p53	tumor protein p53-inducible nuclear protein 1
TRAF3	czynnik 3 związany z receptorem TNF	TNF receptor-associated factor 3
TRAF3IP2	białko 2 oddziałujące z TRAF3	TRAF3 interacting protein 2
Treg cells	limfocyty T regulatorowe	regulatory T cells
TTC	kardiomiopatia Takotsubo albo chlorek trifenyltetrazoliowy	Takotsubo cardiomyopathy or triphenyltetrazolium chloride
UA / UAP	niestabilna dławica piersiowa	unstable angina pectoris
UCA1	transkrypt UCA1 związany z rakiem urotelialnym	urothelial cancer-associated 1
UPS	układ ubikwityna–proteasom	ubiquitin-proteasome system

VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego	vascular endothelial growth factor
VEGF-A	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu A	vascular endothelial growth factor A
WT	typ dziki	wild type
WUM	Warszawski Uniwersytet Medyczny	Medical University of Warsaw
XIAP	sprzężone z chromosomem X białko hamujące apoptozę	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZNF280c	białko palca cynkowego 280C	zinc finger protein 280C
α-SMA	alfa-aktyna mięśni gładkich	alpha-smooth muscle actin
β1AR/β2AR	receptor β 1-/ β 2-adrenergiczny	beta-1/beta-2 adrenergic receptor

4. Streszczenie w języku polskim



Rycina 1. Schemat analizy sygnatur miRNA u pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz różną ciężkością ostrego zawału mięśnia sercowego.

Zastosowane skróty: **α-SMA**, ang. *alpha-smooth muscle actin*, alfa-aktyna mięśni gładkich; **AMI**, ang. *acute myocardial infarction*, ostry zawał mięśnia sercowego; **AUC**, ang. *area under the curve*, pole pod krzywą; **Bax**, ang. *BCL2-associated X protein*, białko X związane z BCL2; **Bcl-2**, ang. *B-cell lymphoma 2*, białko chłoniaka z komórek B 2; **CI**, ang. *confidence interval*, przedział ufności; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*, szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej; **HIF1α**, ang. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*, czynnik indukowany hipoksją 1 alfa; **LV**, ang. *left ventricle*, lewa komora serca; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory; **miR**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **miRNA**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **NF-κB / NF-kB**, ang. *nuclear factor kappa B*, jądrowy czynnik κB; **Non-T2DM**, ang. *non-type 2 diabetes mellitus*, bez cukrzycy typu 2; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B; **qRT-PCR**, ang. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją; **ROC**, ang. *receiver operating characteristic*, charakterystyka operacyjna odbiornika; **T2DM**, ang. *type 2 diabetes mellitus*, cukrzyca typu 2; **TGF-β1**, ang. *transforming growth factor beta 1*, transformujący czynnik wzrostu beta 1; **TnT**, ang. *troponin T*, troponina T.

Choroby kardiometaboliczne, w tym ostry zespół wieńcowy (ang. *acute coronary syndrome*, ACS) oraz cukrzyca typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM), pozostają

istotnym wyzwaniem klinicznym ze względu na wysokie ryzyko niewydolności serca, niekorzystnej przebudowy lewej komory i długoterminowych powikłań sercowo-naczyniowych. Inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego typu 2 (ang. *Sodium-Glucose Co-Transporter type 2*, SGLT2), w tym empagliflozyna, wykazują działanie kardioprotekcyjne wykraczające poza kontrolę glikemii, jednak molekularne mechanizmy tych efektów nie zostały w pełni wyjaśnione. Jednym z potencjalnych ogniw łączących sygnalizację SGLT2, zaburzenia metaboliczne oraz przebudowę pozawałową są niekodujące RNA, zwłaszcza mikroRNA (ang. *microRNA*, miRNA, miR), które regulują ekspresję genów związanych z hipoksją, apoptozą, włóknieniem, stresem oksydacyjnym, zapaleniem, angiogenezą.

Celem rozprawy była ocena roli wybranych krążących miRNA jako biomarkerów statusu metabolicznego i ciężkości ACS oraz zintegrowanie wyników klinicznych z analizą bioinformatyczną osi SGLT2 oraz niekodujących RNA (ang. *non-coding RNA*, ncRNA) (**Rycina 1**). Praca obejmowała analizę wtórną, stanowiącą podbadanie biomarkerowe badania klinicznego EMMY (Impact of EMPagliflozin on Cardiac Function and Biomarkers of Heart Failure in Patients With Acute MYocardial Infarction; NCT03087773). Do końcowej analizy włączono 106 pacjentów po ACS leczonych empagliflozyną w dawce 10 mg na dobę, u których dostępne były sparowane próbki osocza pobrane w punkcie wyjściowym oraz po 26 tygodniach leczenia. Łącznie przeanalizowano 212 próbek. T2DM rozpoznano u 28 pacjentów (26%), natomiast 78 pacjentów (74%) nie miało T2DM. Cięższy przebieg ACS zdefiniowano jako frakcję wyrzutową lewej komory serca (ang. *left ventricular ejection fraction*, LVEF) $\leq 40\%$, którą stwierdzono u 22 pacjentów (21%). Ekspresję wybranych miRNA oznaczano metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, qRT-PCR), a ich potencjalne geny docelowe i powiązane szlaki biologiczne oceniano z wykorzystaniem analiz bioinformatycznych i statystycznych.

Analiza bioinformatyczna wykazała, że badane miRNA są powiązane z procesami kluczowymi dla przebudowy mięśnia sercowego i powikłań kardiometabolicznych. Wśród najważniejszych współdzielonych genów i regulatorów zidentyfikowano m.in. transformujący czynnik wzrostu beta 1 (ang. *Transforming Growth Factor Beta 1*, TGF- $\beta 1$), białko X związane z Bcl-2 (ang. *Bcl-2-associated X protein*, Bax), białko chłoniaka

z komórek B 2 (ang. *B-cell lymphoma 2*, Bcl-2), czynnik indukowany hipoksją 1 alfa (ang. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*, HIF1 α) oraz alfa-aktynę mięśni gładkich (ang. *alpha-smooth muscle actin*, α -SMA), a najwyższą łączność w sieciach wykazywały m.in. miR-21, miR-210, miR-34a, miR-155, miR-133 oraz miR-1. Wyniki te uzasadniają traktowanie wybranych miRNA nie tylko jako markerów uszkodzenia, lecz także jako potencjalnych regulatorów szlaków związanych z niedotlenieniem, zapaleniem, włóknieniem, angiogenezą i przebudową lewej komory serca.

W części klinicznej wykazano, że obecność T2DM wiąże się z odmiennym profilem ekspresji miRNA u pacjentów po ACS. W punkcie wyjściowym pacjenci z T2DM mieli istotnie niższą ekspresję miR-210-5p oraz istotnie wyższą ekspresję miR-195-5p. MiR-210-5p wykazywał dobrą zdolność różnicowania pacjentów z T2DM pole pod krzywą ROC (ang. *area under the ROC curve*, AUC) wynosiło 0,811, natomiast miR-195-5p osiągnął AUC 0,723. Analiza podłużna wykazała wzrost ekspresji miR-210-5p po 26 tygodniach, przy utrzymujących się niższych wartościach u pacjentów z T2DM, oraz istotne obniżenie miR-21-5p w obu grupach. Wyniki te sugerują, że miR-210-5p może odzwierciedlać zaburzoną odpowiedź hipoksyjno-adaptacyjną w T2DM, miR-195-5p przewlekły komponent metaboliczno-naczyniowy, a miR-21-5p dynamikę procesów zapalno-włóknieniowych w okresie pozawałowym.

Najsilniejszy związek z ciężkością ACS wykazywał miR-1-5p. Pacjenci z LVEF $\leq 40\%$ mieli istotnie wyższe wyjściowe poziomy miR-1-5p niż osoby z LVEF $> 40\%$. W analizie ROC miR-1-5p osiągnął AUC 0,765, przewyższając wybrane klasyczne parametry, takie jak szacowany współczynnik filtracji kłębuszkowej (ang. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR) i N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B (ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, NT-proBNP), podczas gdy troponina wysokoczuła (ang. *high-sensitivity troponin*, hsTroponina) nie była istotnie związana z ciężkością ACS. Połączenie wysokiego miR-1-5p, niskiego eGFR i wysokiego NT-proBNP w panelu wielomarkerowym zwiększyło zdolność dyskryminacyjną do AUC 0,823 i pozostawało niezależnym predyktorem LVEF $\leq 40\%$ w modelu regresji logistycznej iloraz szans, ang. *odds ratio*, OR wynosił 8,037; natomiast przedział ufności, ang. *confidence interval*, 95% CI wynosił 2,207-29,265 ($p = 0,002$).

Podsumowując, rozprawa wskazuje, że oś SGLT2-ncRNA oraz wybrane krążące miRNA stanowią istotne elementy molekularnej charakterystyki pacjentów po ACS. MiR-210-5p i miR-195-5p są związane głównie z fenotypem metabolicznym T2DM, miR-21-5p może odzwierciedlać dynamikę przebudowy pozawałowej, natomiast miR-1-5p wnosi dodatkową wartość w ocenie ciężkości ACS i dysfunkcji lewej komory. Uzyskane dane wspierają potencjał miRNA jako biomarkerów medycyny precyzyjnej, szczególnie w modelach integrujących dane molekularne z parametrami kliniczno-laboratoryjnymi. Ze względu na wtórny, eksploracyjny charakter analizy, ograniczoną liczebność kohorty oraz brak bezpośredniego porównania z placebo w analizie biomarkerowej, wyniki wymagają dalszej walidacji w większych kohortach i badaniach mechanistycznych.

Słowa kluczowe: cukrzyca typu 2; ostry zawał mięśnia sercowego; empagliflozyna; inhibitory SGLT2; mikroRNA; miRNA; niekodujące RNA; LVEF; biomarkery; medycyna precyzyjna.

5. Streszczenie w języku angielskim

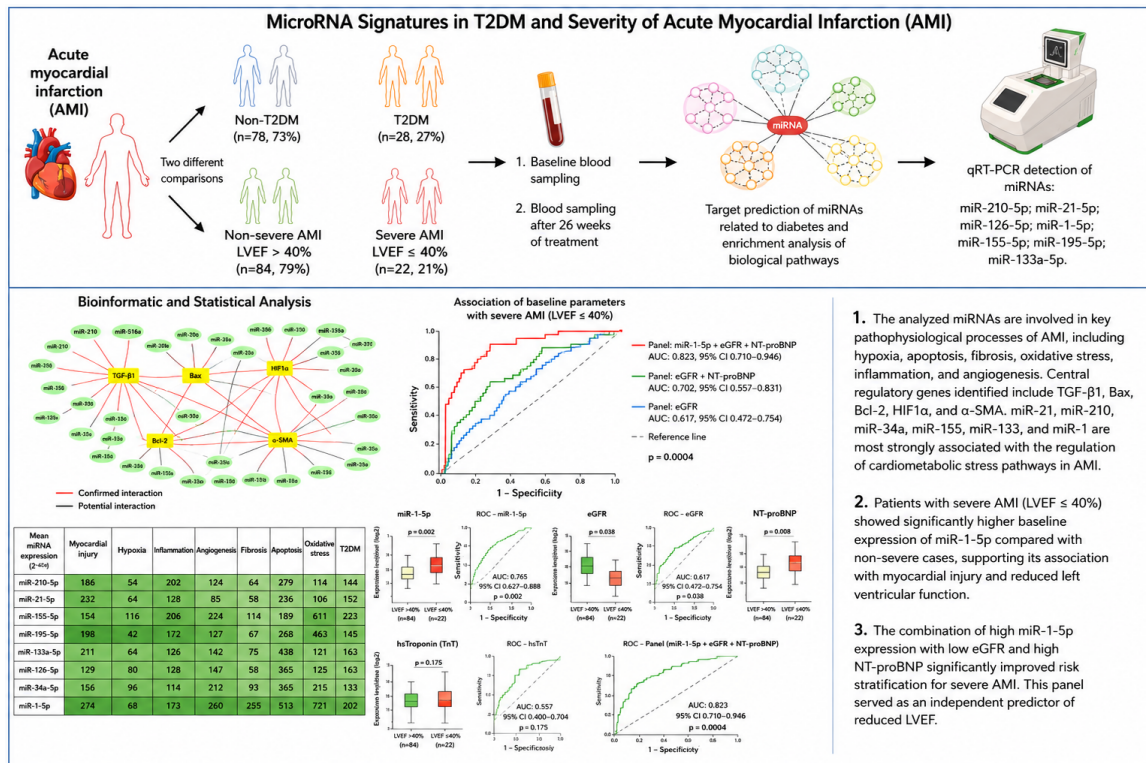


Figure 1. Study workflow and microRNA signatures associated with type 2 diabetes and acute myocardial infarction severity.

Abbreviations: **α-SMA**, ang. *alpha-smooth muscle actin*; **AMI**, ang. *acute myocardial infarction*; **AUC**, ang. *area under the curve*; **Bax**, ang. *BCL2-associated X protein*; **Bcl-2**, ang. *B-cell lymphoma 2*; **CI**, ang. *confidence interval*; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*; **HIF1α**, ang. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*; **LV**, ang. *left ventricle*; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*; **miR**, **miRNA** ang. *microRNA*; **NF-κB**, ang. *nuclear factor kappa B*; **Non-T2DM**, ang. *non-type 2 diabetes mellitus*; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*; **qRT-PCR**, ang. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*; **ROC**, ang. *receiver operating characteristic*; **T2DM**, ang. *type 2 diabetes mellitus*; **TGF-β1**, ang. *transforming growth factor beta 1*; **TnT**, ang. *troponin T*.

Cardiometabolic diseases, including acute coronary syndrome (ACS) and type 2 diabetes mellitus (T2DM), remain major clinical challenges because of their association with heart failure, adverse left ventricular remodeling, and long-term cardiovascular complications. Sodium-glucose cotransporter type 2 (SGLT2) inhibitors, including empagliflozin, exert cardioprotective effects that extend beyond glucose lowering; however, the molecular mechanisms underlying these effects are not fully understood. Non-coding RNAs, particularly microRNAs (miRNAs), may represent a mechanistic link between SGLT2-related signaling, metabolic dysregulation, and post-infarction remodeling, as they

regulate gene expression pathways involved in hypoxia, apoptosis, fibrosis, oxidative stress, inflammation, and angiogenesis.

The aim of this doctoral thesis was to evaluate selected circulating miRNAs as biomarkers of metabolic status and ACS severity and to integrate clinical findings with bioinformatic analysis of the SGLT2 and noncoding RNA axis (**Figure 1**). The study was performed as a secondary biomarker substudy of the EMMY trial (NCT03087773). The final analysis included 106 patients after ACS treated with empagliflozin 10 mg once daily, for whom paired plasma samples were available at baseline and after 26 weeks of treatment. In total, 212 plasma samples were analyzed. T2DM was present in 28 patients (26%), whereas 78 patients (74%) did not have T2DM. Severe ACS was defined as left ventricular ejection fraction (LVEF) $\leq 40\%$ and was observed in 22 patients (21%). The expression of selected circulating miRNAs was assessed using qRT-PCR, while predicted target genes and enriched biological pathways were evaluated using bioinformatic and statistical analyses.

Bioinformatic analyses demonstrated that the investigated miRNAs were linked to processes central to myocardial remodeling and cardiometabolic disease. The main shared genes and regulatory nodes included *TGF- β 1*, *Bax*, *Bcl-2*, *HIF1 α* , and *α -SMA*, whereas miR-21, miR-210, miR-34a, miR-155, miR-133, and miR-1 showed high network connectivity. These findings support the interpretation of selected miRNAs not only as markers of injury, but also as potential regulators of biological pathways related to hypoxia, inflammation, fibrosis, angiogenesis, and left ventricular remodeling.

In the clinical part of the study, T2DM was associated with a distinct miRNA expression profile in patients after ACS. At baseline, patients with T2DM had significantly lower miR-210-5p expression and significantly higher miR-195-5p expression. MiR-210-5p showed good discriminatory ability for identifying T2DM (AUC 0.811), whereas miR-195-5p achieved an AUC of 0.723. Longitudinal analysis showed that miR-210-5p increased over 26 weeks, although its levels remained consistently lower in patients with T2DM, while miR-21-5p significantly decreased in both groups. These findings suggest that miR-210-5p may reflect an impaired hypoxia-adaptive response in T2DM, miR-195-5p a chronic metabolic-vascular component, and miR-21-5p the dynamics of inflammatory and fibrotic post-infarction remodeling.

MiR-1-5p showed the strongest association with ACS severity. Patients with LVEF $\leq 40\%$ had significantly higher baseline miR-1-5p levels than patients with LVEF $>40\%$. In ROC analysis, miR-1-5p reached an AUC of 0.765, exceeding selected conventional parameters such as eGFR and NT-proBNP, whereas hsTroponin was not significantly associated with ACS severity. A multimarker panel combining high miR-1-5p, low eGFR, and high NT-proBNP improved discrimination, reaching an AUC of 0.823, and remained an independent predictor of LVEF $\leq 40\%$ in logistic regression analysis (OR 8.037; 95% CI 2.207-29.265; $p = 0.002$).

In conclusion, this doctoral thesis identifies the SGLT2-ncRNA axis and selected circulating miRNAs as important elements of the molecular characterization of patients after ACS. MiR-210-5p and miR-195-5p are primarily associated with the metabolic phenotype of T2DM, miR-21-5p may reflect the temporal dynamics of post-infarction remodeling, and miR-1-5p provides additional value in assessing ACS severity and left ventricular dysfunction. These findings support the potential role of miRNAs as precision-medicine biomarkers, particularly when integrated with clinical and laboratory parameters. Given the secondary and exploratory nature of the analysis, the limited sample size, and the absence of direct placebo comparison in the biomarker analysis, further validation in larger cohorts and mechanistic studies is required.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; acute myocardial infarction; empagliflozin; SGLT2 inhibitors; microRNA; miRNA; non-coding RNA; LVEF; biomarkers; precision medicine.

6. Wstęp

6.1. Ostry zespół wieńcowy i ryzyko przebudowy lewej komory serca

Jednym z najważniejszych zdarzeń klinicznych prowadzących do rozwoju niewydolności serca oraz długoterminowego wzrostu ryzyka sercowo-naczyniowego pozostają ostre zespoły wieńcowe (ang. *acute coronary syndrome*, ACS). Bezpośrednią przyczyną ACS jest nagłe ograniczenie przepływu wieńcowego, najczęściej w wyniku pęknięcia lub erozji blaszki miażdżycowej i wtórnej zakrzepicy, co prowadzi do niedokrwienia, martwicy kardiomiocytów oraz uruchomienia złożonej odpowiedzi zapalno-naprawczej. W pierwszych godzinach oraz dniach po zawale zachodzą procesy mające na celu usunięcie martwiczych komórek i stabilizację uszkodzonego obszaru, jednak nadmierna lub przedłużona aktywacja tych mechanizmów może sprzyjać niekorzystnej przebudowie mięśnia serca [2–4].

Przebudowa lewej komory serca po ACS jest procesem dynamicznym, obejmującym zmiany wielkości, kształtu, geometrii i funkcji. Początkowo może mieć charakter kompensacyjny, ponieważ umożliwia utrzymanie pojemności minutowej serca mimo utraty części czynnościowo wydolnego mięśnia. Jeżeli jednak odpowiedź naprawcza jest nadmierna lub utrzymuje się zbyt długo, dochodzi do progresywnej rozstrzeni lewej komory serca, wzrostu naprężenia ściany, włóknienia śródmiąższowego, przerostu pozostałych kardiomiocytów oraz pogorszenia funkcji skurczowej [5–8]. W konsekwencji, pozawałowa przebudowa lewej komory serca staje się jednym z głównych mechanizmów przejścia od ostrego uszkodzenia niedokrwiennego do przewlekłej niewydolności serca [2,4].

W ocenie klinicznej pacjentów po ACS kluczowe znaczenie ma frakcja wyrzutowa lewej komory serca (ang. *left ventricular ejection fraction*, LVEF), która pozostaje jednym z najczęściej stosowanych parametrów stratyfikacji ryzyka. Obniżona LVEF identyfikuje pacjentów z większym ryzykiem rozwoju niewydolności serca, zaburzeń rytmu, ponownej hospitalizacji i zgonu. Szczególne znaczenie kliniczne ma próg $LVEF \leq 40\%$, ponieważ wskazuje na istotną dysfunkcję skurczową lewej komory serca i wyodrębnia populację szczególnie narażoną na niekorzystne odległe następstwa ACS. Mimo postępu w leczeniu reperfuzyjnym i farmakoterapii, pacjenci z istotnie obniżoną LVEF po zawale nadal stanowią grupę bardzo wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego [9].

Sama wartość LVEF nie odzwierciedla jednak całej złożoności procesów zachodzących w mięśniu sercowym po ACS. U dwóch pacjentów o podobnej LVEF mogą występować odmienne mechanizmy molekularne, różny stopień aktywacji procesu zapalnego, nasilenia stresu oksydacyjnego, zaburzeń metabolicznych, apoptozy, hipoksji, angiogenezy i włóknienia. Z tego powodu klasyczna ocena echokardiograficzna oraz standardowe biomarkery, takie jak troponiny czy NT-proBNP nie wyczerpują biologicznej oraz klinicznej charakterystyki pacjenta po zawale. Coraz większe znaczenie przypisuje się markerom molekularnym, które mogłyby uzupełniać ocenę kliniczną i wskazywać, jakie szlaki patofizjologiczne dominują u danego chorego. Z perspektywy założeń tej rozprawy, szczególnie istotne są te mechanizmy przebudowy pozawałowej, które łączą niedokrwienie mięśnia sercowego z odpowiedzią metaboliczną i zapalną. Niedotlenienie aktywuje szlaki zależne od czynników indukowanych hipoksją, nasila produkcję reaktywnych form tlenu, zaburza funkcję mitochondriów i może prowadzić do apoptozy kardiomiocytów. Równolegle pobudzane są fibroblasty w obrębie mięśnia serca i procesy odkładania macierzy zewnątrzkomórkowej. W efekcie przebudowa lewej komory serca jest nie tylko zjawiskiem hemodynamicznym, lecz także wynikiem złożonych zmian molekularnych, w których uczestniczą regulatory ekspresji genów, w tym miRNA.

6.2. Rola T2DM w pogorszeniu rokowania po ACS

Cukrzyca typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM) należy do najważniejszych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego i istotnie wpływa na przebieg kliniczny ACS [10,11]. Choroba ta charakteryzuje się przewlekłą hiperglikemią wynikającą z insulinooporności i względnego niedoboru insuliny, a jej konsekwencje wykraczają daleko poza zaburzenia gospodarki węglowodanowej [12]. T2DM wiąże się z przewlekłym stanem zapalnym niskiego stopnia, dysfunkcją śródbłonna, nasilonym stresem oksydacyjnym, zaburzeniami gospodarki lipidowej, aktywacją układu krzepnięcia oraz przyspieszoną progresją miażdżycy [13–15].

Wśród pacjentów z T2DM częściej obserwuje się wielonaczyniową chorobę wieńcową, bardziej rozległe zmiany miażdżycowe oraz współistnienie innych czynników ryzyka, takich jak nadciśnienie tętnicze, otyłość, dyslipidemia i przewlekła choroba nerek. Obraz kliniczny ACS może być istotnie modyfikowany przez T2DM. Neuropatia autonomiczna i zaburzenia

czucia bólu mogą prowadzić do mniej typowych objawów niedokrwienia, opóźnienia rozpoznania i późniejszego wdrożenia leczenia reperfuzyjnego. W efekcie pacjenci z T2DM są narażeni na większe ryzyko rozleglejszego uszkodzenia mięśnia sercowego i powikłań pozawałowych [15].

Znaczenie T2DM w pogorszeniu rokowania po ACS wynika również z wpływu przewlekłej hiperglikemii na komórki układu sercowo-naczyniowego. Nadmiar glukozy i zaawansowane produkty glikacji nasilają stres oksydacyjny, uszkodzają śródbłonek, zaburzają biodostępność tlenu azotu i sprzyjają prozapalnemu fenotypowi naczyń. Insulinooporność wpływa na metabolizm kardiomiocytów, zmieniając wykorzystanie substratów energetycznych i zwiększając podatność mięśnia sercowego na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne (ang. *ischemia/reperfusion injury*, *I/R injury*). U pacjentów z T2DM proces gojenia po zawale może być mniej efektywny, a włóknienie i przebudowa lewej komory bardziej nasilone [16,17].

Współistnienie T2DM i ACS jest zatem przykładem nakładania się dwóch procesów patofizjologicznych, obejmujących ostre uszkodzenie niedokrwienne oraz przewlekłe zaburzenia gospodarki węglowodanowej. Z punktu klinicznego oznacza to, że pacjenci z T2DM mogą wymagać nie tylko standardowej oceny rozległości ACS, lecz także pogłębionej oceny mechanizmów metabolicznych i zapalnych, które mogą wpływać na przebieg pozawałowy. Identyfikacja markerów odzwierciedlających tę złożoną interakcję mogłaby poprawić stratyfikację ryzyka i pomóc w wyborze pacjentów wymagających intensywniejszego monitorowania.

Dotychczasowe badania wskazują, że T2DM może wiązać się z odmiennym profilem krążących cząsteczek regulatorowych, w tym miRNA. Zmiany ekspresji miRNA obserwowane w T2DM dotyczą szlaków zapalnych, oksydacyjnych, angiogennych i metabolicznych, a więc tych samych procesów, które są aktywowane po ACS. Z tego powodu analiza miRNA u pacjentów po zawale, z uwzględnieniem statusu T2DM, może dostarczyć informacji o molekularnym pomostowym mechanizmie łączącym zaburzenia metaboliczne z ciężkością uszkodzenia serca.

6.3. Znaczenie inhibitorów SGLT2 w tym empagliflozyny w kardioprotekcji

Kotransporter SGLT2 kodowany przez gen *SLC5A2*, odpowiada za większość zwrotnego wchłaniania glukozy w kanalik bliższym nerki. Farmakologiczne zahamowanie

SGLT2 prowadzi do glukozurii, natriurezy i obniżenia glikemii w mechanizmie niezależnym od insuliny. Pierwotnie inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego typu 2 (SGLT2i) klasyfikowano wyłącznie jako doustne leki o działaniu hipoglikemizującym. Jednakże dowody dostarczone przez wieloośrodkowe badania kliniczne wymusiły redefinicję paradygmatu terapeutycznego tej grupy związków. Obecnie SGLT2i są postrzegane jako leki o wielokierunkowym działaniu plejotropowym, wykazujące silny efekt kardio- i nefroprotektoryjny, którego mechanizmy pozostają w znacznej mierze niezależne od osiowego wpływu na homeostazę glukozy.

Empagliflozyna to wysoce selektywny inhibitor SGLT2, którego wielokierunkowy profil działania kardiometabolicznego wykracza poza klasyczne efekty hemodynamiczne. Choć mechanizm kardioprotekcji tradycyjnie wiąże się z optymalizacją obciążenia wstępnego i następczego (poprzez natriurezę i diurezę osmotyczną), redukcją masy ciała oraz obniżeniem ciśnienia tętniczego, to kluczowe znaczenie przypisuje się obecnie bezpośredniej modulacji procesów komórkowych. Empagliflozyna wykazuje zdolność do redukcji przewlekłego stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, poprawy bioenergetyki mitochondriów oraz stymulacji autofagii. Działania te, w połączeniu z hamowaniem procesów włóknienia i apoptozy kardiomiocytów, stanowią fundament ochrony strukturalnej i funkcjonalnej układu sercowo-naczyniowego [1].

W kontekście ACS kluczowym zagadnieniem klinicznym pozostaje wpływ modulacji szlaku SGLT2 na procesy reparacyjne oraz remodeling mięśnia sercowego po incydencie niedokrwinnym. Okres wczesno pozawałowy charakteryzuje się gwałtowną aktywacją kaskady zapalnej, nasilonym stresem oksydacyjnym oraz intensywną przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM). Choć mechanizmy te są niezbędne do wytworzenia stabilnej blizny, ich patologiczna nadaktywność determinuje progresję niekorzystnego remodelingu lewej komory. Interwencje farmakologiczne wpływające na bioenergetykę komórkową, hemodynamiczne odciążenie komór oraz odpowiedź zapalno-włóknieniową otwierają nowe możliwości terapeutyczne w modyfikacji przebiegu fazy pozawałowej.

Badanie EMMY (Empagliflozin in patients with acute MYocardial infarction) stanowiło kluczową randomizowaną próbę kliniczną, mającą na celu ocenę farmakodynamicznego wpływu empagliflozyny u pacjentów w fazie ACS. W ramach

protokołu badawczego poddano rygorystycznej ocenie wpływ inhibitora SGLT2 na parametry przebudowy strukturalnej i czynnościowej serca (remodeling) oraz dynamikę stężeń biomarkerów neurohormonalnych, w tym NT-proBNP. Z perspektywy metodologicznej tej rozprawy doktorskiej, fundamentalne znaczenie ma unikalna możliwość wykorzystania materiału biologicznego pochodzącego od tak precyzyjnie scharakteryzowanej kohorty. Pozwala to na zaawansowaną analizę sygnatur molekularnych oraz identyfikację szlaków metabolicznych modulowanych przez empagliflozynę w krytycznym oknie terapeutycznym po incydencie niedokrwiennym [18].

Pomimo ugruntowanej pozycji klinicznej inhibitorów SGLT2, molekularne mechanizmy ich działania w stanach ostrego uszkodzenia mięśnia sercowego nie zostały dotychczas w pełni zmapowane. Kluczowym obszarem badawczym pozostaje odpowiedź na pytanie, czy kardioprotekcyjne efekty empagliflozyny są mediowane poprzez modulację sygnatur epigenetycznych i regulację ekspresji genów. W tym ujęciu ncRNA, ze szczególnym uwzględnieniem krążących miRNA, stanowią obiecujące ogniwo integrujące inhibicję szlaku SGLT2 z procesami zapalenia, odpowiedzi na hipoksję, włóknienia, apoptozy oraz angiogenezy.

Uwzględnienie roli inhibicji SGLT2 w badaniach nad profilem miRNA posiada istotne uzasadnienie. Identyfikacja cząsteczek miRNA, których ekspresja ulega dynamicznym zmianom pod wpływem empagliflozyny i wykazuje korelację ze statusem metabolicznym, parametrami hemodynamicznymi lewej komory czy stężeniem biomarkerów martwicy kardiomiocytów, pozwoli na wskazanie kluczowych szlaków sygnałowych determinujących przebieg remodelingu pozawałowego. Choć obserwowane korelacje nie stanowią bezpośredniego dowodu na istnienie związku przyczynowo-skutkowego, wyznaczają one priorytetowe kierunki dla dalszej eksploracji w obszarze badań mechanistycznych i medycyny translacyjnej.

6.4. MiRNA jako regulatory i biomarkery przebudowy

Mikro RNA, to krótkie (długości około 20-24 nukleotydów), jednoniciowe, ncRNA, powstające z prekursorowych transkryptów, które odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów w większości procesów fizjologicznych i rozwojowych, a także patofizjologicznych. Ich podstawową funkcją jest potranskrypcyjna regulacja ekspresji

genów poprzez wiązanie się z docelowymi cząsteczkami matrycowego RNA (ang. *messenger RNA*, mRNA) i hamowanie translacji lub indukowanie degradacji transkryptu. Jedna cząsteczka miRNA może regulować wiele genów, a jeden gen może być kontrolowany przez liczne cząsteczki miRNA, co sprawia, że tworzą one złożone sieci regulacyjne [19,20].

W patofizjologii schorzeń układu sercowo-naczyniowego cząsteczki miRNA pełnią rolę kluczowych regulatorów posttranskrypcyjnych, modulując ekspresję genów odpowiedzialnych za procesy uszkodzenia, adaptacji oraz regeneracji miokardium. Ich aktywność regulacyjna obejmuje szerokie spektrum mechanizmów molekularnych i komórkowych, do których m.in. należą:

- **programowana śmierć komórki (apoptoza):** miRNA wpływają na szlaki sygnałowe pro- i antyapoptotyczne, decydując o przeżywalności kardiomiocytów w warunkach niedotlenienia;
- **odpowiedź immunologiczna i zapalna:** regulacja cytokin prozapalnych oraz rekrutacji leukocytów do tkanki sercowej;
- **homeostaza redoks:** modulacja enzymów zaangażowanych w generowanie i neutralizację reaktywnych form tlenu, co ma bezpośredni wpływ na natężenie stresu oksydacyjnego;
- **angiogeneza i neowaskularyzacja:** kontrola proliferacji i migracji komórek śródbłonna, istotna dla rewaskularyzacji niedokrwionego obszaru;
- **przerost kardiomiocytów:** wpływ na szlaki sygnałowe indukujące patologiczną lub adaptacyjną zmianę objętości komórek mięśnia sercowego;
- **włóknienie oraz remodeling ECM:** regulacja aktywności fibroblastów oraz ekspresji metaloproteinaz i ich inhibitorów, co determinuje architekturę tkankową i sztywność ścian serca.

Dzięki swojej stabilności w płynach ustrojowych oraz specyficzności tkankowej, cząsteczki te są obecnie intensywnie badane jako potencjalne biomarkery diagnostyczne oraz cele terapeutyczne w nowoczesnej kardiologii [21,22]. Zaburzenia regulacji profilu ekspresji specyficznych cząsteczek miRNA wykazuje silną korelację z etiopatogenezą licznych jednostek chorobowych, w tym T2DM, otyłości klinicznej, ACS oraz przewlekłej

niewydolności serca [22]. Współczesne dane naukowe wskazują, że miRNA pełnią funkcję dwutorową:

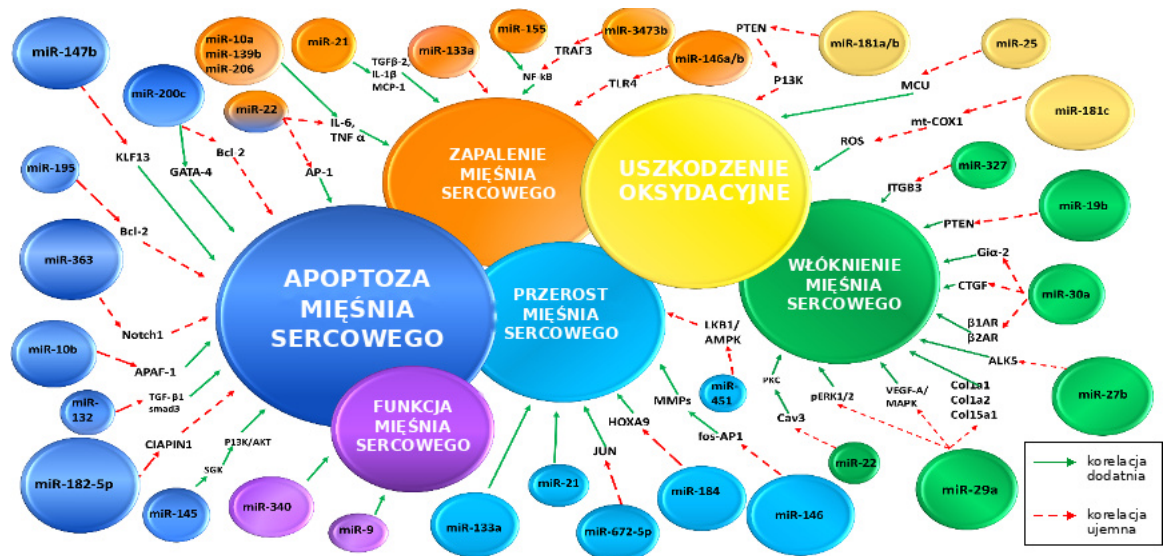
- **biomarkery diagnostyczne i prognostyczne:** jako cząsteczki krążące, odzwierciedlają aktualny stan patofizjologiczny organizmu, umożliwiając monitorowanie dynamiki zmian większości procesów [23–25].
- **aktywne modulatory fenotypu:** poprzez potranskrypcyjne wyciszanie genów docelowych, miRNA stają się integralnymi komponentami kaskad sygnałowych napędzających progresję schorzeń; uczestniczą one w patologicznej przebudowie tkanek, zaburzeniach metabolicznych oraz dysfunkcji śródbłonna, co czyni je potencjalnymi punktami uchwytu dla nowoczesnych interwencji terapeutycznych [26–28] .

Powyższe zależności sugerują, że miRNA stanowią nie tylko bierny zapis uszkodzenia tkankowego, lecz są aktywnymi determinantami losów komórkowych w przebiegu chorób metabolicznych i sercowo-naczyniowych.

6.4.1. Krążące miRNA jako biomarkery

Szczególne zainteresowanie krążącymi miRNA jako potencjalnymi biomarkerami wynika z ich wysokiej stabilności metabolicznej w obrębie osocza i surowicy, co stanowi istotną przewagę w diagnostyce molekularnej [29,30]. Odporność tych cząsteczek na degradację enzymatyczną wywołaną aktywnością endogennych rybonukleaz jest uwarunkowana ich specyficzną kompartmentacją. MikroRNA są uwalniane do krążenia układowego wewnątrz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs), takich jak egzosomy, bądź w formie kompleksów z białkami wiążącymi RNA lub lipoproteinami. Takie zabezpieczenie strukturalne pozwala na ich precyzyjną detekcję przy użyciu zaawansowanych technik biologii molekularnej, wśród których standardem pozostaje qRT-PCR [31]. W ujęciu klinicznym miRNA wykazują przewagę nad klasycznymi biomarkerami białkowymi, ponieważ ich profil ekspresji dostarcza informacji wykraczających poza fakt samego uszkodzenia komórek. Pozwalają one na monitorowanie aktywności specyficznych szlaków sygnałowych oraz procesów patofizjologicznych, takich jak kaskady zapalne, włóknienie, apoptoza, a także komórkowa odpowiedź na hipoksję i stres

oksydacyjny. Tym samym krążące miRNA pełnią rolę czułych biosensorów, które integrują sygnały z różnych poziomów regulacji komórkowej, oferując dynamiczny obraz postępujących zmian w organizmie [1,22,23,32–38]. Podejście to nabiera szczególnego znaczenia w analizie stanów klinicznych takich jak ACS oraz remodeling lewej komory serca (ang. *left ventricular remodeling*, LVR). Jednostki te charakteryzują się ścisłym współwystępowaniem i wzajemnym przenikaniem się zjawisk niedotlenienia, zapalenia, stresu oksydacyjnego oraz włóknienia. W tym kontekście profilowanie ekspresji miRNA może służyć jako zaawansowane narzędzie diagnostyczne, pozwalające na głębszą stratyfikację molekularnej heterogeniczności pacjentów po incydentach wieńcowych. Umożliwia to precyzyjną identyfikację chorych wykazujących dominację mechanizmów promujących niekorzystną LVR, co otwiera drogę do personalizacji strategii terapeutycznych.



2; **β1AR/β2AR**, ang. *beta-1/beta-2 adrenergic receptor*, receptor β1-/β2-adrenergiczny; **Cav3**, ang. *caveolin-3*, kaweolina 3; **CIAPIN1**, ang. *cytokine-induced apoptosis inhibitor 1*, inhibitor apoptozy indukowany cytokinami 1; **Colla1**, ang. *collagen type I alpha 1 chain*, łańcuch alfa 1 kolagenu typu I; **Colla2**, ang. *collagen type I alpha 2 chain*, łańcuch alfa 2 kolagenu typu I; **Coll5a1**, ang. *collagen type XV alpha 1 chain*, łańcuch alfa 1 kolagenu typu XV; **CTGF**, ang. *connective tissue growth factor*, czynnik wzrostu tkanki łącznej; **ERK1/2**, ang. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, kinaza 1/2 regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi; **Fos-AP1**, ang. *Fos/activator protein 1*, kompleks Fos/AP-1; **GATA-4**, ang. *GATA binding protein 4*, białko wiążące GATA 4; **Gig-2**, ang. *growth inhibitory gene 2*, gen hamujący wzrost 2; **HOXA9**, ang. *homeobox A9*, białko homeobox A9; **IL-1β**, ang. *interleukin-1 beta*, interleukina 1 beta; **IL-6**, ang. *interleukin-6*, interleukina 6; **ITGB3**, ang. *integrin beta 3*, integryna beta 3; **JUN**, ang. *Jun proto-oncogene*, protoonkogen Jun / czynnik transkrypcyjny Jun; **KLF13**, ang. *Krüppel-like factor 13*, czynnik podobny do Krüppela 13; **LKB1/AMPK**, ang. *liver kinase B1 / AMP-activated protein kinase*, kinaza wątrobową B1 / kinaza białkowa aktywowana AMP; **MAPK**, ang. *mitogen-activated protein kinase*, kinaza białkowa aktywowana mitogenami; **MCP-1**, ang. *monocyte chemoattractant protein-1*, białko chemotaktyczne monocytów 1; **MCU**, ang. *mitochondrial calcium uniporter*, mitochondrialny uniporter wapniowy; **MMPs**, ang. *matrix metalloproteinases*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej; **mt-COX1**, ang. *mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1*, mitochondrialna podjednostka 1 oksydazy cytochromu c; **NF-κB**, ang. *nuclear factor kappa B*, jądrowy czynnik κB; **Notch1**, ang. *Notch receptor 1*, receptor Notch 1; **PI3K**, ang. *phosphoinositide 3-kinase*, kinaza 3-fosfoinozytydowa; **PI3K/AKT**, ang. *phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B*, kinaza 3-fosfoinozytydowa / kinaza białkowa B; **PKC**, ang. *protein kinase C*, kinaza białkowa C; **PTEN**, ang. *phosphatase and tensin homolog*, homolog fosfatazy i tensyny; **ROS**, ang. *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu; **SGK**, ang. *serum/glucocorticoid-regulated kinase*, kinaza regulowana przez surowicę i glikokortykoidy; **SMAD3**, ang. *SMAD family member 3*, białko z rodziny SMAD 3; **TGF-β1**, ang. *transforming growth factor beta 1*, transformujący czynnik wzrostu beta 1; **TGF-β2**, ang. *transforming growth factor beta 2*, transformujący czynnik wzrostu beta 2; **TLR4**, ang. *Toll-like receptor 4*, receptor Toll-podobny 4; **TNF-α**, ang. *tumor necrosis factor alpha*, czynnik martwicy nowotworów alfa; **TRAF3**, ang. *TNF receptor-associated factor 3*, czynnik 3 związany z receptorem TNF; **VEGF-A**, ang. *vascular endothelial growth factor A*, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu A.

6.4.2. Znaczenie miRNA jako ogniwa łączącego T2DM, ACS oraz przebudowę lewej komory serca

Krążące miRNA rozpatrywane są jako cząsteczki integrujące trzy wzajemnie powiązane poziomy patofizjologiczne obejmujące: (i) ostre uszkodzenie I/R w przebiegu ACS, (ii) przewlekłe zaburzenia metaboliczne związane z T2DM oraz (iii) następczą LVR. Takie ujęcie pozwala uporządkować zarówno ich znaczenie biologiczne, jak i potencjalną wartość kliniczną. Krążące miRNA mogą odzwierciedlać stopień uszkodzenia

kardiomiocytów oraz aktywność procesów naprawczych po zawale i jednocześnie pełnić funkcję regulatorów posttranskrypcyjnych, modulujących szlaki odpowiedzialne za odpowiedź na: hipoksję, stres oksydacyjny, zapalenie, apoptozę, włóknienie oraz przerost kardiomiocytów (**Rycina 2**) [22,23,39].

Cząsteczki miRNA specyficzne dla mięśnia sercowego (myo-miRNA) w ostrej fazie ACS

W ostrej fazie ACS szczególne znaczenie mają cząsteczki miRNA związane z funkcją i integralnością kardiomiocytów. Do tej grupy (ang. *myocardial-miRNA*, *myo-miRNA*) należą przede wszystkim miR-1 oraz miR-133a, które uczestniczą w regulacji struktury mięśnia sercowego, homeostazy wapniowej, stabilności elektrycznej oraz kurczliwości miokardium [40,41]. Ich zwiększone stężenie w krążeniu po zawale może być interpretowane jako następstwo uwalniania z uszkodzonych lub martwiczych kardiomiocytów. Jednocześnie cząsteczki te są związane z aktywacją szlaków uczestniczących w odpowiedzi adaptacyjnej oraz przebudowie pozawałowej. Z tego względu miR-1 i miR-133a nie powinny być traktowane wyłącznie jako bierne markery cytolizy, lecz również jako cząsteczki odzwierciedlające dynamikę późniejszej przebudowy lewej komory [42,43].

Wpływ T2DM na mikrośrodowisko miokardium i pamięć metaboliczną

Na ostre uszkodzenie niedokrwienne nakłada się wpływ T2DM, która już przed wystąpieniem incydentu wieńcowego może modyfikować stan biologiczny miokardium i naczyń. Przewlekła hiperglikemia, insulinooporność oraz towarzyszący im stan zapalny niskiego stopnia sprzyjają dysfunkcji śródbłonna, zaburzeniom mikrokrażenia wieńcowego, zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu oraz aktywacji fibroblastów. W takim środowisku odpowiedź serca na niedokrwienie nie rozwija się od neutralnego punktu wyjścia, lecz na podłożu wcześniejszego przeprogramowania metabolicznego i molekularnego. Jednym z istotnych elementów tego procesu jest dysregulacja miRNA zaangażowanych w mechanizmy cytoprotekcyjne, zapalne, profibrotyczne i proapoptotyczne [22,44–46]. Istotnym elementem tej zależności jest również zjawisko pamięci metabolicznej. Dane eksperymentalne sugerują, że następstwa wcześniejszej ekspozycji na hiperglikemię mogą utrzymywać się w tkankach mimo późniejszej poprawy kontroli glikemii [47,48]. Jednym z potencjalnych mechanizmów podtrzymujących ten efekt są utrwalone zmiany ekspresji

miRNA. W konsekwencji miokardium pacjenta z T2DM może już przed wystąpieniem ACS wykazywać cechy fenotypu prozapalnego, profibrotycznego i proapoptotycznego. Incydent niedokrwienny nakłada się więc na istniejące wcześniej zaburzenia molekularne, co może zwiększać podatność na dysfunkcję lewej komory oraz progresję do niewydolności serca.

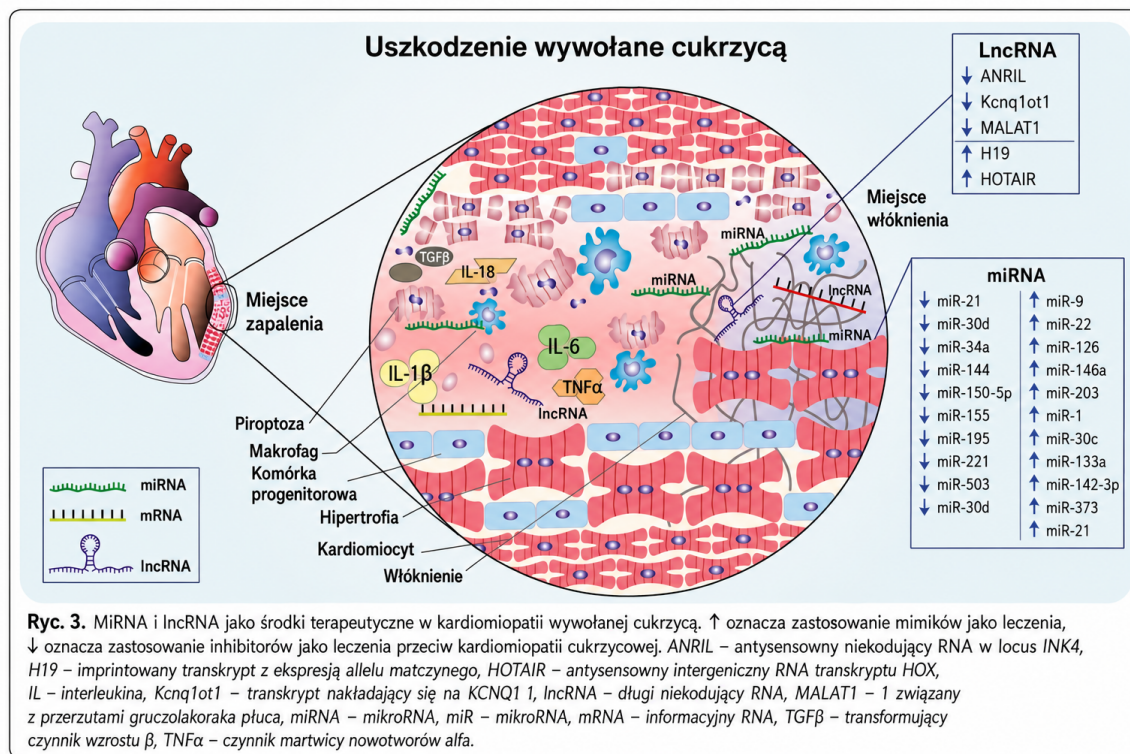
Stres oksydacyjny i kaskada cytokinowa jako wspólny mianownik T2DM, ACS oraz LVR.

Wspólnym mianownikiem T2DM, ACS i przebudowy lewej komory są zatem szlaki stresu oksydacyjnego oraz odpowiedzi immunologiczno-zapalnej. W warunkach przewlekłej hiperglikemii dochodzi do nadmiernego wytwarzania reaktywnych form tlenu i aktywacji jądrowy czynnik κB (ang. *nuclear factor kappa B*, *NF- κB*), co nasila ekspresję cytokin prozapalnych, takich jak interleukina 1 beta (ang. *interleukin-1 beta*, IL-1 β), interleukina 6 (ang. *Interleukin-6*, IL-6) i czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. *tumor necrosis factor alpha*, *TNF- α*). Następstwem tych zmian jest uszkodzenie śródbłonna, upośledzenie perfuzji w mikrokrażeniu wieńcowym oraz zwiększona aktywacja fibroblastów i odkładanie komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej. Po wystąpieniu ACS wcześniej, obecne zaburzenia metaboliczne i zapalne mogą wzmacniać odpowiedź naprawczą, przesuwając ją w kierunku nasilonego włóknienia i niekorzystnej przebudowy lewej komory [44,49,50].

Znaczenie biomarkerowe i kliniczne.

Istotną wartość badawczą i kliniczną stanowi zatem nie tylko identyfikacja fluktuacji profilu ekspresji specyficznych cząsteczek miRNA w następstwie ACS, lecz także weryfikacja ich korelacji ze współwystępowaniem T2DM oraz stopniem zaawansowania dysfunkcji lewej komory serca. Ocena profilu krążących miRNA wykazuje potencjał diagnostyczny przewyższający klasyczne biomarkery martwicy miokardium, ponieważ umożliwia nieinwazyjne monitorowanie dynamiki swoistych szlaków sygnałowych oraz odzwierciedla molekularną heterogeniczność pacjentów w okresie pozawałowym [23,38,46]. W tym ujęciu miRNA stanowią integratywny pomost mechanistyczny i biomarkerowy, łączący przewlekłe obciążenie metaboliczne oraz ostre uszkodzenie niedokrwienne z kaskadą procesów determinujących niekorzystny remodeling strukturalny lewej komory. Syntetyczne ujęcie zależności strukturalno-funkcjonalnych przedstawia **Rycina 3**, ilustrująca bezpośredni udział niekodujących RNA: miRNA oraz długich niekodujących RNA ang. long non-coding

RNA, lncRNA) w kaskadzie patomechanizmów uszkodzenia mięśnia sercowego indukowanego przez T2DM. Przedstawiony model molekularny dowodzi, że zarówno kardiomiopatia cukrzycowa, jak i następca, pozawałowa przebudowa (remodeling) lewej komory serca nie stanowią odizolowanej konsekwencji aktywacji pojedynczego szlaku sygnałowego. Są one efektem synergistycznej komplementarności procesów proimmunologicznych, stresu oksydacyjnego, a także szlaków profibrotycznych, proapoptotycznych i hipertroficzych [23]. Z klinicznego punktu widzenia oznacza to, że u pacjentów z ACS współistniejąca T2DM istotnie modyfikuje przebieg choroby i pogarsza rokowanie pacjentów. Wynika to z uprzedniego uwarunkowania mikrośrodowiska molekularnego, które predysponuje do gwałtowniejszej odpowiedzi zapalno-naprawczej oraz nasilonej adaptacji strukturalnej lewej komory serca w następstwie incydentu niedokrwienne.



Rycina 3. Potencjalna rola miRNA i lncRNA w mechanizmach uszkodzenia mięśnia sercowego spowodowanego T2DM. Schemat przedstawia udział niekodujących RNA w regulacji procesów istotnych dla kardiomiopatii cukrzycowej, takich jak zapalenie, włóknienie, piroptoza, przerost kardiomiocytów oraz dysfunkcja mięśnia sercowego. Strzałki przy nazwach miRNA i lncRNA oznaczają proponowany kierunek potencjalnej interwencji terapeutycznej: zastosowanie mimików lub inhibitorów, a nie wyłącznie kierunek zmiany ekspresji w chorobie. Zmodyfikowano na podstawie Jakubik i wsp. [22].

Zastosowane skróty: **ANRIL**, ang. *antisense non-coding RNA in the INK4 locus*, antysensowny niekodujący RNA w locus INK4; **H19**, ang. *H19 imprinted maternally expressed transcript*, imprintowany transkrypt H19 z ekspresją allelu matczynego; **HOTAIR**, ang. *HOX transcript antisense RNA*, antysensowny RNA transkryptu HOX; **IL-1 β** , ang. *interleukin-1 beta*, interleukina 1 beta; **IL-6**, ang. *interleukin-6*, interleukina 6; **IL-18**, ang. *interleukin-18*, interleukina 18; **Kcnq1ot1**, ang. *KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1*, antysensowny transkrypt 1 przeciwległej nici KCNQ1; **lncRNA**, ang. *long non-coding RNA*, długi niekodujący RNA; **MALAT1**, ang. *metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1*, transkrypt 1 związany z przerzutami gruczolakoraka płuca; **miR**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **miRNA**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **mRNA**, ang. *messenger RNA*, informacyjny RNA / matrycowy RNA; **TGF β** / **TGF- β** , ang. *transforming growth factor beta*, transformujący czynnik wzrostu beta; **TNF α** , ang. *tumor necrosis factor alpha*, czynnik martwicy nowotworów alfa.

6.5. Analiza luk badawczych i perspektywy poznawcze.

Mimo istotnego postępu w optymalizacji protokołów terapeutycznych w ACS, precyzyjna predykcja dynamiki niekorzystnego LVR oraz wczesna identyfikacja pacjentów zagrożonych progresją do niewydolności serca pozostają jednymi z największych wyzwań współczesnej kardiologii. Aktualnie stosowane parametry diagnostyczne, takie jak LVEF, stężenie troponin sercowych, NT-proBNP posiadają ugruntowaną wartość kliniczną, jednak ich zdolność do odzwierciedlenia heterogeniczności procesów patofizjologicznych na poziomie molekularnym jest ograniczona. Dotyczy to w szczególności populacji chorych, u których ostateczny fenotyp kliniczny jest wypadkową ostrego incydentu niedokrwienno-reperfuzyjnego oraz przewlekłych zaburzeń metabolicznych, takich jak T2DM.

W tym kontekście identyfikuje się cztery kluczowe obszary wymagające pogłębionej eksploracji naukowej:

6.5.1. Deficyt prospektywnych badań nad interakcją miRNA-T2DM w fazie pozawałowej.

Obecny stan wiedzy na temat krążących miRNA u pacjentów z ACS charakteryzuje się istotną fragmentacją. Brakuje wieloośrodkowych badań klinicznych, które w sposób zintegrowany analizowałyby profil ekspresji c-miRNA przy jednoczesnym uwzględnieniu statusu metabolicznego pacjenta z T2DM oraz parametrów strukturalno-czynnościowych miokardium. Większość dostępnych doniesień opiera się na modelach *in vitro* lub kohortach o małej liczebności, co uniemożliwia pełną walidację miRNA jako swoistych biosensorów

odzwierciedlających interakcję między zaburzeniami glikemii a rozległością uszkodzenia mięśnia sercowego.

6.5.2. Niewyjaśnione mechanizmy epigenetycznej modulacji przez inhibitory SGLT2.

Wprowadzenie inhibitorów SGLT2 do standardów leczenia niewydolności serca i ACS stanowi przełom terapeutyczny, jednak molekularne podłoże ich kardioprotekcyjnego działania pozostaje nie w pełni sformułowane. Istnieje krytyczna luka poznawcza dotycząca wpływu flozyn na potranskrypcyjną regulację ekspresji genów za pośrednictwem miRNA. Nie ustalono dotychczas, czy obserwowana poprawa parametrów hemodynamicznych i zahamowanie remodelingu wynikają z modyfikacji profili miRNA zaangażowanych w kaskady hipoksji, włóknienia, odpowiedzi zapalnej oraz homeostazy redoks.

6.5.3. Brak zintegrowanych algorytmów wielomarkerowych.

Pojedyncze biomarkery, ze względu na złożoność molekularną ACS, wykazują ograniczoną czułość i swoistość w przewidywaniu odległych następstw klinicznych. Istnieje paląca potrzeba opracowania i walidacji paneli wielomarkerowych, które integrowałyby klasyczne wskaźniki laboratoryjne (np. NT-proBNP, TnI, czy eGFR) z innowacyjnymi markerami molekularnymi (miRNA). Synergistyczne podejście do diagnostyki mogłoby pozwolić na stworzenie precyzyjnych modeli stratyfikacji ryzyka, uwzględniających zarówno stopień dysfunkcji narządowej, jak i aktywność wewnątrzkomórkowych szlaków patogennych.

6.5.4. Konieczność odróżnienia biomarkerów towarzyszących od mediatorów patofizjologicznych.

Współczesna nauka stoi przed wyzwaniem dystynkcji między cząsteczkami miRNA stanowiącymi jedynie pasywny epifenomen martwicy kardiomiocytów a cząsteczkami pełniącymi rolę aktywnych mediatorów procesów naprawczych lub prodestrukcyjnych. Niezbędne są badania translacyjne, łączące zaawansowane analizy bioinformatyczne z weryfikacją kliniczną, które pozwolą na zdefiniowanie spójnych sygnatur molekularnych. Takie sygnatury mogłyby służyć nie tylko celom diagnostycznym, ale również wskazywać

na nowe punkty uchwytu dla terapii celowanej u pacjentów z kardiomiopatią cukrzycową po incydencie wieńcowym.

6.6 Uzasadnienie wyboru kierunku badawczego i tematyki pracy

Mając na uwadze zidentyfikowane luki badawcze, w przedstawionej rozprawie podjęto próbę integracji analiz bioinformatycznych (*in silico*) z walidacją kliniczną. Rozprawa doktorska została zaprojektowana w paradygmacie badań translacyjnych, integrujących zaawansowaną analizę bioinformatyczną z ilościową oceną profilu krążących miRNA w dobrze scharakteryzowanej kohorcie pacjentów po ACS. Implementacja materiału biologicznego zdeponowanego w ramach wieloośrodkowego badania klinicznego EMMY, umożliwiła retrospektywną ocenę próbek osocza, zabezpieczonych w dwóch kluczowych punktach czasowych obejmujących ostrą fazę incydu niedokrwiennego oraz pobranie po 26 tygodniach standaryzowanej farmakoterapii z zastosowaniem empagliflozyny. Taki układ metodologiczny pozwala na jednoczesną weryfikację wyjściowej heterogeniczności molekularnej pacjentów oraz długofalową ocenę dynamiki zmienności epigenetycznych zachodzących w okresie remodelingu pozawałowego. Uzasadnienie wyboru tematyki badawczej opiera się na trzech komplementarnych przesłankach patofizjologicznych i klinicznych.

Po pierwsze, ACS pozostaje incydem sercowo-naczyniowym obarczonym wysokim ryzykiem niekorzystnej, maladaptacyjnej przebudowy strukturalnej lewej komory serca. Wartość LVEF $\leq 40\%$ stanowi ugruntowany w kryteriach klinicznych indyktor populacji o szczególnie niekorzystnym rokowaniu i wysokim indeksie ryzyka sercowego.

Po drugie, współwystępowanie T2DM istotnie implikuje gorsze rokowanie u pacjentów po ACS. Dzieje się tak poprzez aktywację alternatywnych mechanizmów metabolicznych, uwarunkowanych przewlekłym odczynem prozapalnym, dysfunkcją śródbłonna naczyń oraz nasilonym stresem oksydacyjnym. Czynniki te determinują przebieg procesów naprawczych, upośledzają gojenie miokardium i potęgują progresję dysfunkcji skurczowo-rozkurczowej.

Po trzecie, SGLT2i, w tym empagliflozyna, wykazują udowodnione w badaniach klinicznych działanie kardioprotekcyjne. Pomimo dobrze udokumentowanych efektów klinicznych, mechanizmy molekularne, leżące u podstaw ich protekcyjnego wpływu na

miokardium w bezpośrednim okresie po ACS, nie zostały dotychczas w pełni poznane i wymagają dalszej eksploracji.

W ramy tak zdefiniowanego problemu badawczego, idealnie wpisują się cząsteczki miRNA. Stanowią one obiecującą klasę biomarkerów nowej generacji, łączących wysoką czułość diagnostyczną z bezpośrednią funkcją regulatorową (efektorową). Profilowanie krążących miRNA pozwala nie tylko na identyfikację specyficznych fenotypów klinicznych, ale również na odzwierciedlenie stopnia aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za remodeling serca. W tym aspekcie, szczególny punkt ciężkości przypada cząsteczkom zaangażowanym w regulację hipoksji, kaskady zapalnej, profibrotycznej, stresu oksydacyjnego, apoptozy, angiogenezy oraz bezpośredniego uszkodzenia kardiomiocytów, jako że procesy te stanowią rdzeń patomechanizmu niewydolności serca po ACS.

Równolegle, dynamiczny rozwój transkryptomiki ncRNA zrewolucjonizował dotychczasowy paradygmat rozumienia powiązań epigenetycznych w patologii układu krążenia. Coraz większe znaczenie w kardiologii molekularnej przypisuje się całemu spektrum niekodujących transkryptów, obejmującym oprócz miRNA, także ncRNA oraz circRNA [40,144,145]. Cząsteczki te, choć pozbawione potencjału translacyjnego do sekwencji aminokwasowych białek, pełnią kluczowe funkcje regulatorowe na poziomie potranskrypcyjnym, epigenetycznym i translacyjnym. Poprzez te mechanizmy modulują one odpowiedź komórkową kardiomiocytów, komórek śródbłónka, fibroblastów oraz komórek immunokompetentnych zaangażowanych w homeostazę tkanki sercowej [41,145,146].

Z uwagi na relatywnie wysoką stabilność w krążeniu obwodowym, odporność na degradację enzymatyczną oraz mierzalność w osoczu i surowicy, ncRNA są obecnie intensywnie ewaluowane jako potencjalne biomarkery o charakterze diagnostyczno-prognostycznym w patologiach układu sercowo-naczyniowego [39,144,147].

Pomimo dynamicznego przyrostu doniesień o charakterze ściśle mechanistycznym (*in vitro* oraz na modelach zwierzęcych), dowody kliniczne opisujące profile krążących miRNA u pacjentów w okresie po ACS, w szczególności w kontekście komorbidności T2DM, zaawansowania dysfunkcji skurczowej lewej komory serca oraz interwencji farmakologicznej z użyciem empagliflozyny, pozostają wysoce fragmentaryczne. Okres bezpośrednio następujący po ostrym incydencie wieńcowym definiuje krytyczne pod

względem patofizjologicznym „okno biologiczne”. Czas ten charakteryzuje się gwałtowną aktywacją odpowiedzi immunologicznej, nasileniem stresu oksydacyjnego, inicjacją procesów naprawczo-bliznowatych, włóknienia i angiogenezy, determinujących ostateczną geometrię lewej komory serca. Identyfikacja krążących markerów molekularnych odzwierciedlających dynamikę tych procesów stwarza unikalną szansę na optymalizację stratyfikacji ryzyka oraz pogłębienie wiedzy na temat molekularnego podłoża pozawałowej niewydolności serca.

Materiał biologiczny, zebrany podczas realizacji wieloośrodkowego badania klinicznego EMMY trial, zapewnia optymalną platformę metodologiczną do eksploracji tych zależności w homogenicznej, dokładnie fenotypowanej populacji pacjentów po ACS. W przedstawionym badaniu, sekwencyjna analiza próbek osocza zabezpieczonych w dwóch punktach czasowych pozwoliła na weryfikację, czy profile ekspresji wyselekcjonowanych krążących miRNA wykazują dyferencjację w zależności od statusu metabolicznego (obecność T2DM) oraz czy korelują ze stopniem uszkodzenia aparatu kurczliwego lewej komory serca, odzwierciedlonym wartością LVEF. Dodatkowo, ocena zmienności ekspresji miRNA pomiędzy punktem wyjściowym (*baseline*) a 26 tygodniem obserwacji umożliwia deskrypcję krótko- i średnioterminowej dynamiki tych cząsteczek w kohorcie chorych objętych terapią empagliflozyną, przy jednoczesnym zachowaniu ostrożności metodologicznej i nie formułowaniu apriorycznych wniosków o charakterze przyczynowo-skutkowym w odniesieniu do bezpośredniego mechanizmu działania leku.

Przedstawiona rozprawa doktorska, koncentruje się zatem wokół weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, iż specyficzne transkrypty krążących miRNA posiadają zdolność dyskryminacji pacjentów po ACS w zależności od współistnienia T2DM oraz zaawansowania dysfunkcji lewej komory serca. Co więcej, ewaluacji poddano wartość predykcyjną wielowymiarowych modeli prognostycznych, integrujących sygnatury miRNA z klasycznymi, ugruntowanymi w praktyce klinicznej parametrami laboratoryjnymi i funkcjonalnymi, takimi jak eGFR oraz NT-proBNP. Podejście to wpisuje się w nowoczesne standardy medycyny precyzyjnej (personalizowanej), w której ocena profilu ryzyka chorego ewoluuje z analizy pojedynczych zmiennych w kierunku holistycznej integracji danych klinicznych, biofizycznych oraz wielkoskalowych danych molekularnych.

7. Założenia i cel pracy

Głównym celem przedstawionej rozprawy doktorskiej była ewaluacja potencjału biomarkerowego wyselekcjonowanych krążących miRNA w kontekście determinacji statusu metabolicznego (zdefiniowanego obecnością T2DM), zaawansowania remodelingu lewej komory serca oraz ACS. Analizy te osadzono w paradygmacie patofizjologicznym szlaku SGLT2 oraz w kontekście klinicznym 26-tygodniowej interwencji terapeutycznej z zastosowaniem empagliflozyny.

Projekt badawczy zrealizowano w formule translacyjnego badania biomarkerowego, zintegrowanego z wieloośrodkowym badaniem klinicznym EMMY. Materiał biologiczny stanowiły próbki osocza zabezpieczone od pacjentów po ACS w dwóch sekwencyjnych punktach czasowych: w punkcie wyjściowym (*baseline*) oraz po 26 tygodniach standaryzowanej farmakoterapii empagliflozyną. Strategia analityczna obejmowała:

- ilościową ocenę profilu ekspresji docelowych cząsteczek miRNA z wykorzystaniem metody qRT-PCR;
- komparatywną analizę międzygrupową pacjentów w zależności od statusu glikemicznego T2DM(+) vs T2DM(-);
- ocenę korelacji poziomów ekspresji miRNA z dysfunkcją skurczową lewej komory serca (definiowaną kryterium odcięcia LVEF $\leq 40\%$);
- matematyczno-statystyczną weryfikację wartości predykcyjnej pojedynczych transkryptów miRNA oraz wieloskładnikowych paneli wielomarkerowych.

W strukturze celów szczegółowych szczególny rolę przypisano weryfikacji:

- zdolności dyskryminacyjnej miR-210-5p oraz miR-195-5p w odniesieniu do współwystępowania T2DM u pacjentów w okresie poincydentowym;
- właściwości miR-210-5p i miR-21-5p jako molekularnych indykatorów odzwierciedlających czasową dynamikę kaskad patofizjologicznych w 26-tygodniowej obserwacji pozawałowej;
- efektywności diagnostycznej miR-1-5p w ujęciu monomarkerowym oraz w modelach skojarzonych z klasycznymi parametrami;

- laboratoryjno-funkcjonalnymi (eGFR i NT-proBNP) - w optymalizacji identyfikacji chorych z istotnie obniżoną frakcją wyrzutową (LVEF $\leq 40\%$).

Zastosowana analiza bioinformatyczna nie stanowiła autonomicznej osi badawczej, lecz pełniła funkcję integralnego narzędzia metodologicznego służącego biologicznej racjonalizacji selekcji kandydackich miRNA oraz interpretacji ich domniemanego udziału w sieciach regulacyjnych kluczowych dla remodelingu miokardium (takich jak hipoksja, apoptoza, procesy profibrotyczne, stres oksydacyjny, odczyn zapalny oraz neoangiogeneza). Analogicznie, komponenty takie jak T2DM, sygnalizacja SGLT2 oraz farmakoterapia empagliflozyną zostały potraktowane jako integralny kontekst metaboliczno-terapeutyczny dla matrycy ekspresyjnej miRNA u pacjentów po ACS, nie stanowiąc niezależnych, równorzędnych przedmiotów przedłożonej dysertacji.

7.1 Cele szczegółowe

1. **Identyfikacja i selekcja bioinformatyczna** kandydackich cząsteczek miRNA kluczowych dla patomechanizmów pozawałowej przebudowy strukturalnej miokardium (obejmujących hipoksję, apoptozę, procesy profibrotyczne, stres oksydacyjny, odczyn zapalny, neoangiogenezę oraz bezpośrednie uszkodzenie kardiomiocytów) na podstawie kryteriów biologicznych oraz wielkoskalowych analiz wieloaspektowych baz danych (*target prediction*).
2. **Ilościowa ocena profilu ekspresji** wyselekcjonowanych krążących miRNA w osoczu pacjentów po ACS w punkcie wyjściowym (*baseline*) oraz po upływie 26 tygodni standaryzowanej farmakoterapii z zastosowaniem inhibitora SGLT2 (empagliflozyny).
3. **Komparatywna analiza międzygrupowa** sygnatury ekspresyjnej krążących miRNA u pacjentów w okresie poincydentowym, w zależności od statusu metabolicznego (zróznicowanie podgrup: T2DM(+) versus T2DM(-)).
4. **Ocena czasowej dynamiki zmian** ekspresji docelowych miRNA pomiędzy ostrą fazą ACS a 26. tygodniem obserwacji klinicznej, przeprowadzone zarówno w ujęciu całościowym całej kohorty badawczej, jak i w subanalizach uwzględniających obecność lub brak współwystępującej cukrzycy typu 2.

5. **Analiza korelacji** poziomu ekspresji wybranych transkryptów miRNA, ze szczególnym uwzględnieniem miR-1-5p, ze stopniem zaawansowania dysfunkcji skurczowej lewej komory serca, definiowanej parametrem echokardiograficznym $LVEF \leq 40\%$.
6. **Matematyczno-statystyczna ewaluacja wartości diagnostyczno-predykcyjnej** wyselekcjonowanych miRNA przy użyciu krzywych ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*) oraz wskaźnika AUC (ang. *Area Under the ROC Curve*), wraz z weryfikacją hipotezy, czy wielomarkerowy model prognostyczny (integrujący sygnaturę miR-1-5p z klasycznymi parametrami laboratoryjno-funkcjonalnymi: eGFR i NT-proBNP) optymalizuje czułość i swoistość identyfikacji chorych z $LVEF \leq 40\%$.
7. **Patofizjologiczna interpretacja zmian profilu ekspresyjnego miRNA** obserwowanych w interwale 26 tygodni, w kontekście potencjalnych mechanizmów kardioprotekcyjnego działania empagliflozyny, przy jednoczesnym uwzględnieniu naturalnego przebiegu procesów naprawczo-bliznowatych w mięśniu sercowym.

7.2 Schemat przebiegu badania

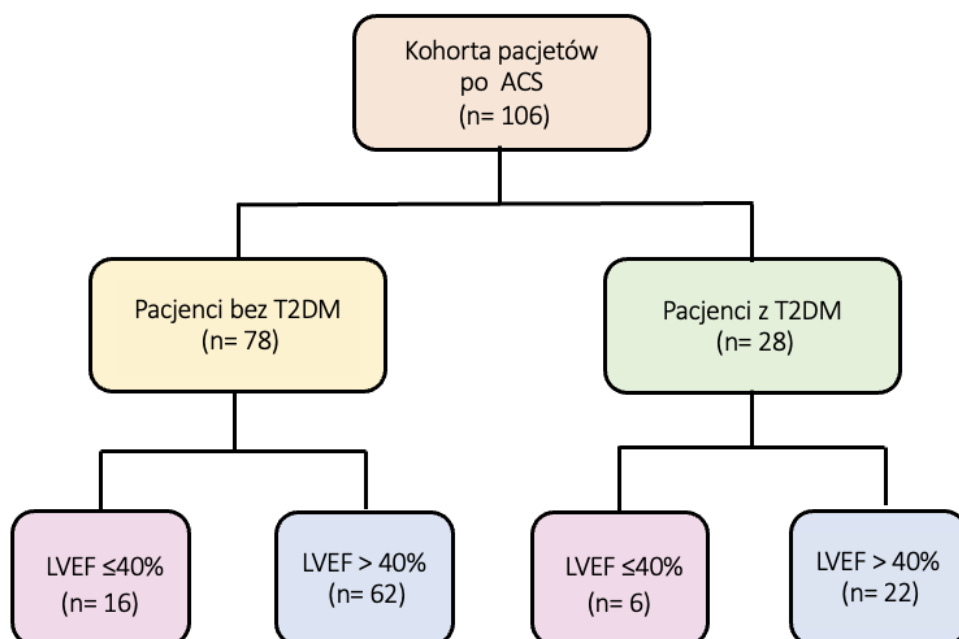
7.2.1 Schemat i struktura metodologiczna badania.

Materiał biologiczny (osocze krwi obwodowej) wykorzystany w przedstawionej rozprawie doktorskiej pochodził z bazy biobanku wieloośrodkowego badania klinicznego **EMMY** (*Empagliflozin in Acute Myocardial Infarction*, identyfikator w rejestrze ClinicalTrials.gov: **NCT03087773**). Projekt EMMY został zaprojektowany jako prospektywne, randomizowane (w układzie 1:1), kontrolowane placebo badanie z podwójnie ślepej próbą, inicjowane przez badaczy (*investigator-initiated trial*). Jego nadrzędnym celem była ewaluacja wpływu selektywnego inhibitora SGLT2 empagliflozyny w dawce 10 mg/dobę na parametry przebudowy strukturalnej serca (ang. *end-diastolic volume*, objętość końcoworozkurczowa, EDV; ang. *end-systolic volume*, objętość końcowoskurczowa, ESV), wskaźniki hemodynamiczne LVEF oraz profil neurohormonalny NT-proBNP u pacjentów w okresie pozawałowym. Do podbadania biomarkerowego włączono

chorych z potwierdzonym ostrym zawałem mięśnia sercowego (zgodnie z kryteriami kwalifikacji opisanymi szczegółowo w rozdziale 3.4). Próbki materiału biologicznego analizowano w dwóch punktach czasowych:

- I. w fazie ACS (punkt wyjściowy - ang. *baseline*),
- II. po zakończeniu 26-tygodniowego cyklu terapeutycznego.

Zrekrutowaną kohortę poddano wielostopniowej stratyfikacji fenotypowej (**Rycina 4**).



Rycina 4. Schemat stratyfikacji fenotypowej kohorty pacjentów po ACS (n=106) wg statusu metabolicznego (T2DM) oraz stopnia dysfunkcji skurczowej lewej komory serca (LVEF).

Zastosowane skróty: **ACS**, ang. *acute coronary syndrome*, ostry zespół wieńcowy; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory serca; **T2DM**, ang. *type 2 diabetes mellitus*, cukrzyca typu 2.

1. **Pierwszy stopień dychotomizacji** oparto na statusie metabolicznym, wyodrębniając podgrupę pacjentów bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej - T2DM(-) oraz podgrupę ze współistniejącą cukrzycą typu 2 - T2DM(+).
2. **Drugi stopień stratyfikacji** uwzględniał parametry czynnościowe aparatu kurbliwego lewej komory serca. W obrębie obu komponentów metabolicznych

dokonano podziału na podstawie echokardiograficznego kryterium odcięcia frakcji wyrzutowej: pacjentów z LVEF $\leq 40\%$ oraz pacjentów z LVEF $>40\%$. Zastosowana matryca podziału umożliwiła precyzyjną ocenę interakcji pomiędzy profilem ekspresyjnym krążących miRNA a komorbidnością T2DM i stopniem zaawansowania dysfunkcji pozawałowej.

Izolowany z osocza profil ekspresji wyselekcjonowanych transkryptów miRNA poddano walidacji ilościowej metodą qRT-PCR. Równolegle zaimplementowano procedury bioinformatyczne ukierunkowane na predykcję genów docelowych (ang. *target genes prediction*) dla analizowanych miRNA oraz analizę ontologiczną pod kątem wzbogacenia szlaków sygnałowych (ang. *pathway enrichment analysis*) zaangażowanych w etiopatogenezę T2DM, uszkodzenie miokardium oraz remodeling układu sercowo-naczyniowego.

W końcowej fazie projektu przeprowadzono zintegrowaną analizę biostatystyczną i kliniczną. Ewaluacji poddano wielowymiarowe korelacje zachodzące pomiędzy poziomami ekspresji poszczególnych miRNA, zmiennymi demograficzno-klinicznymi oraz ugruntowanymi markerami laboratoryjnymi o statusie ciągłym, w tym szacowanym współczynnikiem filtracji kłębuszkowej (eGFR) oraz stężeniem NT-proBNP. Algorytm ten pozwolił na identyfikację sygnatur molekularnych ściśle sprzężonych z kluczowymi patomechanizmami determinującymi dynamikę okresu pozawałowego, ze szczególnym uwzględnieniem szlaków hipoksji, apoptozy, procesów profibrotycznych, stresu oksydacyjnego, kaskady zapalnej oraz neoangiogenezy.

7.3 Hipotezy badawcze

1. Istnieje specyficzna dla statusu metabolicznego sygnatura ekspresyjna krążących miRNA u pacjentów po ACS, co objawia się istotnymi statystycznie różnicami w profilu tych cząsteczek pomiędzy chorymi ze współistniejącą cukrzycą typu 2 [T2DM(+)], a chorymi bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej [T2DM(-)].
2. Zmienności poziomów krążących miR-210-5p oraz miR-195-5p u pacjentów w okresie pozawałowym są determinowane przede wszystkim fenotypem

metabolicznym (obecnością T2DM) i mogą stanowić molekularne odzwierciedlenie zaburzeń homeostazy glikemicznej.

3. Dynamika zmian ekspresji wyselekcjonowanych miRNA (w szczególności miR-210-5p i miR-21-5p) w interwale czasowym między ostrą fazą ACS a 26 tygodniem obserwacji odzwierciedla przebieg procesów patofizjologicznych związanych z remodelingiem miokardium u pacjentów objętych terapią empagliflozyną.
4. Poziom ekspresji krążącego miR-1-5p w ostrej fazie ACS wykazuje korelację ze stopniem uszkodzenia aparatu kurczliwego serca i stanowi niezależny molekularny indykator ciężkości zawału mięśnia sercowego, definiowanej kryterium echokardiograficznym LVEF $\leq 40\%$.
5. Wielomarkerowy model prognostyczny, integrujący poziom ekspresji miR-1-5p z konwencjonalnymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi (szacowanym współczynnikiem filtracji kłębuszkowej - eGFR oraz stężeniem N-końcowego propeptydu natriuretycznego typu B - NT-proBNP), wykazuje istotnie wyższą siłę dyskryminacyjną (wyrażoną wskaźnikiem AUC) w identyfikacji pacjentów z istotną dysfunkcją skurczową lewej komory serca (LVEF $\leq 40\%$) w porównaniu do modeli opartych na pojedynczych parametrach izolowanych.

8. Materiały i metody

8.1. Projekt badania i charakter analizy

Przedstawiona praca miała charakter wtórnego, translacyjnego badania biomarkerowego, osadzonego w strukturze wieloośrodkowego badania klinicznego EMMY (Empagliflozin in Acute Myocardial Infarction; ClinicalTrials.gov: NCT03087773). Badanie macierzyste zaprojektowano jako prospektywną, randomizowaną w układzie 1:1, kontrolowaną placebo próbę kliniczną z podwójnie ślepą próbą, inicjowaną przez badaczy (ang. *investigator-initiated trial*), której pierwszorzędowym celem była ocena wpływu empagliflozyny w dawce 10 mg na dobę na parametry pozawałowej przebudowy

strukturalnej i czynnościowej serca. W odróżnieniu od interwencyjnego charakteru badania macierzystego, niniejsza analiza stanowiła retrospektywną, molekularną ocenę prospektywnie zgromadzonego i zdeponowanego w biobanku materiału biologicznego (osocze krwi obwodowej pobierane na EDTA), nie ingerując w protokół randomizacji ani w schemat farmakoterapii badania źródłowego.

Pod względem metodologicznym analizę zaprojektowano jako badanie obserwacyjne o charakterze eksploracyjnym (hypothesis-generating), realizowane w układzie podłużnym (longitudinalnym) z dwoma sparowanymi punktami pomiarowymi: w ostrej fazie ACS (*punkt wyjściowy, baseline*) oraz po 26 tygodniach standaryzowanej farmakoterapii empagliflozyną. Do końcowej analizy włączono 106 pacjentów po ACS, u których dostępne były kompletne, sparowane próbki osocza z obu punktów czasowych (łącznie 212 próbek). Kohortę poddano wielostopniowej stratyfikacji fenotypowej według statusu metabolicznego (obecność lub brak T2DM) oraz stopnia dysfunkcji skurczowej lewej komory serca, definiowanego echokardiograficznym kryterium odcięcia LVEF $\leq 40\%$ dla cięższego przebiegu ACS. Konstrukcja taka umożliwia równoległe prowadzenie dwóch komplementarnych typów porównań: przekrojowych analiz międzygrupowych (T2DM(+) vs T2DM(-) oraz LVEF $\leq 40\%$ vs LVEF $> 40\%$) oraz wewnątrzosobniczej oceny czasowej dynamiki ekspresji miRNA pomiędzy punktem wyjściowym a 26. tygodniem obserwacji.

Pod względem strukturalnym analiza obejmowała dwie zintegrowane, lecz hierarchicznie podporządkowane warstwy metodologiczne. Warstwa bioinformatyczna (in silico) pełniła rolę pomocniczą i poprzedzającą, służąc biologicznie uzasadnionej selekcji kandydackich cząsteczek miRNA na podstawie przeglądu piśmiennictwa, predykcji genów docelowych (target prediction), analizy wzbogacenia szlaków sygnałowych (pathway enrichment) oraz konstrukcji sieci interakcji miRNA–geny–procesy. Warstwa kliniczno-laboratoryjna stanowiła zasadniczy, walidacyjny komponent pracy i obejmowała ilościowe oznaczenie ekspresji wyselekcjonowanych miRNA metodą qRT-PCR oraz statystyczną ocenę ich wartości diagnostyczno-predykcyjnej z wykorzystaniem krzywych ROC i wskaźnika AUC oraz wieloczynnikowej regresji logistycznej, z integracją danych molekularnych z konwencjonalnymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi (eGFR, NT-proBNP).

Charakter analizy determinował zakres dopuszczalnych wniosków. Wszyscy pacjenci włączeni do niniejszej analizy biomarkerowej otrzymywali empagliflozynę, a podbadanie nie obejmowało bezpośredniego porównania z ramieniem placebo badania macierzystego; z tego względu obserwowanych zmian ekspresji miRNA w czasie nie można interpretować w kategoriach związku przyczynowo-skutkowego z działaniem leku, lecz jako wypadkową naturalnego przebiegu procesów naprawczych w okresie pozawałowym oraz prowadzonej farmakoterapii. Uzyskane zależności miały charakter asocjacyjny i korelacyjny, a nie etiologiczny. W połączeniu z ograniczoną liczebnością kohorty, wielośrodkowym pochodzeniem materiału w warstwie molekularnej oraz wtórnym, eksploracyjnym założeniem projektu, powyższe uwarunkowania definiują niniejszą pracę jako badanie generujące hipotezy, których potwierdzenie wymaga walidacji w większych, niezależnych i wieloetnicznych kohortach oraz w dedykowanych analizach mechanistycznych.

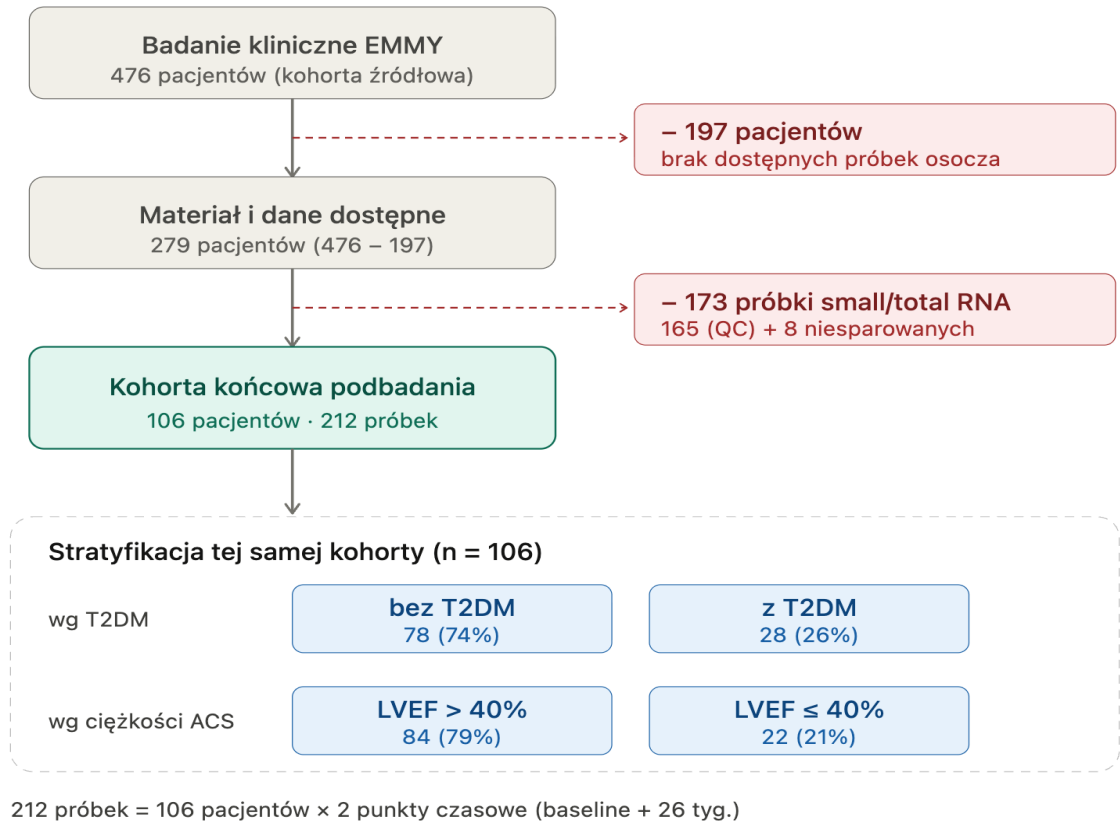
8.2. Zgoda komisji bioetycznej, rejestracja badania i zasady prowadzenia badania

Badanie EMMY uzyskało zgodę właściwych organów regulacyjnych, w tym Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Graz, Austria (Ethikkommission Medizinische Universität Graz, Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz). Numer zgody Komisji Etycznej: EK 29-179 ex 16/17 (EudraCT: 2016-004591-22). Badanie zostało również zarejestrowane w bazie ClinicalTrials.gov pod numerem NCT03087773.

Tytuł zatwierdzonego badania brzmiał: „Wpływ empagliflozyny na funkcje serca i markery niewydolności serca u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego (EMMY-Trial) - badanie fazy III”. Sponsorem badania był Uniwersytet Medyczny w Graz, a badanie było zarządzane i koordynowane przez Interdisciplinary Metabolic Medicine Trials Unit przy Uniwersytecie Medycznym w Graz w Austrii.

Badanie prowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej z 1964 roku wraz z późniejszymi zmianami oraz zgodnie z wytycznymi International Conference on Harmonization for Good Clinical Practice (ICH GCP E6). Wszyscy uczestnicy przed włączeniem do badania wyrazili pisemną świadomą zgodę na udział.

8.3. Populacja badania i liczebność analizowanych podgrup



Rycina 5. Schemat rekrutacji kohorty do podbadania biomarkerowego (badanie EMMY).

Zastosowane skróty: **ACS**, ang. *acute coronary syndrome*, ostry zespół wieńcowy; **EMMY**, ang. *Empagliflozin in Acute Myocardial Infarction trial*; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory; **QC**, ang. *quality control*, kontrola jakości; **small RNA**, ang. *small RNA*, małe RNA; **T2DM**, ang. *type 2 diabetes mellitus*, cukrzyca typu 2; **total RNA**, ang. *total RNA*, całkowite RNA.

Do badania EMMY włączono łącznie **476 pacjentów**. Zaprezentowana analiza biomarkerowa objęła pacjentów, u których dostępne były próbki osocza spełniające kryteria jakościowe oraz kompletne dane umożliwiające analizę w dwóch punktach czasowych. Od 197 pacjentów próbek osocza z badania EMMY nie było dostępnych do analiz molekularnych. Dodatkowo 173 próbki small/total RNA nie spełniły kryteriów kontroli jakości. Po uwzględnieniu dostępności materiału biologicznego, kontroli jakości RNA oraz kompletności danych podłużnych, do obecnej analizy włączono **106 pacjentów** z próbkami pobranymi w punkcie wyjściowym i po 26 tygodniach leczenia. Łącznie przeanalizowano **212 próbek** osocza w układzie podłużnym.

W analizowanej kohorcie T2DM rozpoznano u **28 pacjentów (27%)**, natomiast **78 pacjentów (73%)** nie miało T2DM. Wyjściową dysfunkcję lewej komory serca, definiowaną jako **LVEF $\leq 40\%$** , stwierdzono u **22 pacjentów (21%)**, natomiast **LVEF $>40\%$ u 84 pacjentów (79%)**.

Etap / Podgrupa	Liczebność	Opis
Cała kohorta badania EMMY	476 pacjentów	Pacjenci włączeni do badania źródłowego EMMY
Brak dostępnych próbek osocza	197 pacjentów	Materiał biologiczny niedostępny do analiz molekularnych
Próbki small/total RNA niespełniające QC	173 próbki	Materiał wykluczony po kontroli jakości RNA
Kohorta końcowa podbadania	Populacja badania: 106 pacjentów	Pacjenci z kompletnymi próbkami baseline i po 26 tygodniach leczenia empagliflozyną oraz danymi klinicznymi
ACS bez T2DM	78 pacjentów	73% kohorty końcowej
ACS z T2DM	28 pacjentów	27% kohorty końcowej
LVEF $>40\%$	84 pacjentów	79% kohorty końcowej
LVEF $\leq 40\%$	22 pacjentów	21% kohorty końcowej

Tabela 1. Liczebność kohorty źródłowej oraz liczebność analizowanych podgrup.

Zastosowane skróty: **ACS**, ang. *acute coronary syndrome*, ostry zespół wieńcowy; **EMMY**, ang. *Empagliflozin in Acute Myocardial Infarction trial*; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory; **QC**, ang. *quality control*, kontrola jakości; **small RNA**, ang. *small RNA*, małe RNA; **T2DM**, ang. *type 2 diabetes mellitus*, cukrzyca typu 2; **total RNA**, ang. *total RNA*, całkowite RNA.

8.4. Kryteria włączenia i wyłączenia

Szczegółowe kryteria włączenia i wyłączenia dla badania EMMY zostały opisane w publikacji dotyczącej badania źródłowego. W przedstawionej rozprawie uwzględniono kryteria istotne dla interpretacji podbadania biomarkerowego.

Do badania kwalifikowano pacjentów spełniających następujące kryteria włączenia:

- wiek 18-80 lat;
- pisemna świadoma zgoda na udział w badaniu;
- hospitalizacja z powodu potwierdzonego ostrego zawału mięśnia sercowego;
- cechy istotnej martwicy mięśnia sercowego, w tym aktywność kinazy kreatynowej >800 U/L oraz stężenie troponiny sercowej T lub I ponad dziesięciokrotnie wyższe od górnej granicy normy;
- co najmniej jedno kliniczne kryterium niedokrwienia mięśnia sercowego, takie jak objawy sugerujące niedokrwienie, nowe zmiany niedokrwienne w EKG lub obrazowe cechy nowych regionalnych zaburzeń kurczliwości;
- zachowana funkcja nerek, definiowana jako $eGFR >45$ mL/min/1,73 m²;
- stabilność hemodynamiczna przed rozpoczęciem leczenia, definiowana jako ciśnienie - skurczowe >110 mmHg i rozkurczowe >70 mmHg;
- rozpoczęcie procedur badania w ciągu 72 godzin od incydentu wieńcowego oraz po wykonaniu koronarografii;
- stosowanie skutecznej antykoncepcji przez kobiety w wieku rozrodczym.

Z badania wykluczano pacjentów spełniających następujące kryteria:

- cukrzyca innego typu niż cukrzyca typu 2;
- wywiad kwasicy ketonowej;
- istotna kwasica metaboliczna;
- definiowana jako pH krwi $<7,32$;
- ciężki epizod hipoglikemii w ciągu poprzednich sześciu miesięcy, u pacjentów leczonych insuliną lub pochodnymi sulfonilomocznika;
- nadwrażliwość na leczenie związane ze szlakiem SGLT2;

- niestabilność hemodynamiczna wymagająca dożylnego podawania katecholamin, leków uwrażliwiających na wapń lub inhibitorów fosfodiesterazy;
- aktywne zakażenia, zwłaszcza objawowe zakażenia dróg moczowych lub narządów płciowych;
- aktualne leczenie lub leczenie w ciągu czterech tygodni przed włączeniem terapiami ukierunkowanymi na szlaki związane z SGLT2;
- brak odpowiedniego zabezpieczenia antykoncepcyjnego u kobiet w wieku rozrodczym.

8.5. Ocena kliniczna, laboratoryjna i echokardiograficzna

U wszystkich pacjentów przeprowadzono ocenę kliniczną w momencie przyjęcia do szpitala. Obejmowała ona wywiad medyczny, badanie przedmiotowe, elektrokardiografię, oznaczenia laboratoryjne oraz badania obrazowe. Dokumentowano czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego, w tym nadciśnienie tętnicze, dyslipidemię, T2DM, palenie tytoniu oraz choroby współistniejące. W badaniach laboratoryjnych oznaczano m.in. wysokoczułą troponinę sercową, NT-proBNP, kreatyninę, eGFR, HbA1c, profil lipidowy oraz standardowe parametry biochemiczne. Funkcję nerek oceniano na podstawie szacunkowego współczynnika filtracji kłębuszkowej (eGFR).

Wykorzystując przezklatkowe badanie echokardiograficzne (wykonywane w trakcie hospitalizacji) oceniano LVEF, zgodnie ze standaryzowanymi protokołami echokardiograficznymi. Na potrzeby analizy biomarkerowej pacjentów stratyfikowano według wartości LVEF, przyjmując $LVEF \leq 40\%$ jako próg klinicznie istotnej dysfunkcji skurczowej lewej komory serca i cięższego przebiegu ACS.

8.6. Punkty czasowe pobrania krwi i przygotowanie osocza

Próbki krwi żyłnej obwodowej pobierano w dwóch punktach czasowych: w punkcie wyjściowym, odpowiadającym ostrej fazie ACS, oraz po 26 tygodniach leczenia empagliflozyną. Taki schemat umożliwił ocenę zmian ekspresji miRNA w czasie oraz analizę ich związku ze statusem metabolicznym i funkcją lewej komory serca.

Do analizy RNA i białek wykorzystywano osocze uzyskane z krwi pobranej do próbek zawierających EDTA. Po pobraniu krew poddawano standaryzowanej obróbce

w celu uzyskania osocza. Następnie osocze dzielono na porcje i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia eksperymentów w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. W trakcie procedur laboratoryjnych nie wykonywano cykli zamrażania i rozmrażania, co ograniczało ryzyko degradacji RNA i zmienności przedanalizacyjnej.

Na etapie przygotowania materiału szczególną uwagę zwracano na ograniczenie czynników przedanalizacyjnych, w tym czasu od pobrania do przetworzenia próbki, warunków przechowywania oraz ryzyka hemolizy, ponieważ obecność elementów komórkowych i hemoliza mogą istotnie wpływać na oznaczane poziomy krążących miRNA.

8.7. Izolacja RNA i kontrola jakości próbek

Całkowite RNA, obejmujące frakcję small RNA, izolowano z 400 μL osocza przy użyciu zautomatyzowanego systemu Maxwell® RSC 48 z zastosowaniem zestawu Maxwell Serum/Plasma miRNA Isolation Kit (Promega; nr katalogowy AS1680), zgodnie z instrukcją producenta.

Stężenie RNA oznaczano z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA) oraz testu Qubit RNA High Sensitivity (Invitrogen). Integralność i ogólną jakość RNA oceniano przy użyciu systemu Agilent 2100 Bioanalyzer z odpowiednim zestawem RNA Pico Kit oraz metod fluorymetrycznych.

Kontrola jakości obejmowała ocenę jakości izolatu RNA, stężenia RNA, profilu elektroforetycznego, obecności produktów degradacji, stabilności sygnału w analizie qRT-PCR oraz wartości Ct. Próbkę niespełniające kryteriów jakościowych na etapie izolacji RNA lub amplifikacji qRT-PCR wykluczono z dalszej analizy. Po analizie qRT-PCR wykluczano próbki o nieprawidłowych wartościach Ct, wskazujących na niewystarczającą amplifikację lub niewiarygodny sygnał.

8.8. Oznaczanie ekspresji miRNA metodą qRT-PCR

Poziomy ekspresji wybranych krążących miRNA oznaczano metodą qRT-PCR. Wykorzystano zestawy TaqMan™ miRNA Assay (Applied Biosystems; nr katalogowy A25576), skierowane przeciwko wybranym dojrzałym cząsteczkom miRNA. Reakcje prowadzono przy użyciu systemu CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Procedury odwrotnej transkrypcji i amplifikacji wykonywano zgodnie z protokołem producenta zestawów TaqMan™ miRNA Assay (**Tabela 2**). Wszystkie reakcje wykonywano w trzech powtórzeniach technicznych, a do dalszych analiz wykorzystywano średnie wartości Ct po kontroli poprawności amplifikacji i powtarzalności replikantów.

Analizowane miRNA	Assay ID
hsa-miR-210-5p	478765_mir
hsa-miR-126-5p	477888_mir
hsa-miR-195-5p	477957_mir
hsa-miR-155-5p	477927_mir
hsa-miR-1-5p	478726_mir
hsa-miR-133a-5p	478706_mir
hsa-miR-21-5p	477975_mir

Tabela 2. Zestawy TaqMan™ miRNA Assay wykorzystane w analizie qRT-PCR.

Zastosowane skróty: **assay ID**, ang. *assay identifier*, identyfikator oznaczenia; **hsa**, ang. *Homo sapiens*, człowiek; **miRNA**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **qRT-PCR**, ang. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją.

8.9. Normalizacja ekspresji miRNA

Do normalizacji wyników zastosowano syntetyczne miRNA cel-miR-39, dodawane do każdej próbki jako kontrola typu spike-in na etapie izolacji RNA. Cel-miR-39 pełniło funkcję zewnętrznego normalizatora, umożliwiającego kontrolę zmienności wynikającej z izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji oraz amplifikacji.

Dodatkowo jedną losowo wybraną próbkę osocza wykorzystano jako kalibrator we wszystkich seriach qPCR, co umożliwiło porównywalność wyników między płytkami i seriami pomiarowymi.

Względny poziom ekspresji miRNA obliczano metodą $2^{-\Delta\Delta Ct}$. W pierwszym etapie wyznaczano ΔCt jako różnicę między wartością Ct badanego miRNA a wartością Ct

kontroli zewnętrznej cel-miR-39. Następnie obliczano $\Delta\Delta Ct$ względem próbki kalibracyjnej. Otrzymane wartości $2^{-\Delta\Delta Ct}$ poddawano transformacji $\log_{10}$ przed analizą statystyczną.

8.10. Wybór miRNA i analiza bioinformatyczna

Wybór konkretnych cząsteczek miRNA przeznaczonych do oznaczeń w materiale klinicznym pochodzącym od pacjentów po ACS biorących udział w badaniu EMMY oparto na **trójetapowej procedurze przygotowawczej**, którą przeprowadzono w ramach tej rozprawy doktorskiej przed rozpoczęciem oznaczeń laboratoryjnych.

Procedura obejmowała kolejno:

- I. **przegląd piśmiennictwa**, którego celem było zidentyfikowanie krążących miRNA powiązanych z patofizjologią ACS, T2DM oraz pozawałową przebudową lewej komory serca wraz z ich genami docelowymi (szczegółowe zestawienie w **Tabeli 8 Aneks ; Rycina 6-7**);
- II. **analizę bioinformatyczną i *in silico*** opartą na wynikach przeglądu oraz na ogólnodostępnych bazach danych (m.in. miRTarBase, DIANA-microT, DisGeNET, Gene Ontology), pozwalającą na predykcję genów docelowych analizowanych miRNA i zmapowanie szlaków sygnałowych osi SGLT2-ncRNA opartą na wynikach przeglądu oraz na ogólnodostępnych bazach danych (predykcja genów docelowych za pomocą pakietu multiMiR integrującego m.in. TargetScan, miRanda, DIANA-microT i miRTarBase; listy genów z baz DisGeNET, Gene Ontology oraz T2D database) (**Tabela 4, Rycina 8**);
- III. **selekcję ostatecznego panelu miRNA** do walidacji ilościowej metodą qRT-PCR w próbkach osocza badanej kohorty.

W pierwszym etapie przeprowadzono systematyczny przegląd baz danych PubMed, Scopus oraz Embase w celu mapowania znanych interakcji pomiędzy białkiem SGLT2 (oraz jego farmakologiczną inhibicją) a ncRNA (w tym miRNA i circRNA) w kontekście chorób kardiometabolicznych (**Tabela 8 Aneks**).

8.10.1 Metodyka analizy sieciowej i predykcji in silico

Listy genów pozyskano z trzech źródeł: *DisGeNET* (zawał mięśnia sercowego, ICM, DM), *Gene Ontology* (m.in. stres oksydacyjny, hipoksja, autofagia, stan zapalny, koagulacja, angiogeneza, włóknienie, apoptoza) oraz bazy *T2D database* (miażdżyca, nefropatia, choroby sercowo-naczyniowe). Predykcję genów docelowych przeprowadzono pakietem multiMiR (R), wyszukując 20% najwyżej ocenianych predykcji w 14 bazach i integrując algorytmy predykcyjne (TargetScan, miRanda, PicTar, DIANA-microT, PITA) z bazami zwalidowanymi eksperymentalnie (miRTarBase, TarBase, miRecords). Liczbę genów docelowych agregowano i klasteryzowano autorskim pakietem wizbionet (funkcje col_agrecounter i clusterizer_oneR), stosując algorytm OneR oparty na naturalnych przedziałach Jenksa (podział na 4 klastry; przy zbyt małych klastrach - k-means), a jako najistotniejsze przyjęto miRNA/geny z pierwszego klastra. Sieć interakcji zbudowano w środowisku R i zwizualizowano w programie Cytoscape. Wyniki tej analizy przedstawiono w rozdziale Wyniki (**Tabela 4**).

8.11 Wybór miRNA do walidacji w próbkach pobranych od pacjentów

Zintegrowane wyniki przeglądu piśmiennictwa (**Tabela 8 Aneks**) oraz analizy bioinformatycznej i in silico (**Tabela 4, Ryciny 6-8**) pozwoliły na wytypowanie ostatecznego panelu cząsteczek miRNA przeznaczonych do oznaczeń ilościowych w materiale klinicznym pochodzącym od pacjentów po ACS.

Kandydatów wybierano przy zastosowaniu następujących, jednocześnie spełnianych kryteriów:

- (a) udokumentowane w piśmiennictwie powiązanie z patofizjologią ACS, T2DM oraz pozawałowego remodelingu lewej komory serca;
- (b) wysoka łączność w analizie sieci interakcji miRNA-mRNA z procesami biologicznymi kluczowymi dla mechanizmów uszkodzenia miokardium (hipoksja, apoptoza, włóknienie, stres oksydacyjny, zapalenie, angiogeneza);
- (c) potwierdzona stabilność oraz wykrywalność w materiale osoczym, umożliwiającą rzetelną kwantyfikację metodą qRT-PCR.

Na podstawie powyższych kryteriów do walidacji ilościowej w próbkach osocza pacjentów z kohorty EMMY zakwalifikowano osiem cząsteczek miRNA: **miR-1-5p**, **miR-**

21-5p, miR-34a-5p, miR-126-5p, miR-133a, miR-155-5p, miR-195-5p oraz miR-210-5p. Oznaczenia ekspresji wybranych cząsteczek wykonano metodą qRT-PCR w dwóch zdefiniowanych punktach czasowych - **wyjściowo** (w ostrej fazie ACS) oraz **po 26 tygodniach** leczenia empagliflozyną.

8.12. Analiza statystyczna

8.12.1. Opis danych i porównania między grupami

Rozkład zmiennych ciągłych oceniano za pomocą testów normalności oraz oceny graficznej. Zmienne ciągłe przedstawiano jako średnią z odchyleniem standardowym albo jako medianę z zakresem międzykwartylowym, w zależności od rozkładu danych. Zmienne katégoryczne przedstawiano jako liczebności i odsetki.

Porównania pomiędzy dwiema niezależnymi grupami, w szczególności pacjentami z T2DM i bez T2DM oraz pacjentami z $LVEF \leq 40\%$ i $LVEF > 40\%$, wykonywano za pomocą testu U Manna-Whitneya dla zmiennych ciągłych o rozkładzie nieparametrycznym. Dla zmiennych katégorycznych stosowano test chi-kwadrat, a w przypadku małych liczebności dokładny test Fishera. Wszystkie testy miały charakter dwustronny, a za poziom istotności statystycznej przyjmowano $p < 0,05$.

8.12.2. Analiza zmian ekspresji miRNA w czasie

Zmiany ekspresji miRNA między punktem wyjściowym a 26 tygodniem leczenia empagliflozyną analizowano jako dane zależne. W przypadku zmiennych o rozkładzie nieparametrycznym stosowano test Wilcozona dla par zależnych. Analizy prowadzono w całej kohorcie oraz w podgrupach wyodrębnionych według obecności T2DM.

Wyniki analiz podłużnych interpretowano jako zmiany ekspresji miRNA obserwowane w trakcie 26 tygodni leczenia empagliflozyną w analizowanej kohorcie. Ze względu na charakter obecnej analizy nie formułowano wniosków opartych na bezpośrednim porównaniu empagliflozyny z placebo.

8.12.3. Korekta wielokrotnych porównań

Analiza dotyczyła wcześniej wytypowanego, biologicznie uzasadnionego panelu kandydackich miRNA i miała charakter eksploracyjny. Główne wyniki raportowano na podstawie nominalnych wartości p, interpretowanych łącznie z wielkością efektu, kierunkiem zależności, spójnością biologiczną oraz wynikami analiz ROC i modeli regresji.

8.12.4. Analiza ROC/AUC

Wartość diagnostyczną i różnicującą wybranych miRNA oraz parametrów kliniczno-laboratoryjnych oceniano za pomocą analizy krzywych ROC. Pole pod krzywą ROC (AUC) wykorzystano jako miarę zdolności dyskryminacyjnej. Analizy ROC przeprowadzono osobno dla identyfikacji pacjentów z T2DM lub HbA1c $\geq 6,5\%$ oraz dla identyfikacji pacjentów z cięższym przebiegiem ACS definiowanym jako LVEF $\leq 40\%$ (**Tabela 3**).

Dla wybranych markerów wyznaczono optymalne wartości odcięcia wraz z czułością i swoistością. Optymalny punkt odcięcia wyznaczano na podstawie indeksu Youdena, maksymalizującego łączną wartość czułości i swoistości. Wyniki analiz ROC przedstawiano jako AUC wraz z 95% przedziałami ufności oraz wartością p.

8.12.5. Modele regresji i zmienne uwzględnione w modelach

W celu oceny niezależnych zależności pomiędzy markerami molekularnymi i klinicznymi a ciężkością ACS zastosowano wieloczynnikową regresję logistyczną. Zmienną zależną w głównym modelu była obecność LVEF $\leq 40\%$ w punkcie wyjściowym. Wyniki przedstawiano jako ilorazy szans (OR) wraz z 95% przedziałami ufności i wartościami p.

W głównym modelu uwzględniono połączony panel obejmujący wysoką ekspresję miR-1-5p, niskie eGFR i wysokie NT-proBNP oraz zmienne kliniczne potencjalnie związane z ciężkością zawału: wiek, płeć męską, stosowanie diuretyków pętlowych oraz obecność T2DM. Dobór zmiennych oparto na przesłankach klinicznych, wynikach analiz jednoczynnikowych oraz konieczności ograniczenia liczby predyktorów względem liczby zdarzeń w analizowanej kohorcie.

Kalibrację i dopasowanie modelu oceniano testem Hosmera-Lemeshowa. Biorąc pod uwagę obserwowaną wielkość efektu (OR ≈ 8) oraz częstość zdarzeń ($\sim 21\%$), analiza miała

wystarczającą moc do wykrycia związku panelu z ciężkością ACS; ograniczona liczba zdarzeń ciężkich mogła jednak wpływać na stabilność i możliwość uogólnienia modelu.

Analiza / model	Zmienna zależna	Główne predyktory / markery	Zmienne dodatkowe
ROC dla T2DM	Obecność T2DM / HbA1c $\geq 6,5\%$	miR-210-5p, miR-195-5p, hsTroponina	AUC, 95% CI, punkt odcięcia, czułość, swoistość
ROC dla LVEF $\leq 40\%$	LVEF $\leq 40\%$	miR-1-5p, eGFR, NT-proBNP, hsTroponina	AUC, 95% CI, punkt odcięcia, czułość, swoistość
Panel wielomarkerowy	LVEF $\leq 40\%$	miR-1-5p + eGFR + NT-proBNP	Porównanie AUC panelu z AUC pojedynczych markerów
Regresja logistyczna	LVEF $\leq 40\%$ w punkcie wyjściowym	Panel: wysokie miR-1-5p + niskie eGFR + wysokie NT-proBNP	Wiek, płeć męska, diuretyki pętlowe,

Tabela 3. Zmienne uwzględnione w analizach ROC i modelach regresji.

Zastosowane skróty: **95% CI**, ang. *95% confidence interval*, 95-procentowy przedział ufności; **AUC**, ang. *area under the curve*, pole pod krzywą; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*, szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej; **HbA1c**, ang. *glycated hemoglobin A1c*, hemoglobina glikowana A1c; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B; **ROC**, ang. *receiver operating characteristic*, charakterystyka operacyjna odbiornika; **T2DM**, ang. *type 2 diabetes mellitus*, cukrzyca typu 2.

8.13. Określenie wielkości próby

Ze względu na wtórny charakter podbadania biomarkerowego nie przeprowadzano odrębnej prospektywnej kalkulacji liczebności próby dla analiz miRNA. Wielkość próby wynikała z liczebności kohorty badania EMMY, dostępności materiału biologicznego, kompletności par próbek baseline i 26 tygodni oraz spełnienia kryteriów kontroli jakości RNA i qRT-PCR. Ostatecznie do analizy włączono 106 pacjentów, co należy uwzględnić przy interpretacji wyników, szczególnie w analizach podgrupowych i wieloczynnikowych.

8.14. Uwagi metodologiczne do interpretacji wyników.

Przedłożone analizy posiadają charakter translacyjny oraz eksploracyjny (*hypothesis-generating*). Umożliwiają one identyfikację i ocenę korelacji zachodzących pomiędzy profilami ekspresji wyselekcjonowanych krążących miRNA, statusem metabolicznym chorych a stopniem zaawansowania ACS, niemniej jednak ze względu na model badawczy nie stanowią podstawy do definitywnego wnioskowania o charakterze przyczynowo-skutkowym. Zmienność ekspresji miRNA w interwale między punktem wyjściowym (*baseline*) a 26. tygodniem obserwacji należy interpretować wyłącznie jako zmiany fenotypowe rejestrowane w trakcie standaryzowanej terapii empagliflozyną w obrębie poddanej analizie kohorty.

Wpływ na ostateczną interpretację uzyskanych wyników mają inherentne ograniczenia metodologiczne tego badania, do których należą przede wszystkim:

- **wtórny charakter analizy** (badanie typu *post-hoc* w ramach istniejącego protokołu klinicznego),
- **relatywnie ograniczona liczebność próby badawczej**, co implikuje konieczność zachowania ostrożności w odniesieniu do mocy statystycznej niektórych subanaliz międzygrupowych,
- **atrycja materiału biologicznego** (utrata części próbek) na etapach weryfikacji dostępności biobanku oraz rygorystycznej, laboratoryjnej kontroli jakości RNA,
- **brak zewnętrznej, niezależnej kohorty walidacyjnej**, co jest złotym standardem w badaniach nad nowymi biomarkerami molekularnymi.

9. Wyniki

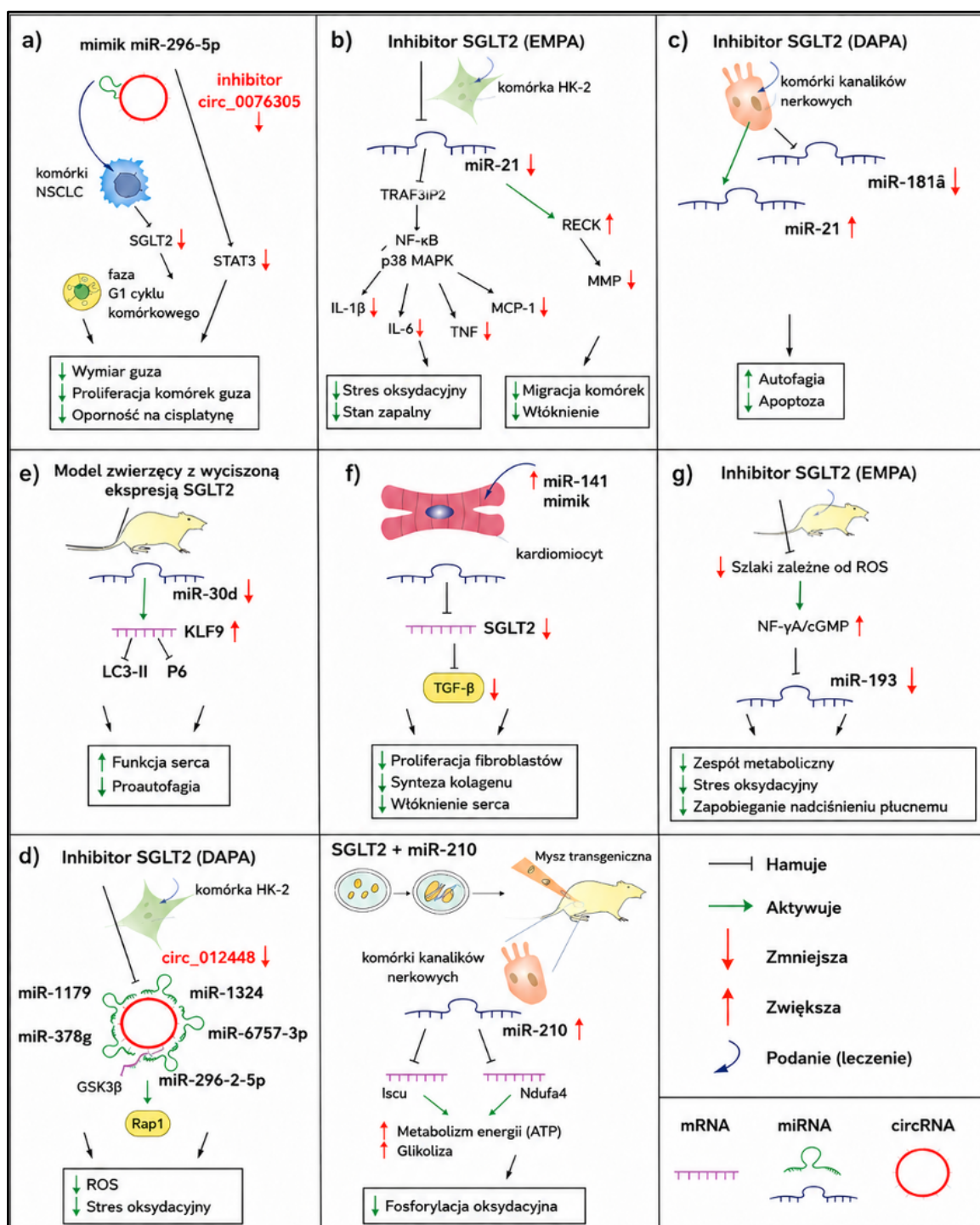
9.1. Wyniki analizy *in silico* i selekcja panelu miRNA do walidacji klinicznej

9.1.1. Oś SGLT2-ncRNA: identyfikacja potencjalnych miRNA i powiązanych genów.

W pierwszym etapie przeprowadzono przegląd piśmiennictwa dotyczący roli ncRNA, ze szczególnym uwzględnieniem miRNA oraz circRNA, w mechanizmach powiązanych z aktywnością SGLT2 oraz patofizjologią chorób kardiometabolicznych. Celem przeglądu było zestawienie aktualnych dowodów na powiązanie poszczególnych miRNA z procesami patofizjologicznymi szczególnie istotnymi w przebiegu ACS i remodelingu lewej komory serca (**hipoksja, apoptoza, włóknienie, stres oksydacyjny, zapalenie, angiogeneza**) oraz wytypowanie potencjalnych cząsteczek miRNA do dalszej weryfikacji bioinformatycznej. Szczegóły przeprowadzonego przeglądu literatury, obejmujące zarówno badania *in vitro*, modele zwierzęce, jak i kohorty kliniczne, zestawiono w Aneksie w **Tabeli 8 Aneks**.

Wyniki przeglądu literatury wskazują, że biologiczne **efekty modulacji SGLT2 wykraczają poza samą kontrolę glikemii i są ściśle powiązane z regulacją epigenetyczną pośredniczoną przez ncRNA**. Zidentyfikowano złożoną sieć regulacyjną łączącą aktywność SGLT2 z różnymi klasami ncRNA. Cząsteczki miRNA, lncRNA oraz circRNA działają jako centralne modulatory ekspresji genów w licznych szlakach biologicznych istotnych dla chorób metabolicznych oraz układu sercowo-naczyniowego. Synteza zebranych danych wskazuje również na rolę circRNA jako regulatorów nadrzędnych, mogących działać jak swoiste „gąbki” molekularne dla miRNA, modulujących ich biodostępność wewnątrzkomórkową.

Interakcja między sygnalizacją SGLT2 a ncRNA, wyłaniająca się z syntezy piśmiennictwa, koncentruje się wokół procesów kluczowych dla patofizjologii sercowo-naczyniowej: **zapalenia, stresu oksydacyjnego, włóknienia, apoptozy, angiogenezy oraz starzenia komórkowego**. W kontekście sercowo-naczyniowym wyodrębniono liczne cząsteczki miRNA zaangażowane w uszkodzenie mięśnia sercowego, przebudowę serca i progresję niewydolności serca (**Rycina 6-8**).



Rycina 7. Mechanizm działania miRNA i circRNA w powiązaniu z SGLT2 (na podstawie [1]).

Zastosowane skróty: **a)** NSCLC, ang. *non-small cell lung cancer*, niedrobnokomórkowy rak płuca; **mimic**, mimetyk/syntetyczna cząsteczka naśladująca, **STAT3**, ang. *signal transducer and activator of transcription 3*, przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3; **b)** **EMPA**, ang. empagliflozin, empagliflozyna; **HK-2 cell**, komórka HK-2 (ludzka linia komórek cewki proksymalnej nerki); **IL-1β**, ang. *interleukin-1 beta*, interleukina 1 beta; **IL-6**, ang.

interleukin-6, interleukina 6; **MCP-1**, ang. *monocyte chemoattractant protein-1*, białko chemotaktyczne monocytów 1; **MMP**, ang. *matrix metalloproteinase*, metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej; **NF-κB**, ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, czynnik jądrowy wzmacniający łańcuch lekki κ aktywowanych limfocytów B; **p38 MAPK**, ang. *p38 mitogen-activated protein kinase*, kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenami; **RECK**, ang. *reversion-inducing cysteine-rich protein*, bogate w cysteinę białko indukujące rewersję; **TNF**, ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów; **TRAF3IP2**, ang. *TRAF3 interacting protein 2*, białko 2 oddziałujące z *TRAF3* c) **DAPA**, ang. dapagliflozin, dapagliflozyna; d) **GSK-3β**, ang. *glycogen synthase kinase-3β*, kinaza syntazy glikogenu 3β; **Rap1**, ang. *Ras-related protein 1*, białko 1 związane z Ras; **ROS**, ang. *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu; e) **KLF9**, ang. *Krüppel-like factor 9*, czynnik podobny do Krüppela 9; **LC3-II**, ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3-II*, forma II lekkiego łańcucha 3 białka 1 związanego z mikrotubulami; f) **mimic**, mimetyk/syntetyczna cząsteczka naśladująca, **TGF-β**, ang. *transforming growth factor beta*, transformujący czynnik wzrostu beta; g) **NF-YA/cGMP**, ang. *nuclear transcription factor Y subunit alpha/cyclic guanosine monophosphate*, podjednostka alfa jądrowego czynnika transkrypcyjnego Y/cykliczny monofosforan guanozyny; **ATP**, ang. *adenosine triphosphate*, adenozyntrifosforan/trifosforan adenozyyny; **circRNA**, ang. *circular RNA*, koliste RNA; **Iscu**, ang. *iron-sulfur cluster assembly enzyme*, enzym składania klastrów żelazowo-siarkowych; **miRNA**, **miR**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **Ndufa4**, ang. *cytochrome c oxidase subunit NDUFA4* / dawniej także *NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit A4*, podjednostka NDUFA4 oksydazy cytochromu c;

W przeglądzie wyodrębniono także mechanizmy zachodzące za pośrednictwem miRNA oraz circRNA, które łączą aktywność SGLT2 z regulacją metaboliczną i nerkową. W szczególności modulacja miRNA wiąże się z poprawą wrażliwości na insulinę, regulacją metabolizmu lipidów oraz osłabieniem uszkodzeń wywołanych hiperglikemią (**Rycina 7**). W kontekście nerek ncRNA uczestniczą w szlakach regulujących hemodynamikę kłębuszkową, włóknienie oraz reakcję zapalną (**Rycina 6-8**).

Na podstawie analizy piśmiennictwa wyodrębniono sieci regulacyjne, w których inhibitory SGLT2 modulują procesy epigenetyczne. Szczególną uwagę zwrócono na zjawisko molekularnego „gąbkowania” (ang. *RNA sponging*), gdzie cząsteczki circRNA działają jako nadrzędne regulatory, wpływając na dostępność specyficznych miRNA. Synteza uzyskanych danych pozwoliła na wytypowanie procesów o najwyższym priorytecie dla celów projektowanego badania klinicznego:

- stanu zapalnego i stres oksydacyjny w układzie naczyniowym,
- hipoksja i apoptoza kardiomiocytów bezpośrednio po incydencie niedokrwiennym,

- **włóknienie i przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej.**

Zebrane w przeglądzie dane wskazują na potencjalne znaczenie **miRNA jako biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych, narzędzi monitorowania odpowiedzi na leczenie oraz potencjalnych celów terapeutycznych**. Jednocześnie zidentyfikowano ograniczenia obecnego stanu wiedzy, w tym niewielką liczbę badań mechanistycznych, brak standaryzacji metodologicznej, znaczną heterogeniczność analizowanych populacji oraz niewystarczającą walidację kliniczną.

W ramach analizy bioinformatycznej zmapowano **sieć interakcji pomiędzy SGLT2 a ncRNA**. Architektura tej regulacji okazała się silnie powiązana i nieliniowa, co wspiera koncepcję medycyny sieciowej zakładającej, że **biologiczne efekty modulacji SGLT2 wynikają ze skoordynowanej regulacji wielu szlaków molekularnych, a nie z oddziaływania na pojedynczy cel**.

Analiza wykazała, że miRNA, lncRNA oraz circRNA działają jako centralne modulatory ekspresji genów w licznych szlakach biologicznych istotnych dla chorób metabolicznych i sercowo-naczyniowych. Co istotne, ncRNA regulują ponad połowę genów kodujących białka, co podkreśla ich kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej; tak szeroki zakres działania wyjaśnia, dlaczego nawet niewielkie zmiany ekspresji miRNA mogą prowadzić do wyraźnych efektów fizjologicznych i patologicznych [142,143]. Potwierdzono również znaczenie circRNA jako regulatorów nadrzędnych, działających jak swoiste „gąbki” dla miRNA, modulujących ich biodostępność i pośrednio wpływających na całe sieci ekspresji genów. Tym samym oś SGLT2-ncRNA funkcjonuje jako wielopoziomowy system regulacyjny, a nie prosty szlak liniowy.

Identyfikacja kluczowych procesów biologicznych regulowanych przez oś SGLT2-miRNA.

Przeprowadzona analiza wykazała, że interakcja między sygnalizacją **SGLT2 a ncRNA** koncentruje się wokół kilku kluczowych procesów biologicznych istotnych dla zdrowia układu sercowo-naczyniowego: **zapalenia, stresu oksydacyjnego, włóknienia, apoptozy, angiogenezy oraz starzenia komórkowego**. Procesy te są ze sobą ściśle powiązane i tworzą zintegrowaną sieć patofizjologiczną. Przykładowo, miRNA zaangażowane w sygnalizację zapalną regulują równocześnie procesy włóknienia i stresu

oksydacyjnego - dwa zjawiska o kluczowym znaczeniu w przebudowie mięśnia sercowego. Wynika z tego istotna zmiana paradygmatu: zamiast traktować działanie SGLT2 wyłącznie jako efekt metaboliczny lub nerkowy, należy je rozumieć jako mechanizm wpływający na progresję choroby ogólnoustrojowej za pośrednictwem regulacji epigenetycznej.

Efekty sercowo-naczyniowe: mechanistyczne spojrzenie na regulację przez miRNA.

W kontekście sercowo-naczyniowym przeprowadzona analiza pozwoliła zidentyfikować szereg miRNA zaangażowanych w uszkodzenie i przebudowę mięśnia sercowego a następnie progresję do niewydolności serca. Częsteczki te regulują szlaki związane z przeżyciem oraz apoptozą kardiomiocytów, przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej i włóknieniem, a także z funkcją śródbłónka i angiogenezą. Uzyskane obserwacje sugerują, że modulacja ekspresji miRNA może stanowić jeden z kluczowych mechanizmów leżących u podstaw efektów kardioprotekcyjnych obserwowanych w badaniach klinicznych. Wyniki potwierdzają również udział sygnalizacji związanej z SGLT2 w regulacji wielu typów komórek - w tym kardiomiocytów, komórek śródbłónka i adipocytów - co przemawia za wielotkankowym mechanizmem działania i wzmacnia koncepcję, zgodnie z którą korzyści sercowo-naczyniowe wynikają z ogólnoustrojowego przeprogramowania molekularnego, a nie z efektu ograniczonego do pojedynczego narządu.

Znaczenie kliniczne: ncRNA jako biomarkery i cele terapeutyczne.

Wyniki analizy bioinformatycznej dostarczyły racjonalnych przesłanek do dalszej walidacji wybranych cząsteczek w materiale klinicznym. W oparciu o profil powiązań z procesami istotnymi w T2DM oraz patofizjologii ACS - w szczególności z hipoksją, włóknieniem i apoptozą - wytypowano **miR-210-5p oraz miR-195-5p** jako kandydatów potencjalnie powiązanych ze **statusem metabolicznym** pacjentów. Z kolei **miR-1-5p**, ze względu na wysoką tkankową specyficzność kardiologiczną oraz znaczną liczbę genów docelowych powiązanych z funkcją mięśnia sercowego, wytypowano jako kandydata do oceny **ciężkości ACS**.

Dojrzałe ID miRNA (hsa)	GO MI	GO stres oksydacyjny	GO hipoksja	GO autofagia	GO zapalenie	GO krzepnięcie	GO angiogeneza	GO funkcje mięśnia sercowego	GO przerost mięśnia	GO włóknienie	GO apoptoza	Disgenet ICM	T2DM	Miażdżyca	Nefropatia	CVD
miR-21-3p	159	22	80	48	137	32	124	103	17	52	279	24	114	25	98	36
miR-21-5p	332	64	212	26	85	34	98	85	14	62	268	20	95	27	97	24
miR-210	322	59	201	51	133	40	110	103	14	61	304	20	126	31	90	39
miR-34a-5p	554	116	306	107	224	91	214	212	27	133	611	54	223	43	172	73
miR-195-5p	313	59	177	73	157	69	177	179	20	115	468	40	176	41	146	44
miR-106a-5p	365	74	226	68	126	43	150	175	25	77	404	38	153	36	117	47
miR-214-3p	212	42	142	50	128	46	147	151	25	75	353	34	135	25	108	36
miR-16-5p	419	88	246	122	259	108	274	260	37	162	735	54	275	58	210	73
miR-1-5p	274	68	173	131	240	115	255	247	31	153	741	58	242	57	203	88
miR-126	329	69	195	127	235	102	262	252	35	156	697	53	256	59	200	92

Tabela 4. Wyniki analizy *in silico*: liczba przewidywanych genów docelowych dla wyselekcjonowanych cząsteczek miRNA w ontologii procesów biologicznych (GO) i bazach chorobowych (DisGeNET i T2D database).

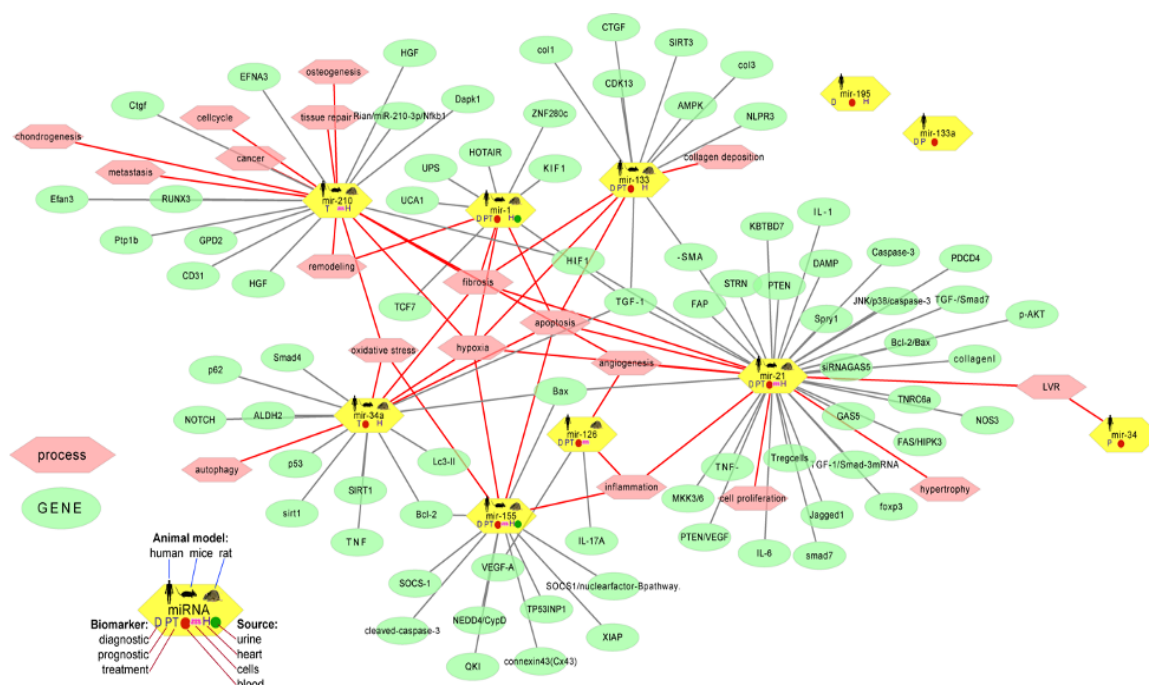
Zastosowane skróty: **CVD**, ang. *cardiovascular disease*, choroba sercowo-naczyniowa; **DisGeNET**, ang. *Disease Gene Network*, baza danych powiązań gen–choroba; **GO**, ang. *Gene Ontology*, ontologia genów; **hsa**, ang. *Homo sapiens*, człowiek; **ICM**, ang. *ischemic cardiomyopathy*, kardiomiopatia niedokrwienna; **ID**, ang. *identifier*, identyfikator; **MI**, ang. *myocardial infarction*, zawał mięśnia sercowego; **miRNA**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **T2D database**, baza genów powiązanych z cukrzycą typu 2; **T2DM**, ang. *type 2 diabetes mellitus*, cukrzyca typu 2.

Analizowane cząsteczki miRNA uszeregowano według liczby przewidywanych genów docelowych powiązanych z T2DM i chorobami układu sercowo-naczyniowego, a następnie podzielono na cztery klastry: im niższy numer klastra, tym większa liczba regulowanych genów, a tym samym silniejsze powiązanie z analizowanymi jednostkami chorobowymi. Intensywność barwy komórki odpowiada numerowi klastra - im ciemniejszy odcień, tym niższy numer klastra (**Tabela 4**).

Analiza sieci interakcji wykazała, że procesami najczęściej współdzielonymi przez analizowane miRNA było:

- nasilenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w układzie naczyniowym,
- apoptoza kardiomiocytów bezpośrednio po incydencie niedokrwinnym,
- włóknienie i przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej, stanowiących główne determinanty spadku LVEF.

Do najistotniejszych współdzielonych genów docelowych należały **TGF- β 1**, **Bax**, **Bcl-2**, **HIF1 α** oraz **α -SMA**. Najwyższą łączność w sieci wykazywały **miR-21**, **miR-210**, **miR-34a**, **miR-155**, **miR-133** oraz **miR-1**, co stanowiło dodatkowy argument przemawiający za ich wyborem do walidacji klinicznej (**Rycina 8**).



Rycina 8. Sieć interakcji między genami mRNA a procesami wybranymi na podstawie piśmiennictwa.

Zastosowane skróty: **A**, ang. *animal*, model zwierzęcy; **ALDH2**, ang. *aldehyde dehydrogenase 2*, dehydrogenaza aldehydowa 2; **AMPK**, ang. *AMP-activated protein kinase*, kinaza białkowa aktywowana AMP; **Bax**, ang. *BCL2-associated X protein*, białko X związane z BCL2; **Bcl-2**, ang. *B-cell lymphoma 2*, białko chłoniaka z komórek B 2; **Caspase-3**, ang. *caspase-3*, kaspaza 3; **CD31**, ang. *cluster of differentiation 31*, marker różnicowania CD31; **CDK13**, ang. *cyclin-dependent kinase 13*, kinaza zależna od cyklin 13; **Col1**, ang. *collagen type I*, kolagen typu I; **Col3**, ang. *collagen type III*, kolagen typu III; **Ctgf**, ang. *connective tissue growth factor*, czynnik wzrostu tkanki łącznej; **CypD**, ang. *cyclophilin D*, cyklofilina D; **D**, ang. *diagnostic*, zastosowanie diagnostyczne; **DAMP**, ang. *damage-associated molecular pattern*, wzorzec molekularny związany z uszkodzeniem; **Dapk1**, ang.

death-associated protein kinase 1, kinaza białkowa 1 związana ze śmiercią komórki; **Efna3**, ang. *ephrin A3*, efryna A3; **FAP**, ang. *fibroblast activation protein*, białko aktywacji fibroblastów; **FAS**, ang. *Fas cell surface death receptor*, receptor śmierci komórkowej Fas; **Foxp3**, ang. *forkhead box P3*, czynnik transkrypcyjny Foxp3; **GAS5**, ang. *growth arrest-specific 5*, transkrypt GAS5 związany z zatrzymaniem wzrostu; **GPD2**, ang. *glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2*, dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa 2; **H**, ang. *human*, człowiek / badanie u ludzi; **HGF**, ang. *hepatocyte growth factor*, czynnik wzrostu hepatocytów; **HIF-1 α** , ang. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*, czynnik indukowany hipoksją 1 alfa; **HIPK3**, ang. *homeodomain-interacting protein kinase 3*, kinaza białkowa 3 oddziałująca z homeodomeną; **HOTAIR**, ang. *HOX transcript antisense RNA*, antysensowny RNA transkryptu HOX; **IL-1**, ang. *interleukin-1*, interleukina 1; **IL-6**, ang. *interleukin-6*, interleukina 6; **IL-17A**, ang. *interleukin-17A*, interleukina 17A; **JNK**, ang. *c-Jun N-terminal kinase*, kinaza N-końcowa c-Jun; **KBTBD7**, ang. *kelch repeat and BTB domain-containing protein 7*, białko 7 zawierające powtórzenia Kelch i domenę BTB; **KIF1**, ang. *kinesin family member 1*, członek rodziny kinezyn 1; **LC3-II**, ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3-II*, forma II lekkiego łańcucha 3 białka 1 związanego z mikrotubulami; **LVR**, ang. *left ventricular remodeling*, remodeling lewej komory; **MKK3/6**, ang. *mitogen-activated protein kinase kinase 3/6*, kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami 3/6; **miRNA**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **mRNA**, ang. *messenger RNA*, matrycowy RNA; **NEDD4**, ang. *neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4*, ligaza ubikwitynowa NEDD4; **NF- κ B**, ang. *nuclear factor kappa B*, podjednostka 1 czynnika NF- κ B; **NLRP3**, ang. *NLR family pyrin domain containing 3*, białko NLRP3 zawierające domenę pirynową; **NOS3**, ang. *nitric oxide synthase 3*, syntaza tlenu azotu 3; **NOTCH**, ang. *Notch receptor*, receptor Notch; **p-AKT**, ang. *phosphorylated AKT*, ufosforylowana kinaza AKT; **p38**, ang. *p38 mitogen-activated protein kinase*, kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenami; **p53**, ang. *tumor protein p53*, białko supresorowe nowotworu p53; **p62**, ang. *sequestosome 1*, sekwestosom 1; **P**, ang. *prognostic*, zastosowanie prognostyczne; **PDCD4**, ang. *programmed cell death 4*, białko programowanej śmierci komórki 4; **Ptp1b**, ang. *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1*, niereceptorowa fosfataza tyrozynowa typu 1; **PTEN**, ang. *phosphatase and tensin homolog*, homolog fosfatazy i tensyny; **QKI**, ang. *QKI, KH domain-containing RNA binding protein*, białko wiążące RNA QKI zawierające domenę KH; **RUNX3**, ang. *runt-related transcription factor 3*, czynnik transkrypcyjny RUNX3; **siRNA**, ang. *small interfering RNA*, mały interferujący RNA; **SIRT1**, ang. *sirtuin 1*, sirtuina 1; **SIRT3**, ang. *sirtuin 3*, sirtuina 3; **Smad3 / Smad4 / Smad7**, ang. *SMAD family member 3/4/7*, białka z rodziny SMAD 3/4/7; **SOCS-1**, ang. *suppressor of cytokine signaling 1*, supresor sygnalizacji cytokin 1; **Spry1**, ang. *sprouty RTK signaling antagonist 1*, antagonist sygnalizacji RTK Sprouty1; **STRN**, ang. *striatin*, striatyna; **T**, ang. *therapeutic*, zastosowanie terapeutyczne; **TCF7**, ang. *transcription factor 7*, czynnik transkrypcyjny 7; **TGF- β 1**, ang. *transforming growth factor beta 1*, transformujący czynnik wzrostu beta 1; **TNF**, ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów; **TNRC6a**, ang. *trinucleotide repeat-containing adaptor 6A*, adaptor 6A zawierający powtórzenia trójnukleotydowe; **TP53INP1**, ang. *tumor protein p53-inducible nuclear protein 1*, jądrowe białko 1 indukowane przez p53; **Treg cells**, ang. *regulatory T cells*, limfocyty T regulatorowe; **UCA1**, ang. *urothelial cancer-associated 1*, transkrypt UCA1 związany z rakiem urotelialnym; **UPS**, ang. *ubiquitin-proteasome system*, układ ubikwityna–proteasom; **VEGF-A**, ang. *vascular endothelial growth factor A*, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu A; **XIAP**, ang. *X-linked*

inhibitor of apoptosis protein, sprzężone z chromosomem X białko hamujące apoptozę; **ZNF280c**, ang. *zinc finger protein 280C*, białko palca cynkowego 280C; **α -SMA**, ang. *alpha-smooth muscle actin*, alfa-aktyna mięśni gładkich.

Pomimo obiecujących wyników należy zaznaczyć, że dziedzina ta znajduje się wciąż na wczesnym etapie rozwoju. Do głównych ograniczeń obecnego stanu wiedzy należą: niewielka liczba badań mechanistycznych, brak standaryzacji metodologii, znaczna heterogeniczność badanych populacji oraz niewystarczająca walidacja kliniczna. Większość dostępnych danych ma nadal charakter przedkliniczny lub eksploracyjny, co czyni ich bezpośrednie przełożenie na codzienną praktykę kliniczną, istotnym wyzwaniem.

Reasumując, oś SGLT2-ncRNA stanowi złożony, wielopoziomowy układ regulacyjny integrujący szlaki metaboliczne, sercowo-naczyniowe i zapalne. Najistotniejszym wnioskiem płynącym z przeprowadzonej części przeglądowo-bioinformatycznej jest stwierdzenie, że ncRNA pełnią rolę centralnych pośredników łączących sygnalizację SGLT2 z ogólnoustrojowymi efektami biologicznymi (**Tabela 4, Rycina 8**). Mechanizmy związane z SGLT2 należy zatem rozumieć nie tylko jako efekt farmakologiczny, lecz także jako element szerszej sieci regulacji epigenetycznej. Uzyskane obserwacje uzasadniają dalsze badania nad diagnostyką i terapią opartą na ncRNA, ze szczególnym uwzględnieniem chorób kardiometabolicznych - co stanowi punkt wyjścia dla klinicznej części tej rozprawy doktorskiej.

9.1.2. Analiza *in silico*: klasteryzacja, sieć interakcji i wybór panelu miRN

Klasteryzacja i identyfikacja centralnych regulatorów

Dla każdego z potencjalnych miRNA wytypowanych z piśmiennictwa określono liczbę przewidywanych genów docelowych zaangażowanych w szlaki adekwatne do celów rozprawy. Następnie dokonano podziału uzyskanych danych na klastry algorytmiczne. Agregację i zliczanie genów docelowych w poszczególnych listach wykonano przy użyciu autorskiego pakietu *wizbionet* (funkcja `col_agrecounter`), a podziału uzyskanych danych na cztery klastry dokonano metodą uczenia maszynowego *OneR* (funkcja `clusterizer_oneR`), opartą na optymalizacji naturalnych przedziałów Jenksa; w przypadku zbyt małej liczebności klastrów stosowano grupowanie metodą *k-means*. Za miRNA oraz geny o najwyższym znaczeniu uznawano elementy należące do pierwszego klastra.

Kryterium różnicowania stanowiła liczba przewidywanych genów docelowych powiązanych z T2DM oraz CVD, na podstawie której cząsteczki przypisano do kolejnych klastrów:

- **Klastry o wyższych numerach (cl2–cl4):** cząsteczki miRNA regulujące mniejszą liczbę genów, o słabszym, pośrednim powiązaniu z T2DM oraz chorobami układu sercowo-naczyniowego.
- **Pierwszy klaster (cl1):** cząsteczki miRNA regulujące największą liczbę genów, o potwierdzonym, silnym powiązaniu patofizjologicznym zarówno z T2DM, jak i niewydolnością serca oraz ostrym uszkodzeniem niedokrwiennym.

Wyniki klastrowej analizy ilościowej, stanowiące bezpośrednią podstawę wyboru eksperymentalnego, zestawiono w **Tabeli 4**.

Mapowanie interakcji gen-proces (medycyna sieciowa)

Budując model sieciowy interakcji, zmapowano powiązania pomiędzy wytypowanymi transkryptami a docelowymi mRNA. Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano, że kluczowe molekularne punkty wspólne (węzły o najwyższej konektywności) skupiają się wokół następujących genów o udokumentowanym znaczeniu patofizjologicznym:

- TGF- β 1 oraz α -SMA (szlaki włóknienia pozawałowego i remodelingu),
- Bax oraz Bcl-2 (szlaki wewnątrzpochodnej apoptozy komórkowej),
- HIF-1 α (komórkowa odpowiedź na stan niedotlenienia/hipoksji),
- szlaki sygnałowe powiązane z deacetylazą histonową SIRT1.

Aparaty regulacyjne tych genów są bezpośrednio kontrolowane przez miRNA charakteryzujące się w przeprowadzonej analizie najwyższą topologiczną łącznością w sieci: miR-21, miR-210, miR-133, miR-155, miR-34a oraz miR-1. Cząsteczka miR-195 nie wykazywała połączeń w sieci interakcji (pozostawała izolowana na Rycinie 6), jednak ze względu na jej znaczenie udokumentowane w piśmiennictwie oraz w naszej analizie zdecydowano o uwzględnieniu jej w oznaczeniach qRT-PCR

Uzasadnienie selekcji miRNA do etapu klinicznego i hipoteza badawcza

Zrealizowany etap analiz badawczych *in silico* pozwolił na sformułowanie precyzyjnych założeń dla części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej. Wykazana nieliniowość i wielopoziomowość sieci epigenetycznej uzasadnia hipotezę, że kliniczne efekty stosowania empagliflozyny u pacjentów po ostrym zespole wieńcowym z towarzyszącą cukrzycą typu 2 nie wynikają wyłącznie z klasycznego działania hemodynamiczno-metabolicznego, lecz są mediowane przez zmianę profilu ekspresji specyficznych miRNA.

Cząsteczki o najwyższej gęstości regulacyjnej dla procesów apoptozy, odpowiedzi na hipoksję oraz włóknienia stanowiły rdzeń przesłanek selekcyjnych; ostateczny panel oznaczeń ilościowych metodą qRT-PCR (siedem cząsteczek) zestawiono w **Tabeli 2**. Ocena zmian ich stężeń w osoczu krwi obwodowej pacjentów w okresie 26 tygodni leczenia empagliflozyną, w bezpośrednim odniesieniu do ewolucji parametru LVEF (ze szczególnym uwzględnieniem grupy wysokiego ryzyka z $LVEF \leq 40\%$), stanowi rozwinięcie i kliniczną weryfikację zaprezentowanego w tym rozdziale modelu bioinformatycznego.

Panel kandydackich miRNA wybrano na podstawie zintegrowanego podejścia obejmującego przegląd literatury, analizę dostępnych danych transkryptomicznych oraz analizę bioinformatyczną. Uwzględniano miRNA związane z chorobami kardiometabolicznymi, ACS, T2DM, hipoksją, stresem oksydacyjnym, zapaleniem, włóknieniem, angiogenezą, apoptozą i przebudową mięśnia sercowego.

Przeprowadzono analizę przewidywanych genów docelowych oraz ocenę ich powiązania z procesami biologicznymi (kategorie Gene Ontology, GO) i jednostkami chorobowymi (bazy DisGeNET oraz T2D database). Celem było wytypowanie miRNA najsilniej powiązanych z procesami biologicznymi istotnymi dla uszkodzenia i przebudowy mięśnia sercowego oraz zaburzeń metabolicznych. Wybrane miRNA poddano następnie walidacji ilościowej metodą qRT-PCR.

W analizie bioinformatycznej wytypowano osiem cząsteczek miRNA, jednak w analizie qRT-PCR przedstawiono wyniki dla siedmiu z nich, ponieważ jedna (miR-34a-5p) nie była wystarczająco wiarygodna do analizy statystycznej (**Tabela 5, Rycina 9**). Dalszą, pogłębioną analizę i interpretację biologiczną skoncentrowano na cząsteczkach, które osiągnęły istotność statystyczną w poszczególnych analizach: **miR-210-5p i miR-195-5p**

w odniesieniu do statusu metabolicznego (T2DM), **miR-1-5p** w odniesieniu do ciężkości ACS ($LVEF \leq 40\%$) oraz **miR-21-5p** w analizie zmian ekspresji w czasie.

9.2. Charakterystyka populacji

Do retrospektywnej analizy włączono grupę 106 chorych hospitalizowanych z powodu ACS. Cukrzycę typu 2 rozpoznano u 28 pacjentów, co stanowiło 26,4% ~ 26% badanej populacji, podczas gdy pozostałych 78 chorych (73,6% ~ 74%) charakteryzowało się prawidłową gospodarką węglowodanową (brak T2DM). Wyjściowa LVEF w całej kohorcie wynosiła medianowo 48% (rozstęp międzykwartylowy, ang. *interquartile range*, IQR: 41-53%). Istotną dysfunkcję skurczową lewej komory serca, zdefiniowaną jako wartość $LVEF \leq 40\%$ i przyjętą za marker niekorzystnego przebiegu klinicznego ACS, udokumentowano u 22 chorych (20,8%) (**Rycina 4**).

9.3. Porównanie pacjentów z T2DM i bez T2DM

Szczegółową charakterystykę kliniczną i demograficzną badanej populacji w zależności od statusu gospodarki węglowodanowej zebrano w **Tabeli 6**. Pacjenci z rozpoznaną T2DM charakteryzowali się istotnie statystycznie wyższym BMI ($p = 0,003$) oraz wyższą częstością współistnienia nadciśnienia tętniczego ($p = 0,023$) w porównaniu z grupą bez T2DM. Zgodnie z kryteriami patofizjologicznymi u chorych na T2DM odnotowano również znamienne wyższe wartości odsetka hemoglobiny glikowanej (HbA1c; $p < 0,001$). W zakresie profilu biomarkerów laboratoryjnych, u chorych z T2DM stwierdzono istotnie niższe wyjściowe stężenia troponiny sercowej o wysokiej czułości (hs-cTn, *high-sensitivity cardiac troponin*; $p = 0,006$). Ocena profilu ekspresji krążących miRNA wykazała znamienne różnice między podgrupami: u pacjentów z T2DM udokumentowano istotne obniżenie poziomu ekspresji miR-210-5p ($p < 0,001$) przy jednoczesnej nadekspresji miR-195-5p ($p = 0,001$). Poziomy ekspresji pozostałych poddanych analizie cząsteczek miRNA nie wykazały różnic o znamienności statystycznej pomiędzy porównywanymi grupami chorych.

Zgodnie z oczekiwanym profilem klinicznym, pacjenci z T2DM otrzymywali znamienne częściej leki przeciwcukrzycowe: metforminę (86% vs 0%; $p < 0,0001$), inhibitory dipeptydylopeptydazy 4 (ang. *dipeptidyl peptidase-4 inhibitors*, DPP-4i) (18% vs 0%; $p < 0,001$), agonistów receptora glukagonopodobnego peptydu 1 (ang. *glucagon-like peptide-*

l receptor agonist, GLP-1 RA) (11% vs 0%; $p=0,003$), pochodne sulfonilomocznika (7% vs 0%; $p=0,017$) oraz insulinę (25% vs 0%; $p<0,0001$). Ponadto w grupie chorych z T2DM odnotowano graniczną statystycznie wyższą częstość występowania otyłości (46% vs 27%; $p=0,050$).

Dane kliniczne	Ogółem (n=106)	ACS bez T2DM (n=78, 73%)	ACS z T2DM (n=28, 26%)	wartość p
Wiek (lata), mediana (IQR)	57.0 (52.8- 65.0)	57.0 (52.0-64.8)	56.5 (53.0- 66.3)	0.542
Płeć męska, n (%)	82 (80)	60 (81)	22 (79)	0.802
BMI (kg/m ²), median (IQR)	28.6 (25.8- 30.8)	27.7 (25.0-30.3)	29.8 (28.0- 33.0)	0.003
Otyłość, n (%)	34 (32)	21 (27)	13 (46)	0.050
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	38 (36)	23 (30)	15 (54)	0.023
Dyslipidemia, n (%)	22 (21)	15 (19)	7 (25)	0.518
Palenie tytoniu (aktualne lub w przeszłości), n (%)	72 (68)	52 (67)	20 (71)	0.643
Choroba wieńcowa, n (%)	15 (14)	12 (15)	3 (11)	0.543
Udar w wywiadzie, n (%)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0.547

Zawał w wywiadzie, n (%)	3 (3)	3 (4)	0 (0)	0.292
Depresja, n (%)	7 (7)	6 (8)	1 (4)	0.451
Nowotwór w wywiadzie, n (%)	6 (6)	5(6)	1 (4)	0.577
LVEF wyjściowo (%)	48 (41-53)	48 (41-52)	48 (44-55)	0.413
Wynik koronarografii - liczba zajętych naczyń				
Choroba trójnaczyniowa, n (%)	21 (20)	18 (23)	3 (11)	0.159
Choroba dwunaczyniowa	43 (41)	30 (39)	13 (46)	0.461
Choroba jednonaczyniowa	42 (40)	30 (39)	12 (43)	0.683
Leczenie farmakologiczne				
ACE-I/ARB, n (%)	102 (98)	77 (99)	25 (96)	0.410
ARNI, n (%)	1 (1)	0 (0)	1 (4)	0.094
Beta-blokery, n (%)	100 (94)	73 (94)	27 (96)	0.577
MRA, n (%)	46 (43)	33 (42)	13 (46)	0.706
Diuretyk pętlowy, n (%)	13 (12)	9 (12)	4 (14)	0.704
Statyna, n (%)	103 (97)	75 (96)	28 (100)	0.292
Ezetymib, n (%)	21 (20)	16 (21)	5 (18)	0.762

Antagoniści kanałów wapniowych, n (%)	11 (10)	6 (8)	5 (18)	0.130
Leki przeciwplatekcyjne, n (%)	106 (100)	78 (100)	28 (100)	-
Leki przeciwkrzepliwne, n (%)	11 (10)	7 (9)	4 (14)	0.429
Metformina, n (%)	24 (23)	0 (0)	24 (86)	<0.0001
Inhibitor DPP4, n (%)	5 (5)	0 (0)	5 (18)	0.0001
Pochodne sulfonilomocznika n (%)	2 (2)	0 (0)	2 (7)	0.017
GLP-1 RA, n (%)	3 (3)	0 (0)	3 (11)	0.003
Insulina, n (%)	7 (7)	0 (0)	7 (25)	<0.0001
Parametry laboratoryjne				
NT-proBNP (pg/ml), mediana (IQR)	1198.5 (750.5-2094.5)	1107.5 (763.8-2217.0)	1413.0 (645.3-1975.5)	0.783
eGFR (mL/min/1.73 m²), mediana (IQR)	91.3 (78.3-99.0)	90.1 (78.3-99.0)	92.7 (76.6-100.5)	0.830
HbA1c (%), mediana (IQR)	5.7 (5.4-6.2)	5.5 (5.4-5.8)	7.0 (6.5-8.4)	< 0.0001
Creatinine (mg/dl), mediana (IQR)	0.9 (0.8-1.0)	0.9 (0.8-1.0)	0.9 (0.7-1.0)	0.449

Troponina T centralna (ng/L), mediana (IQR)	3051.0 (2060.0-5040.5)	2903.0 (2099.0-5112.5)	3222.5 (1893.0-4640.0)	0.723
hsTroponina (ng/L), mediana (IQR)	3531 (2308.5-5649.5)	3791 (2750.5-6571.5)	2602 (1465.5-4899.3)	0.006
Cholesterol całkowity (mg/dL), mediana (IQR)	196.0 (172.8-233.3)	196.5 (171.3-232.8)	193.0 (173.8-236.8)	0.792
Cholesterol LDL (mg/dL), mediana (IQR)	127.0 (106.8-159.0)	128.5 (106.3-154.0)	127.5 (106.0-167.3)	0.952
Cholesterol HDL (mg/dL), mediana (IQR)	43.0 (36.0-54.0)	43.5 (37.3-54.8)	39.5 (33.5-50.8)	0.076
Aminotransferaza asparaginianowa (IU/L), mediana (IQR)	225.5 (148.8-317.0)	230.5 (149.3-310.0)	209.5 (136.8-388.0)	0.819
Aminotransferaza alaninowa (IU/L), mediana (IQR)	48.0 (38.0-68.0)	49.5 (38.0-69.5)	46.0 (40.3-62.8)	0.706
Gamma-glutamylotransferaza (IU/L), mediana (IQR)	30.5 (20.0-47.0)	29.0 (18.3-46.8)	31.0 (21.5-48.3)	0.643
Ekspresja miRNA				
miR-210-5p wyjściowo	12.0 (11.1-12.7)	12.4 (11.5-12.8)	11.2 (10.3-12.1)	0.000006

miR-21-5p wyjściowo	12.4 (11.9-15.3)	12.2 (11.8-15.5)	12.4 (12.1-13.3)	0.938
miR-126-5p wyjściowo	11.9 (10.9-13.8)	11.6 (10.3-13.3)	13.3 (12.9-14.2)	0.064
miR-1-5p wyjściowo	11.1 (9.9-12.5)	10.6 (9.6-13.1)	11.3 (10.2-11.7)	0.869
miR-155-5p wyjściowo	10.6 (9.3-12.1)	9.8 (9.3-11.4)	12.0 (10.6-12.2)	0.595
miR-195-5p wyjściowo	12.6 (8.9-13.9)	8.9 (8.8-10.5)	13.4 (12.6-14.2)	0.001
miR-133a-5p wyjściowo	12.7 (9.9-14.7)	13.6 (10.1-15.5)	12.1 (9.8-12.8)	0.665

Tabela 5. Wyjściowa charakterystyka demograficzna, kliniczna, laboratoryjna i ekspresja miRNA w zależności od obecności T2DM.

Dane przedstawiono jako medianę i zakres międzykwartylowy. Wartość p obliczono za pomocą testu chi-kwadrat dla zmiennych kategoriycznych oraz testu U Manna-Whitneya.

Zastosowane skróty: **ACE-I**, ang. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*, inhibitory konwertazy angiotensyny; **ARB**, ang. *angiotensin receptor blockers*, blokery receptora angiotensyny; **ARNI**, ang. *angiotensin receptor-neprilysin inhibitors*, inhibitory receptora angiotensyny i neprylizyny; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*, szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej; **GLP-1 RA**, ang. *glucagon-like peptide-1 receptor agonists*, agoniści receptora glukagonopodobnego peptydu 1; **HbA1c**, ang. *glycated hemoglobin A1c*, hemoglobina glikowana A1c; **IQR**, ang. *interquartile range*, rozstęp międzykwartylowy; **LOG10**, ang. *base-10 logarithm*, logarytm dziesiętny; **miRNA**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **MRA**, ang. *mineralocorticoid receptor antagonists*, antagoniści receptora mineralokortykoidowego; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B; **SD**, ang. *standard deviation*, odchylenie standardowe.

* Zamiast testu chi-kwadrat zastosowano dokładny test Fishera.

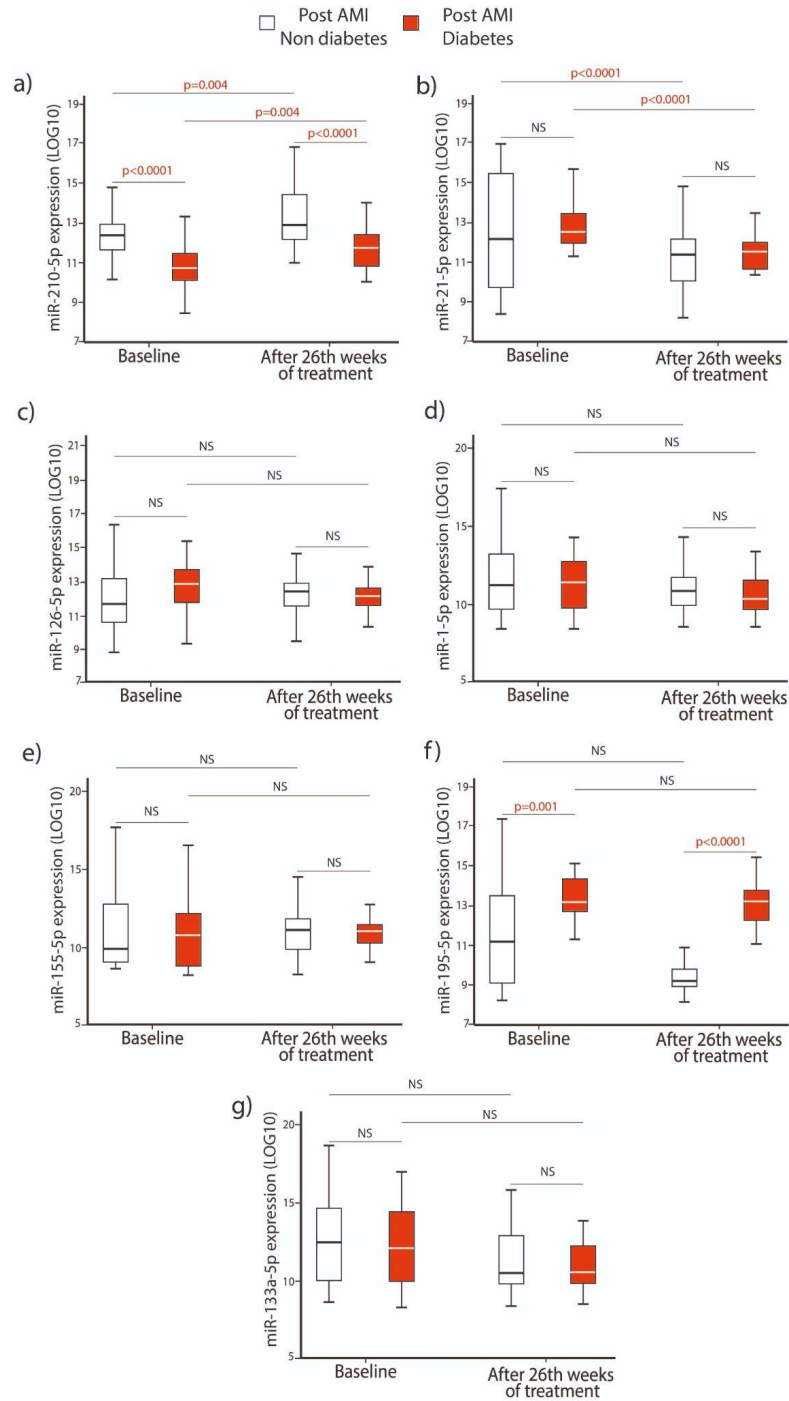
** Wszystkie wyniki ekspresji miRNA przedstawiono jako wartości po transformacji logarytmem dziesiętnym, LOG10.

9.4. Zmiany ekspresji miRNA między punktem wyjściowym a 26 tygodniami leczenia empagliflozyną

Dynamikę zmian poziomów ekspresji badanych cząsteczek miRNA w zdefiniowanych punktach czasowych zilustrowano na **Rycinie 9**. Protokół badawczy obejmował ocenę ekspresji w dwóch punktach: wyjściowo (w ostrej fazie ACS) oraz po 26 tygodniach terapii inhibitorem kotransportera sodowo-glukozowego 2 (SGLT2i) - empagliflozyną.

W okresie 26-tygodniowej obserwacji odnotowano wzrost poziomu ekspresji miR-210-5p w obu analizowanych kohortach, przy czym jego relatywna ekspresja pozostawała znamienne niższa u chorych z współistniejącą T2DM w porównaniu do pacjentów bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej zarówno w punkcie wyjściowym, jak i w punkcie końcowym. W przypadku miR-21-5p zaobserwowano istotną statystycznie redukcję poziomu ekspresji po 26 tygodniach leczenia, wykazaną niezależnie w grupie kontrolnej oraz w grupie z T2DM (w obu kohortach $p < 0,001$). Z kolei ekspresja miR-195-5p była znamienne wyższa u pacjentów z T2DM w obu weryfikowanych punktach czasowych.

Zbiorcza analiza powyższych zależności sugeruje, że profile ekspresji miR-210-5p oraz miR-195-5p wykazują najsilniejsze powiązanie ze statusem metabolicznym pacjentów w okresie po przebytych ACS.



Rycina 9. Wykresy pudełkowe przedstawiają ekspresję miRNA w zależności od obecności T2DM i zmian w czasie a) miR-210-5p; b) miR-21-5p; c) miR-126-5p; d) miR-1-5p; e) miR-155-5p; f) miR-195-5p; g) miR-133a-5p.

Zastosowane skróty: **AMI** (ang. *acute myocardial infarction*, ostry zawał mięśnia sercowego); **LOG10**, (ang. *base-10 logarithm*, logarytm dziesiętny); **NS** (ang. *not significant*, nieistotne).

9.5. Związek miRNA z LVEF $\leq 40\%$.

W kolejnym etapie pracy poddano ocenie powiązanie analizowanych parametrów klinicznych i biochemicznych ze stopniem zaawansowania ACS, gdzie kryterium ciężkiego przebiegu zdefiniowano jako wartość LVEF $\leq 40\%$. Charakterystykę porównawczą chorych w zależności od wyjściowych wartości LVEF zestawiono w **Tabeli 7**. Pacjenci z istotną dysfunkcją skurczową lewej komory serca (LVEF $\leq 40\%$) byli znacząco starsi ($p=0,013$), charakteryzowali się niższym szacowanym współczynnikiem filtracji kłębuszkowej (eGFR, *estimated glomerular filtration rate*; $p=0,015$) oraz istotnie wyższymi wyjściowymi stężeniami N-końcowego propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP; $p=0,038$), kreatyniny ($p=0,004$) oraz troponiny T oznaczanej metodą wysokiej czułości w laboratorium centralnym ($p=0,040$). Istotnie, u chorych z LVEF $\leq 40\%$ odnotowano znacząco wyższą częstość stosowania diuretyków pętlowych w punkcie wyjściowym badania (32% vs 7%; $p=0,002$), co odzwierciedla bardziej zaawansowany stan kliniczny tej podgrupy pacjentów.

Spośród ocenianych cząsteczek miRNA, najsilniejszy związek z ciężkością przebiegu ACS wykazała wyjściowa ekspresja miR-1-5p. U chorych z LVEF $\leq 40\%$ udokumentowano znacząco wyższy wyjściowy poziom ekspresji miR-1-5p w porównaniu do pacjentów z zachowaną lub łagodnie obniżoną funkcją skurczową (LVEF $> 40\%$; $p=0,001$) (**Rycina 11**). Zaobserwowana zależność stanowiła przesłankę do przeprowadzenia w dalszym etapie pracy analizy krzywych ROC (*receiver operating characteristic*) oraz podjęcia próby konstrukcji wielomarkerowego panelu prognostycznego.

Charakterystyka	Ogółem (n=106)	LVEF > 40% (n=84, 79%)	LVEF $\leq 40\%$ (n=22, 21%)	wartość p
Wiek (lata), mediana (IQR)	57.0 (52.8- 65.0)	56.0 (51.0- 63.0)	64.0 (55.0- 70.0)	0.013

Płeć męska, n (%)	82 (80)	64 (76)	18 (82)	0.403
BMI (kg/m2), mediana (IQR)	28.6 (25.8- 30.8)	28.7 (25.4- 31.2)	27.2 (25.9- 29.3)	0.528
Otyłość, n (%)	34 (32)	29 (35)	5 (23)	0.291
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	38 (36)	29 (35)	9 (41)	0.578
Cukrzyca typu 2, n (%)	28 (26)	22 (26)	6 (27)	0.918
Dyslipidemia, n (%)	22 (21)	16 (19)	6 (27)	0.397
Palenie tytoniu (aktualne lub w przeszłości), n (%)	72 (68)	60 (71)	12 (55)	0.131
Choroba wieńcowa, n (%)	15 (14)	10 (12)	5 (23)	0.195
Udar w wywiadzie, n (%)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0.607
Zawał w wywiadzie, n (%)	3 (3)	1 (1)	2 (9)	0.109
Depresja, n (%)	7 (7)	5 (6)	2 (9)	0.598
Nowotwór w wywiadzie, n (%)	6 (6)	3 (4)	3 (14)	0.069
Wynik koronarografii - liczba zajętych naczyń				

Choroba trójnaczyniowa, n (%)	21 (20)	16 (19)	5 (23)	0.700
Choroba dwunaczyniowa	43 (41)	31 (37)	12 (55)	0.134
Choroba jednonaczyniowa	42 (40)	37 (44)	5 (23)	0.069
Leczenie farmakologiczne				
ACE-I/ARB, n (%)	102 (98)	81 (96)	21 (96)	0.473
ARNI, n (%)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0.208
Beta-blokery, n (%)	100 (94)	78 (93)	22 (100)	0.197
MRA, n (%)	46 (43)	35 (42)	11 (50)	0.483
Diuretyk pętlowy, n (%)	13 (12)	6 (7)	7 (32)	0.002
Statyna, n (%)	103 (97)	82 (98)	21 (96)	0.486
Ezetymib, n (%)	21 (20)	16 (19)	5 (23)	0.700
Antagoniści kanałów wapniowych, n (%)	11 (10)	10 (12)	1 (5)	0.314
Leki przeciwplatekcyjne, n (%)	106 (100)	83 (99)	22 (100)	-
Leki przeciwkrzepliwne, n (%)	11 (10)	7 (8)	4 (18)	0.178

Metformina, n (%)	24 (23)	18 (21)	6 (27)	0.560
Inhibitory DPP4, n (%)	5 (5)	4 (5)	1 (5)	0.966
Pochodne sulfonilomocznika, n (%)	2 (2)	1 (1)	1 (5)	0.303
Agoniści receptora GLP-1, n (%)	3 (3)	1 (1)	2 (9)	0.109
Insulina, n (%)	7 (7)	5 (6)	2 (9)	0.598
Parametry laboratoryjne				
NT-proBNP (pg/ml), mediana (IQR)	1198.5 (750.5-2094.5)	1099.5 (722.5-1834.8)	1810.0 (1010.5-3956.0)	0.038
eGFR (mL/min/1.73 m²), mediana (IQR)	91.3 (78.3-99.0)	92.7 (82.0-99.8)	78.3 (74.0-94.8)	0.015
HbA1c (%), mediana (IQR)	5.7 (5.4-6.2)	5.8 (5.4-6.3)	5.6 (5.4-6.1)	0.835
Kreatynina (mg/dl), mediana (IQR)	0.9 (0.8-1.0)	0.9 (0.7-1.0)	1.0 (0.9-1.1)	0.004
Troponina T centralna (ng/L), mediana (IQR)	3051 (2060-5040.5)	2925 (1990.8-4583.3)	4579 (2433-6089.5)	0.040
Hs Troponina (ng/L), mediana (IQR)	3531 (2308.5-5649.5)	3527.5 (2258.5-5534.8)	4244 (2799-7269)	0.195

Cholesterol całkowity (mg/dL), mediana (IQR)	196.0 (172.8-233.3)	197.0 (176.0-235.0)	194.0 (166.0-232.0)	0.090
Cholesterol LDL (mg/dL), mediana (IQR)	127.0 (106.8-159.0)	128.0 (108.0-161.0)	120.0 (88.0-151.0)	0.318
Cholesterol HDL (mg/dL), mediana (IQR)	43.0 (36.0-54.0)	42.0 (35.0-54.0)	45.0 (39.0-55.0)	0.451
Aminotransferaza asparaginianowa (IU/L), mediana (IQR)	225.5 (148.8-317.0)	218.0 (148.0-300.0)	229.0 (175.0-585.0)	0.124
Aminotransferaza alaninowa (IU/L), mediana (IQR)	48.0 (38.0-68.0)	47.0 (38.0-62.0)	65.0 (37.0-85.0)	0.064
Gamma-glutamylotransferaza (IU/L), mediana (IQR)	30.5 (20.0-47.0)	30.0 (20.0-48.0)	36.0 (20.0-46.0)	0.365

Tabela 6. Wyjściowa charakterystyka demograficzna, kliniczna i laboratoryjna w zależności od ciężkości ACS na podstawie LVEF.

Dane przedstawiono jako medianę i zakres międzykwartylowy. Wartość p obliczono za pomocą testu chi-kwadrat dla zmiennych kategorycznych oraz testu U Manna-Whitneya. Zastosowane skróty: **ACE-I**, ang. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*, inhibitory konwertazy angiotensyny; **ARB**, ang. *angiotensin receptor blockers*, blokery receptora angiotensyny; **ARNI**, ang. *angiotensin receptor-neprilysin inhibitors*, inhibitory receptora angiotensyny i neprylizyny; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*, szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej; **GLP-1 RA**, ang. *glucagon-like peptide-1 receptor agonists*, agoniści receptora glukagonopodobnego peptydu 1; **HbA1c**, ang. *glycated hemoglobin A1c*, hemoglobina glikowana A1c; **IQR**, ang. *interquartile range*, rozstęp

międzykwartylowy; **LOG10**, ang. *base-10 logarithm*, logarytm dziesiętny; **miRNA**, ang. *microRNA*, mikroRNA; **MRA**, ang. *mineralocorticoid receptor antagonists*, antagoniści receptora mineralokortykoidowego; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B; **SD**, ang. *standard deviation*, odchylenie standardowe.

* Zamiast testu chi-kwadrat zastosowano dokładny test Fishera.

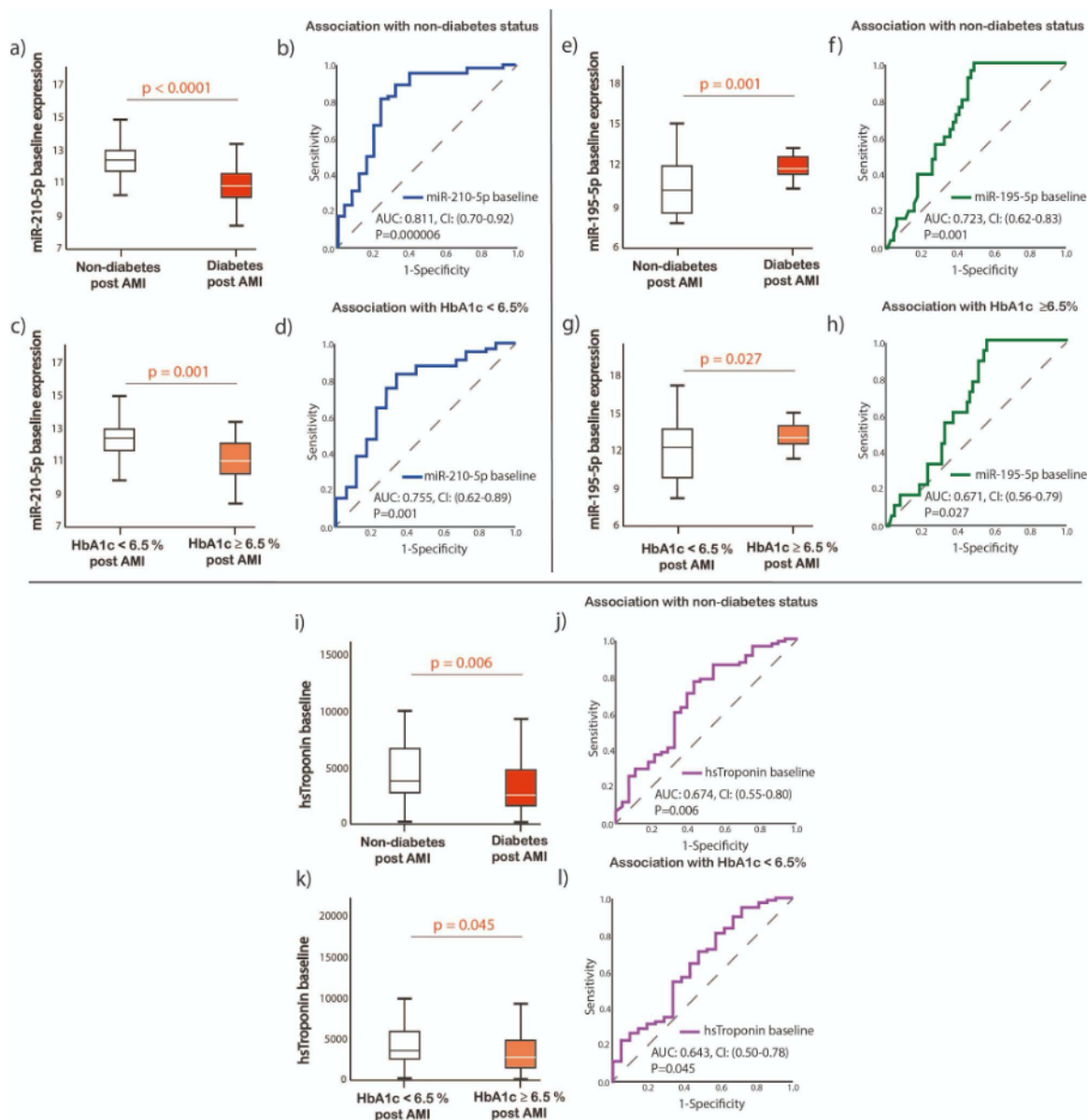
** Wszystkie wyniki ekspresji miRNA przedstawiono jako wartości po transformacji logarytmem dziesiętnym, LOG10.

9.6. Analizy ROC

9.6.1. Analizy ROC dla T2DM i HbA1c $\geq 6,5\%$

Wartość diagnostyczną wyjściowych poziomów ekspresji krążących miRNA w procesie identyfikacji T2DM zweryfikowano za pomocą analizy krzywych ROC. W ocenie potencjału dyskryminacyjnego miR-210-5p, pole pod krzywą (AUC, *area under the curve*) wyniosło 0,811 (95% CI: 0,70-0,92; $p=0,000006$). Wyznaczona metodą indeksu Youdena optymalna wartość odcięcia (*cut-off*) wynosiła 11,552, co pozwoliło na uzyskanie czułości na poziomie 81,0% oraz swoistości wynoszącej 76,0%. W analizie uwzględniającej kryterium odsetka HbA1c $\geq 6,5\%$, wskaźnik AUC dla miR-210-5p wynosił 0,755 (95% CI: 0,62-0,89; $p=0,001$). Dla cząsteczki miR-195-5p wartość AUC w predykcji obecności T2DM wynosiła 0,723, przy punkcie odcięcia równym 12,613, czułości 74,0% i swoistości 59,0%. Ponadto wykazano, że pacjenci spełniający kryterium HbA1c $\geq 6,5\%$ charakteryzowali się znacząco wyższą wyjściową ekspresją miR-195-5p ($p=0,027$).

Oprócz parametrów epigenetycznych, istotne różnice odnotowano w profilu biochemicznym: u chorych z współistniejącą T2DM stwierdzono znacząco niższe wyjściowe stężenia troponiny sercowej o wysokiej czułości (hs-cTn; $p=0,006$). Podobną zależność udokumentowano w podgrupie pacjentów z podwyższonym odsetkiem hemoglobiny glikowanej (HbA1c $\geq 6,5\%$), u których wyjściowe stężenia hs-cTn również były istotnie niższe w porównaniu do grupy z prawidłową glikemią ($p=0,045$).

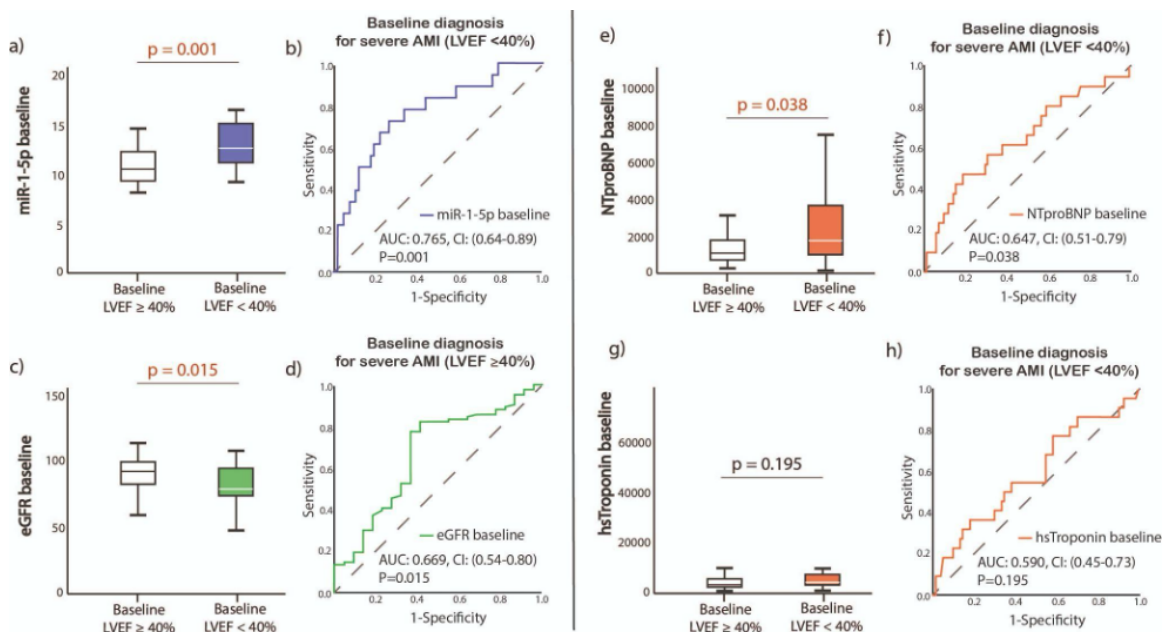


Rycina 10. Zmiany ekspresji miR-210-5p i miR-195-5p oraz ich wartość diagnostyczna oceniona metodą ROC w odniesieniu do T2DM i HbA1c $\geq$ 6,5%. a) wykres pudełkowy dla wyjściowej ekspresji miR-210-5p w zależności od obecności cukrzycy typu 2; b) krzywa ROC dla diagnostycznej użyteczności miR-210-5p; c) wykres pudełkowy dla wyjściowej ekspresji miR-210-5p przy HbA1c < 6,5%; d) krzywa ROC dla miR-210-5p przy HbA1c < 6,5%; e) wykres pudełkowy dla wyjściowej ekspresji miR-195-5p w zależności od obecności cukrzycy; f) krzywa ROC dla diagnostycznej użyteczności miR-195-5p; g) wykres pudełkowy dla wyjściowej ekspresji miR-195-5p przy HbA1c $\geq$ 6,5%; h) krzywa ROC dla miR-195-5p przy HbA1c < 6,5%; i) wykres pudełkowy dla wyjściowej hs-cTn w zależności od obecności T2DM; j) krzywa ROC dla diagnostycznej użyteczności hs-cTn; k) wykres pudełkowy dla wyjściowej hs-cTn przy HbA1c $\geq$ 6,5%; l) krzywa ROC dla hs-cTn przy HbA1c < 6,5%.

Zastosowane skróty: **ACS**, ang. *acute coronary syndrome*, ostry zespół wieńcowy; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*, szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej; **HbA1c**, ang. *glycated hemoglobin A1c*, hemoglobina glikowana A1c; **hs-cTn**, ang. *high-sensitivity cardiac troponin*, wysokoczuła troponina sercowa; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B; **ROC**, ang. *receiver operating characteristic*, charakterystyka operacyjna odbiornika.

9.6.2. Analizy ROC dla LVEF

W ocenie potencjału dyskryminacyjnego badanych parametrów względem zaawansowania ACS (zdefiniowanego jako wartość $LVEF \leq 40\%$), najwyższą efektywnością klasyfikacyjną spośród pojedynczych zmiennych charakteryzowała się wyjściowa ekspresja miR-1-5p (AUC: 0,765; $p=0,001$). Znamiennej wartość prognostyczną w analizie krzywych ROC wykazały również konwencjonalne wskaźniki nefrologiczne i hemodynamiczne: szacowany eGFR (AUC: 0,669; $p=0,015$) oraz stężenie NT-proBNP (AUC: 0,647; $p=0,038$). W przeciwieństwie do powyższych markerów, wyjściowe stężenie hs-cTn nie różnicowało istotnie grup chorych wydzielonych na podstawie kryterium wartości LVEF (AUC: 0,590; $p=0,195$).



Rycina 11. Wyjściowe wykresy pudełkowe i krzywe ROC dla miR-1-5p, eGFR, NT-proBNP oraz hs-cTn w odniesieniu do ciężkości ACS zdefiniowanej jako $LVEF \leq 40\%$
a) wykres pudełkowy dla wyjściowej ekspresji miR-1-5p według ciężkości ACS; **b)** krzywa ROC dla rozpoznawania ciężkiego ACS na podstawie miR-1-5p; **c)** wykres pudełkowy dla wyjściowego eGFR według ciężkości ACS; **d)** krzywa ROC dla rozpoznawania ciężkiego

ACS na podstawie eGFR; **e)** wykres pudełkowy dla wyjściowego NT-proBNP według ciężkości ACS; **f)** krzywa ROC dla rozpoznawania ciężkiego ACS na podstawie NT-proBNP; **g)** wykres pudełkowy dla wyjściowej hs-cTn według ciężkości ACS; **h)** krzywa ROC dla rozpoznawania ciężkiego ACS na podstawie hs-cTn .

Zastosowane skróty: **ACS**, ang. *acute coronary syndrome*, ostry zespół wieńcowy; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*, szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej; **hs-cTn**, ang. *high-sensitivity cardiac troponin*, wysokoczuła troponina sercowa; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B; **ROC**, ang. *receiver operating characteristic*, charakterystyka operacyjna odbiornika.

9.7. Modele wieloczynnikowe

W celu weryfikacji niezależnego powiązania ocenianych zmiennych ze stopniem zaawansowania ACS skonstruowano model wieloczynnikowej regresji logistycznej. Do modelu włączono panel biomarkerów obejmujący podwyższoną wyjściową ekspresję miR-1-5p, obniżone wartości eGFR oraz wysokie stężenia NT-proBNP. Wykazano, że tak zdefiniowany panel wielomarkerowy stanowił silny, niezależny czynnik predykcyjny wystąpienia istotnej dysfunkcji skurczowej lewej komory serca ($LVEF \leq 40\%$) w momencie hospitalizacji (OR 8,04; 95% CI:2,21-29,27; $p=0,002$), po skorygowaniu o wpływ takich zmiennych współtowarzyszących jak wiek, płeć oraz współistnienie T2DM (**Tabela 7**). W analizie wieloczynnikowej niezależny związek z ciężkim przebiegiem ACS wykazało również stosowanie diuretyków pętlowych w punkcie wyjściowym badania (OR 9,03; 95% CI:1,26-64,55; $p=0,028$). Z kolei obecność T2DM nie stanowiła niezależnego predyktora obniżenia wartości $LVEF \leq 40\%$ w tym modelu regresji ($p=0,979$).

Zmienna	OR	95% CI		wartość p
		Dolna granica	Górna granica	
Połączony panel (wysokie miR-1-5p, niskie eGFR, wysokie NT-proBNP) - punkt wyjściowy	8.037	2.207	29.265	0.002

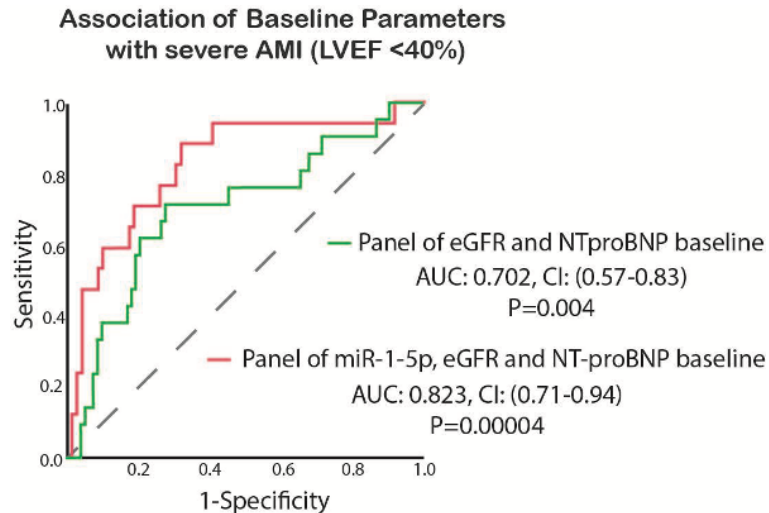
Wiek	1.066	0.991	1.145	0.085
Płeć (mężczyzna)	2.733	0.565	13.206	0.211
Diuretyki pętlowe	9.033	1.264	64.550	0.028
T2DM	1.019	0.251	4.142	0.979

Tabela 7. Wieloczynnikowy model regresji logistycznej służący do przewidywania ciężkości ACS zdefiniowanej jako LVEF $\leq 40\%$ w punkcie wyjściowym.

Zastosowane skróty: **95% CI**, ang. *95% confidence interval*, 95-procentowy przedział ufności; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*, szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B; **OR**, ang. *odds ratio*, iloraz szans; **T2DM**, ang. *type 2 diabetes mellitus*, cukrzyca typu 2.

9.8. Panel wielomarkerowy

W celu optymalizacji stratyfikacji stopnia zaawansowania ACS, poddano ocenie skojarzony panel wielomarkerowy obejmujący podwyższoną wyjściową ekspresję miR-1-5p, obniżone wartości eGFR oraz wysokie stężenia NT-proBNP. W analizie pojedynczych komponentów wartości pola pod krzywą wynosiły odpowiednio: AUC = 0,765 dla miR-1-5p, AUC = 0,669 dla eGFR oraz AUC = 0,647 dla NT-proBNP. Model dwumarkerowy oparty na konwencjonalnych wskaźnikach laboratoryjnych (eGFR + NT-proBNP) charakteryzował się współczynnikiem AUC równym 0,702. Dołączenie poziomu ekspresji miR-1-5p do bazowego panelu (eGFR + NT-proBNP) skutkowało istotną poprawą potencjału dyskryminacyjnego modelu, podnosząc wartość AUC do 0,823 (95% CI: 0,71-0,94; $p=0,00004$). Wyznaczony punkt odcięcia na poziomie 0,204 pozwalał na identyfikację chorych z ciężkim przebiegiem ACS z czułością 65,0% oraz swoistością wynoszącą 83,0%. Powyższe wyniki sugerują, że ocena ekspresji miR-1-5p wykazuje istotną wartość dodaną (incremental value) w diagnostyce i warstwowaniu ryzyka poprawiając zdolność predykcyjną klasycznych parametrów kliniczno-laboratoryjnych.



Rycina 12. Krzywe ROC dla połączonego panelu. Połączony panel parametrów (wysokie miR-1-5p, niskie eGFR, wysokie NT-proBNP) wykorzystano do wyznaczenia wyjściowej krzywej ROC dla ciężkości ACS.

Zastosowane skróty: **AMI**, ang. *acute myocardial infarction*, ostry zawał mięśnia sercowego; **AUC**, ang. *area under the curve*, pole pod krzywą; **CI**, ang. *confidence interval*, przedział ufności; **eGFR**, ang. *estimated glomerular filtration rate*, szacunkowy współczynnik filtracji kłębuszkowej; **LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*, frakcja wyrzutowa lewej komory; **NT-proBNP**, ang. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*, N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B; **p**, ang. *p-value / probability value*, wartość p / poziom istotności statystycznej; **ROC**, ang. *receiver operating characteristic*, charakterystyka operacyjna odbiornika

10. Dyskusja

10.1. Główne wyniki i nowość pracy

Przedstawiona rozprawa dostarcza nowych danych dotyczących roli krążących miRNA u pacjentów po ACS, z uwzględnieniem obecności T2DM, stopnia dysfunkcji lewej komory oraz zmian obserwowanych po 26 tygodniach leczenia preparatem empagliflozyny w dawce 10mg na dobę. Główną wartością pracy jest połączenie trzech perspektyw: analizy biologicznej i bioinformatycznej osi SGLT2/ncRNA, walidacji wybranych miRNA w materiale klinicznym oraz oceny ich przydatności w modelach wielomarkerowych obejmujących klasyczne parametry kliniczno-laboratoryjne.

W części klinicznej wykazano, że **profil wybranych miRNA różni się w zależności od statusu metabolicznego pacjentów po ACS**. Najbardziej jednoznaczne różnice dotyczyły **miR-210-5p i miR-195-5p**. Ekspresja miR-210-5p była istotnie niższa u pacjentów z T2DM, natomiast ekspresja miR-195-5p była istotnie wyższa. Oba biomarkery wykazywały zdolność różnicowania pacjentów z T2DM, przy czym miR-210-5p charakteryzował się wyższą wartością AUC niż miR-195-5p. Wyniki te wskazują, że obecność T2DM po ACS wiąże się z odmienną odpowiedzią molekularną, która nie jest w pełni uchwytna przy użyciu samych parametrów klinicznych i laboratoryjnych.

Połączenie miR-1-5p z eGFR i NT-proBNP poprawiło wartość AUC i pozostawało niezależnie związane z $LVEF \leq 40\%$ w modelu wieloczynnikowym. Ten wynik jest ważny, ponieważ pokazuje, że marker molekularny może uzupełniać klasyczną ocenę kliniczno-laboratoryjną. Panel łączący miRNA z parametrami funkcji nerek i przeciążenia hemodynamicznego może lepiej odzwierciedlać wielowymiarowy charakter ciężkiego ACS niż pojedynczy biomarker [148–150].

Kolejnym, istotnym punktem końcowym badania, była identyfikacja miR-1-5p jako molekularnego wskaźnika powiązanego z niekorzystnym rokowaniem po ACS, manifestującym się istotną dysfunkcją skurczową lewej komory ($LVEF \leq 40\%$). W analizowanej kohorcie pacjenci z tą postacią niewydolności serca charakteryzowali się znamienne wyższą wyjściową ekspresją miR-1-5p, a ocena potencjału diagnostycznego wykazała wyższą wartość AUC dla tego parametru w porównaniu do eGFR oraz NT-proBNP.

Co szczególnie istotne, włączenie miR-1-5p do wieloczynnikowego panelu predykcyjnego (obejmującego eGFR i NT-proBNP) znamienne zwiększyło zdolność identyfikacji chorych obciążonych wysokim ryzykiem wystąpienia $LVEF \leq 40\%$. Ponadto, wdrożony model wielowymiarowy potwierdził, że panel ten pozostaje niezależnie związany z gorszymi konsekwencjami klinicznymi po ACS. Dowodzi to, że ocena poziomu miR-1-5p dostarcza informacji komplementarnych i niezależnych, względem klasycznych biomarkerów uszkodzenia miokardium, przeciążenia hemodynamicznego oraz wydolności filtracyjnej nerek [9,43,52,150].

Oryginalny element tej rozprawy doktorskiej, stanowi także ocena dynamiki zmian ekspresji badanych miRNA pomiędzy ostrą fazą ACS a 26 tygodniem farmakoterapii empagliflozyną. W oznaczonym przedziale czasowym odnotowano istotny wzrost poziomu miR-210-5p przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji miR-21-5p. Warto zauważyć, że pomimo upływu 26 tygodni, różnice w profilach ekspresji miR-210-5p oraz miR-195-5p pomiędzy podgrupami chorych z T2DM i bez T2DM utrzymały swą istotność statystyczną. Uzyskane wyniki sugerują, że wyselekcjonowane cząsteczki miRNA mogą służyć jako czułe wskaźniki odzwierciedlające nie tylko wyjściowy status metaboliczny pacjenta, ale również intensywność dynamicznych procesów naprawczych miokardium, stopień wygaszania kaskady zapalno-włóknieniowej oraz dynamikę pozawałowej przebudowy strukturalnej serca [18,150,151].

10.2. Zgodność wyników z literaturą i interpretacja biologiczna

Uzyskane wyniki wykazują zasadniczą spójność z aktualnymi danymi literaturowymi, wskazującymi na kluczowy udział cząsteczek miRNA w kontroli kaskad patofizjologicznych determinujących przebieg ACS oraz remodeling lewej komory serca: hipoksji, stresu oksydacyjnego, apoptozy, włóknienia, angiogenezy oraz odpowiedzi zapalnej [21,22]. Przeprowadzona w ramach tej rozprawy doktorskiej analiza bioinformatyczna, potwierdziła istnienie ścisłych powiązań topologicznych między badanymi miRNA a wymienionymi procesami biologicznymi. Wśród centralnych punktów wspólnych (węzłów genowych) o najwyższym stopniu powiązania sieciowego zidentyfikowano transkrypty dla takich białek jak TGF- β 1, Bax, Bcl-2, HIF1 α oraz α -SMA. Taka architektura sieci regulacyjnej stanowiła silne uzasadnienie merytoryczne dla

poddania tych konkretnych cząsteczek weryfikacji empirycznej w kohorcie klinicznej [22,150].

Jednocześnie wnioski z przeprowadzonego badania wskazują, że krążące miRNA nie powinny być interpretowane w sposób redukcjonistyczny, jako proste i izolowane wskaźniki pojedynczego procesu biologicznego. Ze względu na swój pleiotropowy charakter, każde z analizowanych miRNA wykazuje zdolność do jednoczesnej modulacji ekspresji licznych genów docelowych i zaangażowania w wiele niezależnych szlaków sygnałowych. W konsekwencji, optymalny potencjał aplikacyjny tych biomarkerów ujawnia się dopiero poprzez połączenie parametrów molekularnych. Oznacza to konieczność ich interpretacji w ścisłej korelacji z profilem klinicznym pacjenta, obejmującym status T2DM, wartość LVEF, współistnienie dysfunkcji nerek, poziom NT-proBNP, a także ocenę ich dynamicznych zmian w czasie [35,148,149].

10.2.1. miR-210-5p jako marker odpowiedzi na hipoksję i zaburzeń metabolicznych

Cząsteczka miR-210 stanowi jeden z najlepiej scharakteryzowanych markerów epigenetycznych zależnych od hipoksji. W dotychczasowych modelach eksperymentalnych, obejmujących zjawisko niedokrwienia oraz uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego (I/R) dowiedziono jej bezpośredni udział w regulacji metabolizmu mitochondrialnego, generowaniu ROS, a także w procesach apoptozy i angiogenezy [137,138,152]. W tym kontekście znamienne niższy poziom ekspresji miR-210-5p, odnotowany w ostrej fazie ACS u chorych z współistniejącą T2DM, można interpretować jako wyraz upośledzonej lub niewystarczającej odpowiedzi adaptacyjnej miokardium na incydent niedokrwienno, w warunkach przewlekłego obciążenia metabolicznego.

Powyższa interpretacja biologiczna, wykazuje spójność z doniesieniami eksperymentalnymi, według których hiperglikemia oraz akumulacja końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs) wywierają efekt supresyjny na ekspresję miR-210, co w konsekwencji nasila stres oksydacyjny i indukuje dysfunkcję mitochondriów [152,153]. W świetle przytoczonych danych, obniżenie poziomu miR-210-5p u pacjentów z T2DM sugeruje zniesienie endogennych mechanizmów cytoprotekcyjnych

zaangażowanych w komórkową adaptację do stanu niedotlenienia. Zjawisko to może odgrywać kluczową rolę w okresie post ACS, kiedy uruchomienie prawidłowych szlaków odpowiedzi na hipoksję, neowaskularyzację oraz stres metaboliczny warunkuje ograniczenie strefy zawału i optymalizację procesów gojenia mięśnia sercowego [137,138].

W analizie długoterminowej wykazano, że poziom ekspresji miR-210-5p uległ istotnemu zwiększeniu po 26 tygodniach obserwacji w obu badanych grupach, aczkolwiek wartości te pozostawały znamienne niższe w podgrupie chorych z T2DM. Prospektywny wzrost ekspresji miR-210-5p w czasie koreluje biochemicznie z przebiegiem procesów naprawczych i angiogennych. Niemniej jednak, z uwagi na brak bezpośredniego porównania z grupą kontrolną przyjmującą placebo, uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne przypisanie tej dynamiki wyłącznie efektowi farmakologicznemu empagliflozyny [18,150].

10.2.2. miR-195-5p jako marker komponentu metaboliczno-naczyniowego

W przedstawionym badaniu wykazano, że poziom ekspresji miR-195-5p był znamienne wyższy w podgrupie chorych z współistniejącą T2DM oraz u osób z wartościami odsetka HbA1c $\geq 6,5\%$. Wynik ten wskazuje, że profil zmian miR-195-5p odzwierciedla przede wszystkim przewlekły komponent dysregulacji metabolicznej, a nie wyłącznie izolowaną odpowiedź na ostre uszkodzenie miokardium. Wykazana umiarkowana wartość AUC w identyfikacji chorych z T2DM sugeruje potencjał aplikacyjny tego markera jako elementu złożonego profilu kardiometabolicznego, aczkolwiek przy jednoczesnym odnotowaniu ograniczonej swoistości diagnostycznej [150,154,155].

Powyższa interpretacja biologiczna, pozostaje w spójności z doniesieniami literaturowymi wskazującymi na bezpośredni udział miR-195 w patogenezie powikłań cukrzycowych, indukowaniu dysfunkcji śródbłoka naczyniowego, upośledzeniu angiogenezy oraz aktywacji szlaków apoptycznych poprzez modulację osi sygnałowych związanych z SIRT1, BCL2 i VEGFA. W warunkach przewlekłej hiperglikemii nadekspresja miR-195 może nasilać uszkodzenie komórek śródbłoka oraz ograniczać potencjał regeneracyjny naczyń, co wywiera istotny wpływ zarówno na rozwój powikłań

mikrokrążeniowych w przebiegu T2DM, jak i na przebieg wczesnej fazy gojenia miokardium po incydencie ACS [156–158].

W analizowanej kohorcie pacjentów miR-195-5p nie stanowił kluczowego parametru w stratyfikacji stopnia dysfunkcji skurczowej lewej komory ($LVEF \leq 40\%$), wykazywał natomiast wysoką zdolność dyskryminacyjną względem obecności T2DM. Sugeruje to, że kinetyka miR-195-5p jest silniej determinowana przez tło metaboliczno-naczyniowe niż przez sam stopień ostrego uszkodzenia strukturalnego serca. Z perspektywy klinicznej marker ten może stanowić istotne uzupełnienie interpretacyjne dla miR-210-5p. W tym ujęciu dwukierunkowy profil zmian manifestujący się obniżeniem ekspresji miR-210-5p przy jednoczesnym wzroście miR-195-5p może odzwierciedlać nakładanie się dwóch odrębnych procesów patofizjologicznych: upośledzonej adaptacji komórkowej do stanu hipoksji oraz przewlekłej dysregulacji naczyniowo-metabolicznej [150,154,156].

10.2.3. miR-21-5p jako marker przebudowy, włóknienia i wygaszania odpowiedzi pozawałowej

Cząsteczka miR-21 należy do najszerzej udokumentowanych markerów epigenetycznych w patologii układu krążenia. W literaturze przedmiotu jej udział wiąże się bezpośrednio z aktywacją fibroblastów, procesami włóknienia narządowego, modulacją odpowiedzi zapalnej, apoptozą oraz indukcją mechanizmów naprawczych stymulowanych uszkodzeniem miokardium[76,81,159]. Rola tego mikroRNA wykazuje jednak znaczny stopień złożoności, zależny od linii komórkowej oraz specyfiki tła patofizjologicznego. W fibroblastach nadekspresja miR-21 stymuluje procesy profibrotyczne i remodelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej, podczas gdy w kardiomiocytach opisywano jej potencjalne działanie cytoprotekcyjne, związane z supresją apoptozy i aktywacją wewnątrzkomórkowych szlaków przeżycia[89,160].

W badanej kohorcie wyjściowy poziom ekspresji miR-21-5p nie wykazał znamiennych różnic w zależności od statusu metabolicznego pacjentów (obecności lub braku T2DM). Niemniej jednak, po 26 tygodniach obserwacji połączonej z farmakoterapią empagliflozyną odnotowano istotne obniżenie poziomu tego biomarkera w obu grupach. Powyższą dynamikę można interpretować jako molekularny wyraz wygasania kaskady

zapalno-włóknieniowej, wykazującej najwyższą aktywność w ostrej i podostrej fazie pozawałowej. Pozostaje to w spójności z doniesieniami z badań podłużnych u chorych po ACS, w których kinetyka miR-21 charakteryzuje się przejściowym wzrostem ekspresji w fazie ostrej incydentu wieńcowego, z następującą, stopniową redukcją wartości w późniejszym okresie obserwacji [43,76].

Spadek poziomu miR-21-5p w 26. tygodniu obserwacji wpisuje się w korzystny, fizjologiczny przebieg procesów gojenia i przebudowy strukturalnej miokardium. W sferze wnioskowania należy jednak unikać bezpośredniego przypisywania tej zmiany wyłącznie interwencji farmakologicznej z użyciem empagliflozyny. Bardziej adekwatna interpretacja wskazuje, że w kohorcie poddanej terapii inhibitorem SGLT2 udokumentowano redukcję ekspresji miR-21-5p jako molekularnego wykładnika włóknienia i zapalenia. Wektor tej modyfikacji jest biologicznie komplementarny z postulowanym mechanizmem kardioprotekcyjnym tej grupy lekowej, aczkolwiek pełna weryfikacja przyczynowo-skutkowa wymaga potwierdzenia w badaniach z randomizacją kontrolowanych placebo [1,18,150].

10.2.4. miR-1-5p jako marker uszkodzenia kardiomiocytów i wczesnej dysfunkcji lewej komory

Cząsteczka miR-1 stanowi specyficzny tkankowo marker epigenetyczny (tzw. mio-miRNA), wykazujący silną ekspresję w miokardium oraz kluczowy udział w regulacji funkcji kardiomiocytów. W licznych doniesieniach literaturowych udokumentowano gwałtowny wzrost stężenia krążącego miR-1 w następstwie ACS, jak również jego bezpośrednie powiązanie z zakresem martwicy komórek mięśnia sercowego, zaburzeniami elektromechanicznymi, homeostazą jonów wapniowych oraz procesem postępującego remodelingu strukturalnego lewej komory [9,18,43,52,161].

W tym kontekście, odnotowany w przedstawionym badaniu podwyższony poziom ekspresji miR-1-5p u pacjentów z istotną dysfunkcją skurczową ($LVEF \leq 40\%$) pozostaje w pełnej zgodności z hipotezą, według której krążące mio-miRNA odzwierciedlają nie tylko sam fakt martwicy miocytów, lecz także stopień oraz głębokość czynnościowego uszkodzenia aparatu kurczliwego serca.

Za szczególnie istotne z aplikacyjnego punktu widzenia należy uznać spostrzeżenie, iż w analizowanym materiale klinicznym miR-1-5p wykazywał wyższą zdolność dyskryminacyjną w identyfikacji chorych z $LVEF \leq 40\%$ niż pojedyncze, klasyczne parametry laboratoryjne, takie jak eGFR czy NT-proBNP. Jednocześnie oznaczenia hs-cTn nie różnicowały znamienne pacjentów w zależności od wartości LVEF. Wynik ten nie implikuje niższej wartości diagnostycznej troponiny w samym algorytmie rozpoznawania ACS, lecz wskazuje, że jej potencjał odnosi się stricte do weryfikacji ostrej nekrozy miokardium. Nie odzwierciedla on natomiast w pełni złożonego fenotypu odległych następstw zawału, manifestujących się spadkiem frakcji wyrzutowej. Cząsteczka miR-1-5p wydaje się w tym ujęciu, czulszym wykładnikiem komponentu czynnościowego i molekularnego stopnia uszkodzenia serca [9,43,150].

Wdrożenie analizy wieloczynnikowej wykazało, że integracja miR-1-5p z eGFR oraz stężeniem NT-proBNP pozwoliła na istotne zwiększenie AUC, a wygenerowany model pozostawał niezależnym predyktorem spadku $LVEF \leq 40\%$. Obserwacja ta ma doniosłe znaczenie poznawcze, udowadnia bowiem, że włączenie parametrów molekularnych może istotnie uzupełniać i optymalizować klasyczną stratyfikację kliniczno-laboratoryjną. Wielomarkerowy panel diagnostyczny - łączący swoiste dla miokardium miRNA z markerem wydolności filtracyjnej nerek oraz wskaźnikiem przeciążenia hemodynamicznego ścian serca - pozwala na zdecydowanie pełniejsze, wielowymiarowe odwzorowanie złożonych konsekwencji klinicznych ACS niż ocena oparta na pojedynczych, izolowanych biomarkerach [148–150].

10.3. Czy dane wspierają efekt empagliflozyny?

Wnioski dotyczące bezpośredniego wpływu empagliflozyny na profile ekspresji badanych miRNA należy interpretować z zachowaniem dużej ostrożności metodologicznej. Analizowana kohorta kliniczna obejmowała wyłącznie pacjentów poddanych farmakoterapii empagliflozyną w stałej dawce 10 mg/dobę, od których materiał biologiczny zabezpieczano w punkcie wyjściowym oraz po 26 tygodniach interwencji. Taki model badawczy, umożliwia precyzyjną charakterystykę kinetyki zmian ekspresji miRNA w czasie, uniemożliwia jednak jednoznaczne i dychotomiczne przypisanie

obserwowanych przesunięć wyłącznie efektowi farmakologicznemu substancji czynnej, co wynika bezpośrednio z braku równoległej grupy kontrolnej przyjmującej placebo [18,150].

Przedstawione dane mogą natomiast stanowić istotne poparcie dla hipotezy, według której stosowanie empagliflozyny przebiega synchronicznie ze zmianami w sygnaturze miRNA, wykazującymi biologiczną spójność z procesami naprawczymi oraz strukturalną przebudową pozawałową. Prospektywna nadekspresja miR-210-5p może wskazywać na częściową rekonstrukcję homeostazy w zakresie odpowiedzi angiogennej i adaptacji do hipoksji, podczas gdy spadek poziomu miR-21-5p może odzwierciedlać molekularne wygaszanie kaskady zapalno-włóknieniowej. Kierunek tych przesunięć epigenetycznych, pozostaje w pełnej zgodności z szeroko opisywanymi w literaturze naukowej plejotropowymi efektami inhibitorów SGLT2, do których zalicza się modulację stresu oksydacyjnego, supresję odczynu zapalnego, optymalizację funkcji mitochondriów oraz ograniczenie włóknienia i programowanej śmierci komórek [1,18,151].

Niemniej jednak, w obecnym schemacie badawczym nie można wykluczyć, że odnotowana dynamika molekularna stanowi w stopniu znaczącym składową naturalnego, ewoluującego w czasie procesu gojenia miokardium po incydencie ACS, efektu optymalizacji standardowego leczenia kardioprotekcyjnego, autoregulacji hemodynamicznej, stabilizacji stanu klinicznego, czy też spontanicznej regresji ostrej odpowiedzi fazy zapalnej. W związku z powyższym, najbardziej rzetelna interpretacja metodologiczna pozwala na sformułowanie wniosku, iż w trakcie 26-tygodniowej obserwacji, połączonej ze stosowaniem empagliflozyny dochodzi do mierzalnych, istotnych statystycznie zmian w profilu ekspresji wyselekcjonowanych miRNA, co jednak nie stanowi definitywnego dowodu na istnienie bezpośredniej zależności przyczynowo-skutkowej pomiędzy podawaniem inhibitora SGLT2 a ekspresją tych cząsteczek [18,162,163].

W perspektywie dalszych analiz, ostateczna weryfikacja specyficznego efektu biologicznego empagliflozyny wymagałaby wdrożenia pełnego protokołu randomizowanego badania klinicznego EMMY, opartego na bezpośrednim porównaniu ramienia terapeutycznego z grupą placebo oraz zaawansowanym modelowaniu matematycznym interakcji wieloczynnikowych typu: czas $\times$ leczenie, leczenie $\times$ T2DM oraz leczenie $\times$ LVEF. Zastosowanie tak zaprojektowanej strategii statystycznej

pozwoilioby na skuteczne odseparowanie naturalnej, pozawałowej dynamiki biomarkerów od zmian indukowanych swoicie przez cząsteczkę inhibitora SGLT2 [18,162].

10.4. Znaczenie kliniczne wyników

Wyniki pracy mają znaczenie kliniczne przede wszystkim w kontekście stratyfikacji ryzyka po ACS. Obecnie podstawą oceny ciężkości i rokowania pozostają parametry kliniczne, obrazowe oraz klasyczne biomarkery, takie jak troponiny, NT-proBNP i eGFR. Przedstawiona praca pokazuje jednak, że krążące miRNA mogą dostarczać dodatkowej informacji biologicznej. MiR-210-5p i miR-195-5p mogą pomagać w identyfikacji metabolicznie odmiennego fenotypu pacjentów z T2DM po ACS, natomiast miR-1-5p może wskazywać na zwiększone ryzyko istotnej dysfunkcji lewej komory [9,13,14,150].

Szczególnie obiecujący jest panel wielomarkerowy obejmujący miR-1-5p, eGFR i NT-proBNP. Połączenie markera molekularnego z parametrem funkcji nerek i markerem przeciążenia serca wpisuje się w założenia medycyny precyzyjnej, w której ocena ryzyka nie opiera się na pojedynczym wskaźniku, lecz na integracji informacji pochodzących z różnych poziomów biologii choroby. Takie podejście może w przyszłości pomóc w identyfikacji pacjentów wymagających intensywniejszego monitorowania, dokładniejszej oceny obrazowej lub bardziej agresywnej optymalizacji leczenia [148–150].

Na obecnym etapie zaawansowania badań uzyskane wyniki nie powinny być implementowane wprost jako gotowy algorytm decyzyjny w rutynowej praktyce klinicznej. Stanowią one jednak silną podbudowę merytoryczną do dalszej walidacji zewnętrznej oraz rozwoju złożonych paneli biomarkerowych. W strukturze takich narzędzi diagnostycznych cząsteczki miRNA spełniałyby funkcję komplementarną i uzupełniającą względem klasycznych markerów biochemicznych, nie dążąc do ich substytucji, lecz do zwiększenia całkowitej siły predykcyjnej modeli prognostycznych [164–166].

10.5. Ograniczenia badania

Kluczowe ograniczenie metodologiczne prezentowanej rozprawy doktorskiej wynikają z jej wtórnego oraz eksploracyjnego charakteru. Przedstawiona analiza została zaprojektowana i przeprowadzona jako biomarkerowe badanie w ramach projektu klinicznego EMMY, w związku z czym nie była poprzedzona odrębną, prospektywną kalkulacją mocy statystycznej i minimalnej liczebności próby dla punktów końcowych opartych na profilach ekspresji miRNA. Ostateczna liczebność analizowanej kohorty wynosiła 106 pacjentów, z czego podgrupy chorych z współistniejącą T2DM (n=28) oraz z istotną dysfunkcją skurczową lewej komory wyrażoną jako $LVEF \leq 40\%$ (n=22) cechowały się relatywnie niską liczebnością. Fakt ten, w sposób oczywisty ogranicza moc statystyczną przeprowadzonych analiz podgrupowych oraz wieloczynnikowych modeli regresyjnych [18,150].

Trudność interpretacyjną stanowiła selekcja materiału biologicznego. Z przyczyn technicznych i logistycznych część próbek osocza nie była dostępna do procedur biologii molekularnej, a pewna pula wyizolowanego RNA nie spełnia rygorystycznych kryteriów jakościowych (skrajnie niska koncentracja lub stopień czystości transkrypcyjnej). Powyższe uwarunkowania generują ryzyko wystąpienia błędu selekcji (ang. selection bias), szczególnie w sytuacji, gdy dostępność lub integralność strukturalna kwasów nukleinowych mogła pozostawać w pośrednim związku ze stanem klinicznym pacjenta w fazie ostrej [18,150].

Następnym ograniczeniem jest brak bezpośredniego porównania z grupą placebo w obecnej analizie biomarkerowej. Chociaż materiał pochodził z badania EMMY, analiza obejmowała pacjentów leczonych empagliflozyną. Z tego powodu zmiany ekspresji miRNA między punktem wyjściowym a 26 tygodniem należy interpretować jako zmiany obserwowane w trakcie leczenia empagliflozyną, a nie jako jednoznacznie udowodniony efekt leku [18].

Kolejne ograniczenie dotyczy liczby punktów czasowych. Analiza obejmowała pomiar w ostrej fazie ACS oraz po 26 tygodniach. Brak pomiarów pośrednich, np. po kilku dniach lub tygodniach, utrudnia ocenę pełnej dynamiki miRNA w fazie ostrej, podostrej i przewlekłej przebudowy pozawałowej [43,69].

Nie bez znaczenia pozostają ograniczenia techniczne i preanalityczne, nieodłącznie związane z technologią ilościowego oznaczania krążących cząsteczek miRNA w płynach ustrojowych. Końcowy wynik analizy molekularnej wykazuje wysoką podatność na zmienność wynikającą z warunków pobierania i przechowywania materiału, stopnia hemolizy krwinek, zróżnicowanej wydajności metod izolacji RNA, strategii normalizacyjnej oraz zmienności międzyoperacyjnych w procedurze qRT-PCR. Choć zastosowanie egzogenego standardu cel-miR-39 (metoda spike-in) pozwoliło na istotną redukcję błędu technicznego, nie eliminuje ono całkowicie wszelkich potencjalnych źródeł zmienności o charakterze przedanalitycznym oraz biologicznym.

Z uwagi na równoległą ocenę kilku cząsteczek miRNA oraz implementację wielu testów statystycznych, wnioskowanie w oparciu o nominalne wartości poziomu istotności p wymaga szczególnej ostrożności. Ze względu na eksploracyjny charakter analizy uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia w niezależnych badaniach. Brak zewnętrznej, niezależnej kohorty walidacyjnej ogranicza możliwość bezpośredniego uogólniania i ekstrapolacji sformułowanych wniosków na całą populację chorych po ACS [150].

Wreszcie, zaprezentowane badanie ma charakter czysto asocjacyjny. Na podstawie uzyskanych korelacji i zależności statystycznych nie jest możliwe potwierdzenie, że analizowane cząsteczki miRNA pełnią funkcję bezpośrednich, przyczynowych mediatorów pozawałowej przebudowy serca lub plejotropowych efektów inhibitora SGLT2. Do pełnej weryfikacji takich mechanizmów niezbędne jest przeprowadzenie zaawansowanych badań funkcyjnych *in vitro* oraz *in vivo* z zastosowaniem syntetycznych mimików, antagomirów (inhibitorów) bądź komórkowych i zwierzęcych modeli niedokrwienia miokardium oraz hiperglikemii [1,22,167].

10.6. Dalsze kierunki badań

W świetle sformułowanych wniosków oraz zidentyfikowanych ograniczeń metodologicznych, wytyczono kilka kluczowych i komplementarnych kierunków przyszłych kierunków badawczych:

Zewnętrzna walidacja kliniczna: pierwotnym i bardzo istotnym krokiem powinno być poddanie uzyskanych wyników procedurze zewnętrznej weryfikacji w niezależnych, wieloośrodkowych kohortach chorych po ACS o znacznie większej liczebności.

Szczególne znaczenie nabiera prospektywne potwierdzenie stabilności i powtarzalności potencjału predykcyjnego miR-210-5p oraz miR-195-5p w identyfikacji specyficznego fenotypu pacjentów z T2DM, a także niezależnej wartości diagnostycznej miR-1-5p i zintegrowanego modelu wielomarkerowego (miR-1-5p/eGFR/NT-proBNP) w stratyfikacji ryzyka rozwoju istotnej dysfunkcji skurczowej lewej komory ($LVEF \leq 40\%$) [150,168].

Pełna implementacja protokołu randomizowanego: kolejny etap powinien w sposób optymalny wykorzystać unikalną architekturę projektu klinicznego EMMY. Przeprowadzenie analizy molekularnej z uwzględnieniem pełnego układu dwuramiennego obejmującego równoległe porównanie kohorty przyjmującej empagliflozynę z grupą placebo pozwoli na definitywne ustalenie, czy odnotowana kinetyka zmian ekspresji miRNA wykazuje swoistość dla interwencji farmakologicznej inhibitorem SGLT2. W sferze statystycznej uzasadnione jest wdrożenie zaawansowanych modeli mieszanych dla danych podłużnych w celu precyzyjnej oceny interakcji wieloczynnikowych, w tym: czas $\times$ leczenie, leczenie $\times$ status kardiometaboliczny (T2DM) oraz leczenie $\times$ wyjściowa wartość LVEF [18,162,163].

Zwiększenie rozdzielczości czasowej oznaczeń: istotną perspektywę stanowi rozszerzenie protokołu o dodatkowe, pośrednie punkty czasowe pobierania materiału biologicznego. Monitorowanie ekspresji miRNA w pierwszych godzinach oraz dobach od incydentu indeksowego, a następnie w sekwencji tygodniowej i miesięcznej, ułatwiłoby precyzyjne odseparowanie wczesnych markerów ostrej nekrozy miocytów od epigenetycznych wykładników wtórnych procesów kaskady zapalnej, neowaskularyzacji, włóknienia oraz przewlekłego, utrwalonego remodelingu strukturalnego miokardium [43,52,76].

Weryfikacja mechanistyczna i funkcjonalna: niezbędne jest równoległe prowadzenie eksperymentalnych badań podstawowych o charakterze mechanicznym. Wykorzystanie zaawansowanych modeli komórkowych (kardiomiocytów, komórek śródbłonna naczyniowego oraz fibroblastów sercowych) poddawanych kontrolowanej stymulacji hiperglikemicznej, hipoksyjnej oraz uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnemu pozwoli na laboratoryjne zobiektywizowanie bezpośredniego wpływu empagliflozyny na transkrypcję miR-210-5p, miR-195-5p, miR-21-5p oraz miR-1-5p. Co

kluczowe, aplikacja syntetycznych mimików (oligonukleotydów sensownych) oraz antagomirów (sekwencji antysensownych) umożliwi określenie, czy badane cząsteczki stanowią jedynie bierne wskaźniki uszkodzenia tkankowego, czy też pełnią funkcję aktywnych mediatorów patofizjologicznych [81,138,156,167].

Multidyscyplinarna integracja danych: przyszłe modele prognostyczne powinny dążyć do integracji profili ekspresji miRNA z zaawansowanymi parametrami klinicznymi i nowoczesnymi technikami obrazowania serca. Zestawienie sygnatur molekularnych z danymi pochodzącymi z rezonansu magnetycznego serca (CMR), oceną odkształcenia miokardium w echokardiografii strain (speckle tracking), pomiarami objętościowymi lewej komory, a także seryjnymi oznaczeniami NT-proBNP i eGFR w korelacji z długoterminowymi twardymi punktami końcowymi (MACE), pozwoli na wygenerowanie wysoce spersonalizowanych algorytmów oceny ryzyka [4,150].

Ocena użyteczności klinicznej i standaryzacja techniczna: wreszcie, ostatecznym warunkiem translacji wyników laboratoryjnych do praktyki medycznej jest krytyczna ocena czysto klinicznej użyteczności proponowanych paneli. Poza klasyczną oceną pola AUC, analizy powinny obejmować wskaźniki poprawy rekasyfikacji ryzyka (NRI, IDI), wpływ na modyfikację decyzji terapeutycznych, opłacalność ekonomiczną (analizy koszt-efektywność) oraz bezwzględną standaryzację i automatyzację procedur laboratoryjnych. Dopiero kompleksowe spełnienie tych kryteriów pozwoli na jednoznaczną ocenę, czy biomarkery oparte na krążących miRNA mogą zostać bezpiecznie i skutecznie zaimplementowane do rutynowych algorytmów diagnostyczno-prognostycznych w kardiologii [164–166].

10.7. Podsumowanie dyskusji

Podsumowując, przedstawiona analiza wskazuje, że krążące miRNA stanowią obiecujące narzędzie integrujące informacje o stanie metabolicznym, uszkodzeniu mięśnia sercowego i przebudowie lewej komory po ACS. MiR-210-5p i miR-195-5p wydają się przede wszystkim odzwierciedlać fenotyp związany z T2DM, natomiast miR-1-5p jest silniej powiązany z ciężkością ACS i istotną dysfunkcją skurczową lewej komory. MiR-21-5p, którego ekspresja zmniejszała się po 26 tygodniach, może odzwierciedlać dynamikę procesów zapalno-włóknieniowych w okresie pozawałowym [22,138,150].

Najważniejszą wartością dodaną pracy jest wykazanie, że panel łączący marker molekularny z klasycznymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi może poprawiać identyfikację pacjentów z LVEF $\leq 40\%$. Dane te wspierają koncepcję wykorzystania miRNA jako elementu medycyny precyzyjnej po ACS. Jednocześnie wyniki dotyczące empagliflozyny należy interpretować ostrożnie: obserwowane zmiany miRNA są zgodne biologicznie z potencjalnym działaniem kardioprotekcyjnym, ale nie dowodzą przyczynowego wpływu leku bez porównania z placebo. Dalsze badania powinny potwierdzić te obserwacje w większych kohortach, w analizach randomizowanych oraz w modelach mechanistycznych [1,18,150].

11. Zakończenie

11.1 Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa doktorska podejmuje aktualny, wielokierunkowy problem kliniczny i biologiczny jakim jest identyfikacja molekularnych mechanizmów oraz biomarkerów epigenetycznych sprzężonych z przebiegiem ACS, współistnieniem T2DM oraz procesem pozawałowej przebudowy strukturalnej LV. Projekt zrealizowano w paradygmacie analizy translacyjnej, integrującej zaawansowaną rekonstrukcję bioinformatyczną osi regulacyjnej SGLT2/ncRNA z oceną empiryczną profilu krążących miRNA w materiale biologicznym zabezpieczonym w ramach randomizowanego kontrolowanego badania EMMY. Przyjęta strategia badawcza umożliwiła sekwencyjne przejście od teoretycznej selekcji cząsteczek kandydackich (opartej na przesłankach systemowych) do ich bezpośredniej weryfikacji w wysoce specyficznej, dobrze scharakteryzowanej klinicznie kohorcie chorych.

Głównym wkładem poznawczym pracy jest wykazanie, że wyselekcjonowane krążące miRNA odzwierciedlają odmienne, komplementarne wymiary patofizjologii okresu pozawałowego. Kinetyka ekspresji miR-210-5p oraz miR-195-5p była determinowana przede wszystkim przez profil kardiometaboliczny badanych pacjentów. Odnotowana w ostrej fazie istotna supresja poziomu miR-210-5p przy jednoczesnej nadekspresji miR-195-5p w podgrupie z T2DM stanowi dowód na to, że współistnienie cukrzycy u chorych po ACS indukuje swoistą dysregulację na poziomie molekularnym. Zmiany te obejmują kluczowe szlaki sygnałowe odpowiedzi na hipoksję, stres

oksydacyjny, dysfunkcję mitochondriów, zaburzenia angiogenezy oraz przewlekłą angiopatię. Ponadto analiza krzywych ROC potwierdziła wysoką przydatność dyskryminacyjną obu tych cząsteczek w identyfikacji zaburzeń gospodarki węglowodanowej, ze szczególnym wskazaniem na wyższą czułość diagnostyczną miR-210-5p.

Najbardziej reprezentatywnym dla medycyny translacyjnej elementem rozprawy jest wykazanie, że integracja miR-1-5p z klasycznymi wskaźnikami kliniczno-laboratoryjnymi istotnie optymalizuje proces identyfikacji chorych obciążonych wysokim ryzykiem rozwoju dysfunkcji skurczowej ($LVEF \leq 40\%$). Złożony panel wielomarkerowy łączący wysoką ekspresję miR-1-5p, obniżoną wartość eGFR oraz podwyższone stężenie NT-proBNP charakteryzował się znamienne wyższą wartością AUC w porównaniu do modeli opartych na pojedynczych parametrach, pozostając niezależnym predyktorem dysfunkcji LV w modelowaniu wieloczynnikowym. Dowodzi to, że biomarkery oparte na krążących miRNA wykazują potencjał komplementarny i powinny być rozpatrywane jako narzędzia uzupełniające, a nie substytuujące standardowe algorytmy diagnostyczne.

Zgromadzone dane empiryczne wpisują się w nowoczesny paradygmat medycyny personalizowanej w kardiologii. Wskazują one, że rutynowa ocena pacjenta po ACS może zostać skutecznie rozbudowana o spektrum informacji molekularnych, bezpośrednio odzwierciedlających status metaboliczny, stopień hipoksji tkankowej oraz intensywność odczynu zapalnego, włóknienia i destrukcji komórek miokardium. Jednocześnie wyniki pracy jasno definiują bariery aplikacyjne, wskazując, że powszechne wdrożenie kliniczne biomarkerów z grupy miRNA wymaga przeprowadzenia zewnętrznej walidacji na niezależnych populacjach chorych, bezwzględnej standaryzacji procedur przedanalitycznych i analitycznych oraz weryfikacji ich ostatecznej skuteczności w prospektywnych modelach stratyfikacji ryzyka.

Reasumując, przedstawiona rozprawa doktorska identyfikuje oś sygnałową SGLT2/ncRNA oraz wybrane krążące cząsteczki miRNA jako istotne, stabilne elementy molekularnej charakterystyki pacjentów w fazie po-ACS. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że miR-210-5p i miR-195-5p są ściśle skorelowane z kardiometabolicznym fenotypem T2DM, miR-21-5p odwzorowuje długofalową dynamikę procesów naprawczo-włóknieniowych, natomiast miR-1-5p posiada kluczowe

znaczenie w predykcji stopnia uszkodzenia LV i rozwoju niewydolności serca. Przedstawiona praca stanowi tym samym merytoryczną i metodologiczną podbudowę pod dalszy rozwój zaawansowanych paneli niefrakcjonowanych biomarkerów służących do monitorowania i prognozowania pozawałowej ewolucji strukturalnej serca.

11.2. Wnioski

1. Oś SGLT2-ncRNA stanowi złożony układ regulacyjny łączący sygnalizację metaboliczną, zapalną, oksydacyjną, profibrotyczną i sercowo-naczyniową. Analiza bioinformatyczna i przeglądowa uzasadniają wybór miRNA jako kandydackich biomarkerów przebudowy pozawałowej i zaburzeń metabolicznych.
2. U pacjentów po ACS obecność T2DM wiąże się z odmiennym profilem ekspresji krążących miRNA. Najbardziej wyraźne różnice dotyczą niższej ekspresji miR-210-5p oraz wyższej ekspresji miR-195-5p u pacjentów z T2DM.
3. MiR-210-5p może być interpretowany jako marker zaburzonej odpowiedzi na hipoksję i stres metaboliczny u pacjentów z T2DM po ACS. Jego wzrost po 26 tygodniach obserwacji sugeruje udział w procesach adaptacyjno-naprawczych, przy utrzymującym się wpływie cukrzycy na ten szlak.
4. MiR-195-5p wydaje się odzwierciedlać przewlekły komponent metaboliczno-naczyniowy związany z T2DM i podwyższonym HbA1c. Jego wyższa ekspresja u pacjentów z cukrzycą wskazuje na potencjalny związek z dysfunkcją śródbłónka, stresem oksydacyjnym, apoptozą i zaburzoną angiogenezą.
5. MiR-21-5p, którego ekspresja istotnie zmniejszała się po 26 tygodniach, może odzwierciedlać wygaszanie procesów zapalno-włóknieniowych i przebudowy mięśnia sercowego w okresie pozawałowym. Ze względu na brak bezpośredniego porównania z placebo, obserwacja ta nie przesądza o przyczynowym wpływie empagliflozyny.
6. MiR-1-5p jest najsilniej związany z ciężkością ACS w badanej kohorcie. Wyższa wyjściowa ekspresja miR-1-5p u pacjentów z LVEF $\leq 40\%$ wskazuje, że cząsteczka ta może odzwierciedlać uszkodzenie kardiomiocytów oraz wczesną dysfunkcję lewej komory.
7. Panel wielomarkerowy obejmujący wysokie miR-1-5p, niskie eGFR i wysokie NT-proBNP poprawia identyfikację pacjentów z LVEF $\leq 40\%$ w porównaniu z pojedynczymi

markerami. Wynik ten potwierdza potencjał integracji biomarkerów molekularnych z klasycznymi parametrami kliniczno-laboratoryjnymi.

8. Obserwowane zmiany ekspresji miRNA w trakcie 26 tygodni leczenia empagliflozyną są biologicznie spójne z potencjalnym działaniem kardioprotekcyjnym inhibitorów SGLT2, ale nie stanowią definitywnego dowodu przyczynowego efektu leku. Do potwierdzenia takiego efektu konieczne są analizy porównawcze z grupą placebo oraz modele uwzględniające interakcję czasu i leczenia.

9. Krążące miRNA mają potencjał jako biomarkery stratyfikacji ryzyka po ACS, jednak ich zastosowanie kliniczne wymaga dalszej walidacji w większych, niezależnych i zróżnicowanych populacjach oraz standaryzacji procedur przedanalizy, izolacji RNA, normalizacji i oznaczeń qRT-PCR.

10. Dalsze badania powinny obejmować prospektywną walidację paneli miRNA, analizę pełnej dynamiki czasowej po ACS, ocenę różnic między STEMI i NSTEMI, porównanie ramienia empagliflozyny z placebo oraz badania funkcjonalne *in vitro* i *in vivo* potwierdzające mechanistyczną rolę zidentyfikowanych miRNA.

11.3. Konkluzja końcowa

Przedstawiona rozprawa potwierdza, że krążące miRNA są obiecującymi markerami integrującymi informacje o stanie metabolicznym, uszkodzeniu mięśnia sercowego i przebudowie lewej komory po ACS. Największą wartość kliniczno-translacyjną ma nie pojedyncze oznaczenie miRNA, lecz ich interpretacja w kontekście fenotypu pacjenta oraz klasycznych parametrów kliniczno-laboratoryjnych. Wyniki pracy wspierają dalszy rozwój biomarkerów opartych na ncRNA jako elementu medycyny precyzyjnej w kardiologii, zwłaszcza u pacjentów z ACS i współistniejącą T2DM.

12. Aneks

Pacjenci z AMI / model zwierzęcy		Gatunek	Badany materiał biologiczny	Zastosowanie	Proces	Typ badania i badana populacja	Piśm.
ekspresja miRNA	ekspresja genu docelowego	A /H	surowica/ osocze		mechanizm komórkowy	grupa badana i grupa kontrolna	-
↑miR-1	↓ <i>KIF1α</i>	H	tkanka serca	T	hipoksja	in vivo and in vitro ludzie: n=23 pacjenci z AMI, n=23 pacjenci bez AMI (tkanka serca)	[51]
↑miR-1	<i>ZNF280c</i> , <i>TCF7</i>	H	tkanka serca	T	hipoksja	in vivo oraz in vitro u ludzi: n = 23 pacjentów z AMI oraz n = 23 pacjentów bez AMI (tkanka serca)	[51]
↑miR-1	↑ <i>UPS</i> , ↑ <i>TGF-β</i> ,	A	tkanka serca	T	apoptoza, włóknienie, LVR	in vivo: model MI u 48 samców myszy C57BL/6. (grupa kontrolna; grupa otrzymująca antagomir	[44]

						miRNA-1; grupa otrzymująca wektor lentiwirusowy miRNA-1; grupa otrzymująca bortezomib)	
↑miR-1	-	H	surowica	D, P	-	in vivo u ludzi: 200 pacjentów z MI oraz 100 zdrowych osób; pacjenci z MI zostali podzieleni na 2 grupy: 1) bez istotnego zwężenia tętnic; 2) poddani pierwotnej PCI z powodu istotnego zwężenia tętnic.	[45]
↑miR-1	-	H	surowica	D	-	in vivo u ludzi: 31 pacjentów z AMI.	[46]
↑miR-1	-	A	surowica	D	-	in vivo u zwierząt: samce szczurów SD z AMI;	[46]

						niedokrwienne kondycjonowanie wstępne - IP; uszkodzenie I/R w AMI.	
↑miR-1	-	A	kardiomiocyty	D	-	in vitro: pierwotne hodowle kardiomiocytów komorowych noworodków szczurów, izolowanych z serc szczurów SD (model martwicy)	[46]
↑miR-1	-	H	tkanka serca	D	-	in vitro u ludzi: próbki autopsyjne: 50 próbek zawałowej tkanki serca ludzkiego oraz strefy granicznej, a także 8 próbek tkanki serca od 8 zdrowych osób.	[49]

↑miR-1	-	H	osocze	D, P	-	in vivo u ludzi: 174 pacjentów z AMI oraz 163 pacjentów bez AMI.	[50]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 33 pacjentów ze STEMI oraz 17 zdrowych osób.	[52]
↑miR-1	-	A	osocze	D	-	in vivo: model MI u samic myszy C57BL/6 (niedokrwienie kończyny tylnej)	[52]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 70 pacjentów z AMI oraz 72 zdrowe osoby.	[53]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 17 pacjentów z AMI oraz 25 zdrowe osoby.	[54]
↑miR-1	-	H	surowica	D	-	in vivo u ludzi: 17 pacjentów z AMI w porównaniu ze 182	[55]

						pacjentami z AP oraz ze 100 zdrowymi osobami.	
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 33 pacjentów z AMI, 16 pacjentów z chorobą wieńcową bez AMI oraz 30 zdrowych osób.	[56]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 115 pacjentów z CKD (67 z NSTEMI, 20 z SA, 7 z UA, 18 z HF oraz 3 z innymi zaburzeniami).	[57]
↓miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 44 zgony z powodu CVD (19 z powodu AMI, 25 z powodu nagłego zgonu sercowego - SCD, 18 z powodu niekardiologicznego zgonu pourazowego).	[42]

↑miR-1	-	H	osocze	D, P	-	in vivo u ludzi: 44 pacjentów z AMI (dzień 4., dzień 9. oraz 6 miesięcy) oraz 18 zdrowych osób.	[43]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 6 pacjentów z CAD, 6 pacjentów ze STEMI z obserwowaną niedrożnością (STEM-pre) oraz 6 pacjentów ze STEMI po reperfuzji (STEMI-PCI).	[47]
↑miR-1	-	H	krew pełna	D, P	-	in vivo post mortem u ludzi: 45 przypadków zgonu sercowego (24 MI, 21 SUD) oraz 5 przypadków kontrolnych (zgon pourazowy).	[48]

↑miR-1	-	H	osocze	D, P	-	in vivo u ludzi: 93 pacjentów z AMI oraz 66 zdrowych osób.	[58]
↑miR-1	-	H	surowica	D	-	in vivo u ludzi: 29 pacjentów z ACS oraz 42 pacjentów bez ACS.	[59]
↓miR-1	-	A	tkanka serca	D	-	in vitro: model MI u samców myszy C57BL/6 (podwiązanie LAD).	[59]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 67 pacjentów z AMI oraz 32 zdrowe osoby.	[60]
↑miR-1	-	A	osocze	D	-	in vivo: świński model MI (podwiązanie LAD).	[61]
↑miR-1	-	H	mocz	D	-	in vivo u ludzi: 25 pacjentów ze STEMI oraz 11 zdrowych osób.	[61]

↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 25 pacjentów ze STEMI oraz 11 zdrowych osób.	[61]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 122 pacjentów z AMI (116 osób, które przeżyły, oraz 6 osób, które nie przeżyły).	[62]
↑miR-1	-	A	osocze	D	-	in vivo: model MI u myszy C57BL/6 (podwiązanie LAD) w porównaniu z myszami poddanymi operacji pozorowanej.	[63]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 18 pacjentów ze STEMI oraz 6 zdrowych osób z grupy kontrolnej.	[63]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 3 pacjentów z AMI oraz 3 pacjentów z CAD (bez ACS).	[64]

↑miR-1	-	A	osocze	D	-	in vivo: model MI u myszy C57BL/6 (podwiązanie LAD) w porównaniu z myszami poddanymi operacji pozorowanej.	[64]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 27 pacjentów ze STEMI, 36 pacjentów z kardiomiopatią Takotsubo (TTC) oraz 28 zdrowych osób z grupy kontrolnej.	[65]
↑miR-1	-	H	surowica	D	-	in vivo u ludzi: 20 pacjentów z AMI oraz 20 zdrowych osób.	[66]
↑miR-1	-	A	mocz	D	-	in vivo: szczurzy model AMI (podwiązanie LAD); szczury poddane operacji pozorowanej stanowiły grupę kontrolną; surowica i mocz	[66]

						(pobrane po 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 3 dniach, 7 dniach oraz 14 dniach po AMI).	
↑miR-1	-	A	surowica	D	-	in vivo: szczurzy model AMI (podwiązanie LAD); szczury poddane operacji pozorowanej stanowiły grupę kontrolną; surowica i mocz (pobrane po 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 3 dniach, 7 dniach oraz 14 dniach po AMI).	[66]
↑miR-1	↓ <i>UCA1</i>	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 49 pacjentów z AMI oraz 15 osób bez AMI (zdrowe osoby).	[66,67]
↓miR-1	-	H	tkanka serca	D	-	in vitro u ludzi: 39 próbek autopsyjnych zawałowej	[68]

						tkanki serca ludzkiego od pacjentów z AMI oraz 11 próbek autopsyjnych tkanki serca od zdrowych osób (zmarłych w wypadkach).	
↑miR-1	↓ <i>HOTAIR</i>	H	osocze	D	apoptoza	in vivo u ludzi: 50 pacjentów z AMI oraz 50 zdrowych osób.	[69]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 444 pacjentów z ACS (117 z UA, 131 ze STEMI, 196 z NSTEMI).	[70]
↑miR-1	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 44 pacjentów z AMI (dzień 4., dzień 9. oraz 6 miesięcy) oraz 18 zdrowych osób.	[43]

↑miR-21	↓ <i>STRN</i> , <i>NOS3</i>	H	sEV pochodzące z krwi obwodowej	T	hipoksja	in vitro u ludzi: sEVs pochodzące z ludzkiej krwi obwodowej (PB-sEVs) w warunkach hipoksji.	[71]
↑miR-21	↑ <i>KBTBD</i> , <i>DA</i> <i>MP</i> , <i>MKK3/6</i>	A	tkanka serca	T	zapalenie,	in vivo: myszy z nokautem MiR-21 (KO) oraz myszy model MI (podwiązanie LAD).	[72]
↑miR-21-5p	-	H	surowica	D	-	pacjenci z AMI w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej.	[73]
↑miR-21	↓ <i>Spry1</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie	in vivo: 67 myszy (22 w grupie sham oraz 45 po przejściu MI).	[74]
↑miR-21	↓ <i>Jagged1</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie	in vivo: model MI u samców szczurów SD (podwiązanie LAD).	[75]

↑miR-21	-	H	surowica	D	zapalenie	184 pacjentów z AMI w porównaniu z grupą kontrolną obejmującą 150 pacjentów.	[76]
↑miR-21	↓ <i>PTEN</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie	in vivo: mysi model MI.	[77]
↑miR-21	-	H	surowica	D	-	in vivo u ludzi: 38 pacjentów z AMI, 27 pacjentów z niestabilną AP oraz 25 osób w grupie kontrolnej.	[78]
↑miR-21	<i>TNF-α, JNK/p38/caspase-3</i>	H	tkanka serca	D	apoptoza	in vitro: ludzkie kardiomiocyty (HCM).	[78]
↑miR-21	↓ <i>PTEN, TNF-α, C6a</i>	A	tkanka serca	D	apoptoza, zapalenie	in vivo: szczurzy model MI (podwiązanie LAD) oraz grupa sham.	[79]

↑miR-21	↓ <i>GAS5</i> , <i>PDCD4</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: szczurzy model MI (podwiązanie LAD) oraz grupa sham.	[80]
↑miR-21	↓ <i>GAS5</i> , <i>PDCD4</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vitro: komórki H9c2 pochodzące z serca szczura.	[80]
↑miR-21	↑ <i>TGF-β/Smad7</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie	in vitro: pierwotne CFs szczurów SD (grupy: mimik miR-21, inhibitor miR-21 oraz kontrola negatywna).	[81]
↑miR-21	-	A	tkanka serca	T	włóknienie	in vivo: myszy model MI (podwiązanie LAD) oraz operacja sham.	[81]
↑miR-21	-	H	tkanka serca	D, P	-	in vivo u ludzi: 40 pacjentów z AMI, 22 pacjentów z niestabilną dusznicą bolesną (UAP) oraz 22 osoby ze zdrowej grupy kontrolnej (HC).	[82]

↑miR-21-5p	<i>PDCD4</i> , <i>HIF1α</i>	A	tkanka serca	T	hipoksja	in vivo: samce szczurów Wistar.	[83]
↓miR-21	↑ <i>siRNA</i> <i>GAS5</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: szczury Sprague Dawley (SD) (AMI wywołano przez podskórne wstrzyknięcie izoproterenolu)	[84]
↑miR-21	-	H	surowica	P	włóknienie, przerost	in vivo u ludzi: 198 pacjentów z AMI, ocenianych 5 dni oraz 1 rok po pierwotnej PCI; podzielonych na grupę LVR (n = 56) oraz grupę bez LVR (n = 142).	[85]
↑miR-21	↓ <i>PTEN</i> / <i>VEGF</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza, prolifracja komórek, angiogeneza	in vivo: szczurzy model MI (podwiązanie LAD); mimiki MiR-21 oraz inhibitory miR-21 wstrzykiwano i transfekowano (transfected)	[86]

						do szczurów modelowych w celu modyfikacji ekspresji miR-21.	
↑miR-21	↓ <i>PTEN/VEGF</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza, proliferacja komórek, angiogeneza	in vitro: szczurze komórki śródbłonna mikrokążenia sercowego (CMECs) oraz mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (BMSCs).	[86]
↑miR-21	↓ <i>Bax, Caspase-3</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: samce myszy C57BL/6: grupa MI, grupa LV-GFP oraz grupa miR-21 (poddane podwiązaniu LAD), a także grupa sham.	[87]
↑miR-21	↑ <i>Bcl-2/ Bax</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: samce myszy C57BL/6: grupa MI, grupa LV-GFP oraz grupa miR-21	[87]

						(poddane podwiązaniu LAD), a także grupa sham.	
↑miR-21	-	H	surowica	P	-	in vivo: 36 pacjentów z AMI (osocze pobrano przy przyjęciu oraz po 24 h, 48 h i 6 dniach).	[88]
↑miR-21	↑ <i>TGFβ1</i> / <i>Smad-3</i> <i>mRNA</i>	A	tkanka serca	P	włóknienie	in vitro: komórki H9C2 eksponowano na hipoksję (traktowanie hipoksją przez 6 h, 24 h, 48 h oraz 72 h); komórki transfekowano inhibitorami i mimikami miRNA.	[88]
↑miR-21	↓ <i>PTEN</i>	A	tkanka serca	T	hipoksja, apoptoza	in vivo: zdrowe dorosłe samce myszy Kunming podzielono na grupy: Sham, MI (podwiązanie LAD), MI + NC, agomiR-21, agomiR-	[89]

						146a, agomiR-21/miR-146a, antagomiR-21/miR-146a, agomiR-21/miR-146a oraz antagomiR-21/miR-146a.	
↑miR-21	↓ <i>p-AKT</i>	A	tkanka serca	T	hipoksja, apoptoza	in vivo: zdrowe dorosłe samce myszy Kunming podzielono na grupy: Sham, MI (podwiązanie LAD), MI + NC, agomiR-21, agomiR-146a, agomiR-21/miR-146a, antagomiR-21/miR-146a, agomiR-21/miR-146a oraz antagomiR-21/miR-146a.	[89]
↑miR-21	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: pacjenci z AMI w porównaniu z pacjentami z dławicą piersiową (AP).	[90]

↑miR-21-5p	-	H	surowica	D	-	in vivo u ludzi: 61 pacjentów ze STEMI w porównaniu ze zdrowymi osobami.	[91]
↑miR-21	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi, dwie kohorty: 1) 17 pacjentów z AMI oraz 28 zdrowych ochotników; 2) 9 pacjentów z AMI, 9 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu, 8 pacjentów z zatorowością płucną oraz 12 zdrowych ochotników.	[92]
↑miR-21	-	H, A	różne typy komórek	D	-	in vitro: w warunkach hipoksji indukowanej chlorkiem kobaltu (CoCl ₂) w komórkach H9c2, komórkach HE, makrofagach (komórki Raw 264.7) oraz neutrofilach	[92]

						krwi obwodowej izolowanych od pacjentów z AMI i zdrowych osób.	
↑miR-21	↓ <i>FAS</i> / <i>HIPK3</i>	A	tkanka serca	T	hipoksja, apoptoza	in vitro: linia komórkowa zarodkowych kardiomiocytów szczura H9C2; 8 grup: kontrolna (CTL), po H/R, H/R + mimik miR-21 (H/R + 21mimic), H/R + negatywna kontrola mimika miR-21 (H/R + 21mimic NC), H/R + inhibitor miR-21 (H/R + 21inhibitor), H/R + negatywna kontrola inhibitora miR-21 (H/R + 21inhibitor NC), H/R + mały interferujący RNA-HIPK3 (H/R + si-HIPK3) oraz H/R +	[92]

						negatywna kontrola siRNA-HIPK3 (H/R + si-NC).	
↑miR-21	↑ <i>TGF-β</i> , ↑ <i>α-SMA</i> , ↑ <i>FAP</i> , ↑ <i>collagen Ia</i> , ↑ <i>IL-1β</i> , ↑ <i>IL-6</i> , ↑ <i>TNF-α</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie, zapalenie	in vivo: model MI u myszy typu dzikiego (WT) oraz myszy z nokautem miR-21 (KO).	[74]
↑miR-21	↑ <i>Spry1</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie, zapalenie	in vitro: pierwotne mysie fibroblasty sercowe (CFs) izolowane od myszy WT oraz myszy z nokautem miR-21 (KO), traktowane angiotensyną II (Ang II) lub siRNA Sprouty1 (<i>Spry1</i>).	[74]

↑miR-21-5p	-	H	osocze	D	LVR	in vivo u ludzi: [z prospektywnego wieloośrodkowego badania REVE-2] 226 pacjentów z AMI (seryjne próbki krwi pobrano w 4 punktach czasowych: wyjściowo, po 1 miesiącu, po 3 miesiącach oraz po 12 miesiącach).	[93]
↑miR-21-5p	-	A	tkanka serca	D	LVR	in vivo: model MI u szczurów Wistar (podwiązanie LAD) oraz grupa sham.	[93]
↑miR-21	↑ <i>TGF-β1</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie	in vitro: mysie fibroblasty sercowe (CFs).	[94]
↑miR-21	-	A	tkanka serca	T	-	in vivo: szczurzy model MI (podwiązanie LAD) oraz dożylne podanie ludzkiej	[95]

						surowiczej CRP (grupa I/R + CRP); grupa sham, grupa z dożylną infuzją CRP (tylko CRP) oraz grupa wyłącznie I/R (tylko I/R)	
↑miR-21	↑ <i>PDCD4</i>	A	tkanka serca	T	-	in vitro: pierwotne hodowle kardiomiocytów komorowych noworodków szczurów, izolowanych z serc szczurów SD.	[96]
↑miR-21	-	H	surowica	P	-	in vivo u ludzi: 96 pacjentów z MI (przypadki śmiertelne n = 36 oraz nieśmiertelne n = 60) oraz zdrowe osoby (n = 99).	[97]
↑miR-21	↓ <i>Treg cells</i> , ↓ <i>foxp3</i> , ↓ <i>TGF-β1</i> ,	H	osocze	P	-	in vivo: pacjenci z CHD: grupa AMI (n = 24), grupa UA (n = 21), grupa stabilnej	[98]

	↓ <i>smad7</i> , ↓ <i>TGF-β</i>					dławicy piersiowej (SA) (n = 24), w porównaniu z pacjentami z zespołem bólu w klatce piersiowej (CPS, n = 27).	
↑miR-21	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 44 pacjentów z AMI (dzień 4., dzień 9. oraz 6 miesięcy) oraz 18 zdrowych osób.	[43]
↑miR-34a	↓ <i>bcl2</i>	A	tkanka serca	T	hipoksja	in vivo: szczury; szczegółowa ocena rozległości MI za pomocą barwienia błękitem Evansa/TTC.	[99]
↑miR-34a	↓ <i>bcl2</i>	A	cardiomyocytes	T	hipoksja	in vitro: kardiomiocyty H9c2 ekspozowane na stymulację hipoksją/reoksygenacją (H/R).	[99]

↑miR-34a-5p	↓ <i>NOTCH</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza, stres oksydacyjny,	in vivo: szczurze modele uszkodzenia I/R mięśnia sercowego.	[100]
↑miR-34a-5p	↓ <i>NOTCH</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza, stres oksydacyjny,	in vitro: kardiomiocyty H9C2 ekspozowane na model uszkodzenia I/R (stymulacja hipoksją/reoksygenacją (H/R)).	[100]
↑miR-34a	<i>SIRT1, p53, Bcl-2, Bax</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: szczurzy model MI (uszkodzenie I/R indukowane poprzez wytworzenie u szczurów warunków naśladujących skutki uszkodzenia I/R w sercu).	[101]
↑miR-34a	↑ <i>TGF-β1</i> , ↑ <i>Smad4</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie	in vivo: myszy model MI (podwiązanie LAD),	[102]

						obejmujący iniekcje do żyły ogonowej antagomiru-34a (Ant-miR34a, grupa badana) lub antagomiru kontrolnego (Ant-Cont, grupa kontrolna).	
↑miR-34a	-	H	surowica	T	-	in vivo u ludzi: 15 pacjentów z AMI (próbki pobrano w ciągu 24 godzin od rozpoznania) oraz 15 zdrowych osób (grupa kontrolna).	[103]
↑miR-34a	↓ <i>ALDH2</i>	A	kardiomiocyty	T	apoptoza	in vitro: szczurzy model MI (podwiązanie LAD; środowisko hipoksji).	[103]
↓miR-34a	↓ <i>Lc3-II</i> , ↓ <i>p62</i> , ↓ <i>TNFα</i>	A	kardiomiocyty	T	autofagia	in vitro: kardiomiocyty noworodków szczurów (NRCMs) izolowane od	[104]

						szczurów SD (środowisko hipoksji).	
↓miR-34a	↑ <i>bcl-2</i> , ↑ <i>bax</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: 24 szczury SD podzielone na dwie grupy: grupę sham (n = 12) oraz grupę modelową (n = 12).	[105]
↑miR-34	-	H	osocze	P	LV remodeling	in vivo u ludzi: 359 pacjentów z AMI, podzielonych na grupę z remodelingiem LV oraz grupę bez remodelingu LV (2 punkty czasowe: wyjściowo oraz po 6 miesiącach).	[106]
↑miR-34a	↓ <i>sirt1</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: model MI u myszy C57BL/6 (podwiązanie LAD), podzielony na grupy: sham, IR, IR AAV-vector oraz IR AAV-Peg13.	[107]

↑miR-126-5p	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 29 pacjentów z AMI (15 ze STEMI oraz 14 z NSTEMI) oraz 21 zdrowych dorosłych osób (bez AMI).	[108]
↑miR-126-3p	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 27 pacjentów z AMI oraz 30 zdrowych osób (grupa Ctl).	[109]
↑miR-126-3p	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 100 pacjentów ze STEMI, w tym 51 pacjentów z AMI z całkowitą okluzją tętnicy odpowiedzialnej za zawał (IR-ATO), 49 pacjentów z AMI z rekanalizacją naczynia krwionośnego odpowiedzialnego za zawał (IR-BVR) oraz 50 zdrowych osób.	[73]

↓miR-126-5p	↑ <i>IL-17A</i>	H	surowica	D	zapalenie	in vivo u ludzi: 40 pacjentów z AMI oraz 40 zdrowych osób.	[110]
↓miR-126	↑ <i>VEGF-A</i>	A	komórki mezenchymalne szpiku kostnego (BMSCs)	T	angiogeneza	in vitro: model MI u szczurów SD, z którego izolowano mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (BMSCs) (2 grupy: jedna grupa była kotransfekowana kombinacją 200 ng reportera lucyferazowego pGL3-control, 10 ng wektora pRL-TK oraz wektora miR-126, natomiast w drugiej grupie wektor miR-126 zastąpiono wektorem kontroli negatywnej).	[111]

↓miR-126-3p	-	H	surowica	D	-	in vivo u ludzi: 4 grupy: osoby kontrolne bez CAD, pacjenci ze stabilną dławicą piersiową (SAP), pacjenci z niestabilną AP (UAP) oraz pacjenci z MI (MI; n = 36).	[112]
↓miR-126	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 17 pacjentów z AMI oraz 25 zdrowych osób.	[54]
↑miR-126-5p	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 16 pacjentów z AMI oraz 6 osób z grupy kontrolnej bez AMI.	[113]
↓miR-126	-	H	osocze	D,P	-	in vivo u ludzi: grupa kontrolna (n = 14), MI z prawidłową EF (MI + NEF, n = 13) oraz MI z niską EF (MI + LEF, n = 16).	[114]

↑miR-126	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 17 pacjentów z AMI oraz 17 zdrowych osób.	[115]
miR-126-3p	-	H	osocze	D	-	in vivo: grupa eksploracyjna: 8 pacjentów z AMI oraz 8 zdrowych osób; grupa walidacyjna: 31 pacjentów z AMI oraz 31 zdrowych osób.	[116]
↑miR-133	-	H	-	D	-	in vivo u ludzi: 746 pacjentów z AMI (ze STEMI) oraz zdrowe osoby.	[117]
↑miR-133	↑ <i>SIRT3</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo i in vitro: model MI u 90 samców szczurów Wistar (podwiązanie LAD) oraz nanocząstki RGD-PEG-PLA/miR-133 podawane we wstrzyknięciu do żyły ogonowej.	[118]

↓miR-133	↓ <i>AMPK</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo i in vitro: model MI u 90 samców szczurów Wistar (podwiązanie LAD) oraz nanocząstki RGD-PEG-PLA/miR-133 podawane we wstrzyknięciu do żyły ogonowej.	[118]
↑miR-133	-	H	-	D	-	in vivo: 150 pacjentów z AMI oraz 50 osób z grupy kontrolnej bez AMI.	[119]
↓miR-133	↓ <i>TGF-β1</i> , ↓ <i>CTGF</i> , <i>coll</i> , <i>col3</i> , <i>α-SMA</i>	A	tkanka serca	T	włóknienie, odkładanie kolagenu	in vivo: model MI u 60 samców szczurów SD (podwiązanie LAD), podzielonych na 3 grupy: grupa operacji sham, grupa kontrolna oraz grupa z upregulacją miR-133a.	[120]

↑miR-133	↓ <i>NLPR3</i>	A	tkanka serca	T	hipoksja, apoptoza	in vivo u szczurów: 10-tygodniowe samce szczurów Wistar po 24 h od operacji sham w grupie Sham (n = 9) oraz w grupie MI (podwiązanie tętnicy wieńcowej, n = 9).	[121]
↑miR-133	↓ <i>NLPR3</i>	A	kardiomiocyty	T	hipoksja, apoptoza	in vitro: szczurza tkanka sercowa.	[121]
↓miR-133	-	A	tkanka serca	T	-	in vivo: tkanka neuronalna; 35 myszy C57/BL6 wykorzystano do wytworzenia zwierzęcych modeli MI, a 10 myszy włączono do grupy kontrolnej; 4 grupy: 28 myszy transfekowano adenowirusem przenoszącym miRNA-133, a 18 myszy	[121]

						podzielono na grupę z pustym wektorem wirusowym oraz grupę modelową MI.	
↑miR-133	-	H	osocze	D, P	-	in vivo u ludzi: 102 pacjentów z AMI, 120 pacjentów z bólem w klatce piersiowej bez AMI oraz 110 zdrowych osób (grupa kontrolna).	[122]
↑miR-133	-	H	osocze	D, P	-	in vivo u ludzi: 75 pacjentów z AMI (25 przypadków STEMI, 51 NSTEMI) oraz 110 pacjentów bez AMI (definiowanych jako brak wzrostu stężenia troponiny oraz brak uniesienia odcinka ST).	[123]

↑miR-133	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 13 pacjentów z AMI oraz 27 zdrowych osób (grupa kontrolna).	[124]
↑miR-133	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 51 pacjentów z AMI [24 h (n = 51) oraz 7 dni (n = 6) po wystąpieniu objawów AMI] oraz 28 zdrowych osób (grupa kontrolna).	[124]
↑miR-133	-	H	osocze	P	-	in vivo u ludzi: 246 pacjentów z MI (seryjne próbki krwi pobrano przy wypisie, tj. od 3. do 7. dnia, oraz po 1, 3 i 12 miesiącach po MI).	[125]
↑miR-133	↑ <i>CDK13</i>	H	tkanka serca	T	-	in vivo i in vitro u ludzi: 23 pacjentów z AMI oraz 23	[51]

						pacjentów bez AMI (tkanka serca).	
↑miR-133	-	H	surowica	D	-	in vivo u ludzi: 29 pacjentów z ACS oraz 42 pacjentów bez ACS.	[59]
↓miR-133	-	H	tkanka serca	D	-	in vitro: model MI u samców myszy C57BL/6 (podwiązanie LAD).	[59]
↑miR-133	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 27 pacjentów ze STEMI, 36 pacjentów z kardiomiopatią Takotsubo (TTC) oraz 28 zdrowych osób z grupy kontrolnej.	[65]
↓miR-133	-	H	tkanka serca	D	-	in vitro u ludzi: 39 próbek autopsyjnych zawałowej tkanki serca ludzkiego od pacjentów z AMI oraz 11 próbek autopsyjnych tkanki	[68]

						serca od zdrowych osób (zmarłych w wypadkach).	
↑miR-133a	-	H	osocze	D, P	-	in vivo u ludzi: 444 pacjentów z ACS (117 z UA, 131 ze STEMI oraz 196 z NSTEMI).	[70]
↑miR-155	↓ <i>QKI</i>	A	kardiomiocyty	T	apoptoza	in vitro: kardiomiocyty komorowe noworodków szczurów (NRVMs) traktowane H ₂ O ₂ .	[126]
↑miR-155	↓ <i>Bax</i> , ↓ <i>cleaved-caspase-3</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: model MI u samców myszy Kunming.	[126]
↑miR-155	↑ <i>Bcl-2</i> , ↑ <i>XIAP</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo: model MI u samców myszy Kunming.	[126]
↑miR-155	-	H	surowica	D	zapalenie	in vivo u ludzi: 18 pacjentów z AMI (wyjściowo oraz po	[127]

						19,2 ± 5,9 tygodniach) oraz 18 zdrowych osób.	
↑miR-155	-	H	surowica	P	zapalenie	pacjenci z AMI w porównaniu ze zdrowymi osobami.	[128]
↓miR-155	-	H	osocze	P	apoptoza	pacjenci z AMI w porównaniu z pacjentami z dławicą piersiową oraz zdrowymi osobami.	[129]
↑miR-155-5p	↑ <i>NEDD4/Cy pD</i>	A	surowica	T	apoptoza	myszy z uszkodzeniem I/R	[130]
↑miR-155	↑ <i>SOCS1/nuclear factor-κB pathway</i>	A	tkanka serca	T	hipoksja, zapalenie	in vivo: model MI u myszy C57BL/6 oraz grupa sham.	[131]
↑miR-155	↓ <i>Cx43</i>	A	kardiomiocyty	T	apoptoza	in vitro: kardiomiocyty noworodków szczurów	[131]

						(NRCMs) eksponowane na hipoksję.	
↑miR-155	↓ <i>Cx43</i>	A	kardiomiocyty	T	apoptoza	in vitro: kardiomiocyty noworodków szczurów (NRCMs) eksponowane na hipoksję.	[131]
↑miR-155	↓ <i>TP53INP1</i>	A	tkanka serca	T	apoptoza	in vivo u myszy: zwierzęcy model AMI indukowany przez podwiązanie LAD; myszy miR-155 AA (knockout) oraz myszy miR-155 thth (nadekspresja), w porównaniu z myszami typu dzikiego (WT).	[132]
↑miR-155	↓ <i>TP53INP1</i>	A	kardiomiocyty	T	apoptoza	in vitro: pierwotne fibroblasty sercowe noworodków myszy miR-155	[132]

						AA, pochodzące od myszy WT C57BL/6J.	
↑miR-155	↓ <i>SOCS-1</i>	A	mocz	D	stres oksydacyjny, zapalenie,	in vivo u szczurów: samce szczurów Sprague-Dawley losowo przydzielono do dwóch grup (n = 6): sham oraz I/R poprzez podwiązanie LAD (n = 6).	[133]
↑miR-155	↓ <i>SOCS-1</i>	A	tkanka serca	D	stres oksydacyjny, zapalenie,	in vivo u szczurów: szczury SD podzielono na grupę modelu MI (podwiązanie LAD; n = 6) oraz grupę sham (n = 6).	[133]
↑miR-155	-	H	surowica	P	-	in vivo u ludzi: 40 pacjentów z AMI (grupa zgonu sercowego, n = 19; grupa przeżycia, n = 21).	[134]

↑miR-155	-	H	surowica	D, P	-	in vivo u ludzi: 20 pacjentów z AMI (2. dzień, 5. dzień oraz 6 miesięcy po MI), podzielonych na grupę z remodelingiem LV i grupę bez remodelingu LV, oraz 8 zdrowych osób.	[128]
↓miR-155	-	H	osocze	D	-	stężenia miR-155 były niższe w grupach AMI i AP w porównaniu z grupą CT, przy czym najniższe stężenia obserwowano w grupie AMI.	[129]
↑miR-195	-	H	osocze	D	-	in vivo u ludzi: 18 pacjentów z AMI oraz 30 zdrowych osób.	[135]
↑miR-195	-	H	kardiomiocyty	D	-	in vitro u ludzi: ludzkie komórki AC16 o fenotypie kardiomiocytopodobnym.	[136]

↓miR-210	↑ <i>GPD2</i>	A	tkanka serca	T	mitochondrial stres oksydacyjny	in vivo: heterozygotyczne myszy na tle genetycznym C57BL/6J.	[137, 138]
↓miR-210	<i>Efan3, Ptp1b</i>	A	kardiomiocyty	T	angiogeneza, apoptoza	in vitro: kardiomiocyty mysie linii HL-1	[137]
↓miR-210	<i>Dapk1</i>	A	kardiomiocyty	T	cell cycle, apoptoza, metastasis	in vitro: kardiomiocyty mysie linii HL-1	[137]
↓miR-210	<i>Ctgf</i>	A	kardiomiocyty	T	Fibrosis, angiogeneza, chondrogenesis, osteogenesis, tissue repair, cancer	in vitro: kardiomiocyty mysie linii HL-1	[137]
↓miR-210-3p	↑ <i>Rian/miR-210-3p/Nfkb1</i>	A	kardiomiocyty	T	apoptoza, hipoksja	in vitro: kardiomiocyty szczurze linii H9c2 (poddane działaniu hipoksji)	[139]

↓miR-210-3p	<i>EFNA3</i>	H	HUVEC	T	angiogeneza, apoptoza	in vitro u ludzi: HUVECs (EVs z hUCMSCs kondycjonowanych mononukleotydem nikotynamidu - N-EVs; EVs z hUCMSCs M-EVs).	[140]
↑miR-210-3p	↑ <i>HGF</i>	A	tkanka serca	T	angiogeneza, remodeling	in vivo: model MI u szczurów SD (n = 48; podwiązanie LAD), podzielonych na 4 grupy: n = 12 poddanych operacji sham; n = 7 z AMI oraz leczeniem wektorem kontroli negatywnej (AMI + NV); n = 8 szczurów z AMI; n = 9 z AMI oraz leczeniem agonistą miRNA-210 podawanym za pośrednictwem lentiwirusa	[141]

						(AMI + LV-miR-210 agonista).	
↑miR-210-3p	↑ <i>CD31</i> , ↑ <i>HGF</i>	H	HUVEC	T	angio-geneza	in vitro: komórki HUVECs hodowane w warunkach hipoksji	[141]
↑miR-210	↓ <i>HIF1α</i> ,	H	tkanka serca	T	hipoksja	in vivo i in vitro u ludzi: n = 23 pacjentów z AMI oraz n = 23 pacjentów bez AMI (tkanka serca).	[51]
↑miR-210	<i>RUNX3</i>	H	tkanka serca	T	hipoksja	in vivo i in vitro u ludzi: n = 23 pacjentów z AMI oraz n = 23 pacjentów bez AMI (tkanka serca).	[51]
↑miR-210	↓ <i>HIF1α</i> ,	A	tkanka serca	T	hipoksja	in vitro: MI u myszy C57BL/6 (podwiązanie LAD).	[51]

Tabela 8. Badania in vitro, na zwierzętach i u ludzi oceniające rolę analizowanych miRNA

*↓/↑ oznacza obniżenie/podwyższenie ekspresji w modelu ostrego zawału mięśnia sercowego w porównaniu z modelem kontrolnym.

Zastosowane skróty: **A**, ang. *animal*, zwierzę / model zwierzęcy; **ACS**, ang. *acute coronary syndrome*, ostry zespół wieńcowy; **AKT** / **p-AKT**, ang. *protein kinase B / phosphorylated AKT*, kinaza białkowa B / ufosforylowana AKT; **ALDH2**, ang. *aldehyde dehydrogenase 2*, dehydrogenaza aldehydowa 2; **AMI**, ang. *acute myocardial infarction*, ostry zawał mięśnia sercowego; **AMPK**, ang. *AMP-activated protein kinase*, kinaza białkowa aktywowana AMP; **Ang II**, ang. *angiotensin II*, angiotensyna II; **AP**, ang. *angina pectoris*, dławica piersiowa; **Bax**, ang. *BCL2-associated X protein*, białko X związane z BCL2; **Bcl-2**, ang. *B-cell lymphoma 2*, białko chłoniaka z komórek B 2; **BMSCs**, ang. *bone marrow mesenchymal stem cells*, mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego; **CAD**, ang. *coronary artery disease*, choroba wieńcowa; **Caspase-3**, ang. *caspase-3*, kaspaza 3; **CD31**, ang. *cluster of differentiation 31*, marker różnicowania CD31; **CDK13**, ang. *cyclin-dependent kinase 13*, kinaza zależna od cyklin 13; **CFs**, ang. *cardiac fibroblasts*, fibroblasty sercowe; **CHD**, ang. *coronary heart disease*, choroba niedokrwienna serca / choroba wieńcowa; **CKD**, ang. *chronic kidney disease*, przewlekła choroba nerek; **CMECs**, ang. *cardiac microvascular endothelial cells*, komórki śródbłónka mikrokrażenia sercowego; **CPS**, ang. *chest pain syndrome*, zespół bólu w klatce piersiowej; **CRP**, ang. *C-reactive protein*, białko C-reaktywne; **CT**, ang. *control*, kontrola / grupa kontrolna; **CTGF**, ang. *connective tissue growth factor*, czynnik wzrostu tkanki łącznej; **CTL**, ang. *control*, kontrola; **CVD**, ang. *cardiovascular disease*, choroba sercowo-naczyniowa; **Cx43**, ang. *connexin 43*, koneksyna 43; **CypD**, ang. *cyclophilin D*, cyklofilina D; **D**, ang. *diagnostic*, zastosowanie diagnostyczne; **DAMP**, ang. *damage-associated molecular pattern*, wzorzec molekularny związany z uszkodzeniem; **Dapk1**, ang. *death-associated protein kinase 1*, kinaza białkowa 1 związana ze śmiercią komórki; **EF**, ang. *ejection fraction*, frakcja wyrzutowa; **EFNA3** / **Efan3**, ang. *ephrin A3*, efryna A3; **EVs**, ang. *extracellular vesicles*, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe; **FAP**, ang. *fibroblast activation protein*, białko aktywacji fibroblastów; **FAS**, ang. *Fas cell surface death receptor*, receptor śmierci komórkowej Fas; **Foxp3**, ang. *forkhead box P3*, czynnik transkrypcyjny Foxp3; **GAS5**, ang. *growth arrest-specific 5*, transkrypt GAS5 związany z zatrzymaniem wzrostu; **GPD2**, ang. *glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2*, dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa 2; **H**, ang. *human*, człowiek / badanie u ludzi; **H/R**, ang. *hypoxia/reoxygenation*, hipoksja/reoksygenacja; **H9c2** / **H9C2**, ang. *H9c2 cardiomyoblast cell line*, linia komórkowa kardiomioblastów szczura H9c2; **HC**, ang. *healthy control*, zdrowa grupa kontrolna; **HCM**, ang. *human cardiomyocytes*, ludzkie kardiomiocyty; **HE**, ang. *human endothelial cells*, ludzkie komórki śródbłónka; **HF**, ang. *heart failure*, niewydolność serca; **HGF**, ang. *hepatocyte growth factor*, czynnik wzrostu hepatocytów; **HIF1α** / **HIF-1α**, ang. *hypoxia-inducible factor 1 alpha*, czynnik indukowany hipoksją 1 alfa; **HIPK3**, ang. *homeodomain-interacting protein kinase 3*, kinaza białkowa 3 oddziałująca z homeodomeną; **HOTAIR**, ang. *HOX transcript antisense RNA*, antysensowny RNA transkryptu HOX; **hUCMSCs**, ang. *human umbilical cord mesenchymal stem cells*, ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pępowiny; **HUVECs**, ang. *human umbilical vein endothelial cells*, ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej; **I/R**, ang. *ischemia/reperfusion*, niedokrwienie/reperfuzja; **IL-1β**, ang. *interleukin-1 beta*, interleukina 1 beta; **IL-6**, ang. *interleukin-6*, interleukina 6; **IL-17A**, ang. *interleukin-17A*, interleukina 17A; **IP**, ang. *ischemic preconditioning*, niedokrwienne kondycjonowanie

wstępne; **IR**, ang. *ischemia/reperfusion* lub *infarct-related*, niedokrwienie/reperfuzja lub związany z zawałem - zależnie od kontekstu; **IR-ATO**, ang. *infarct-related artery total occlusion*, całkowita okluzja tętnicy odpowiedzialnej za zawał; **IR-BVR**, ang. *infarct-related blood vessel recanalization*, rekanalizacja naczynia odpowiedzialnego za zawał; **Jagged1**, ang. *Jagged canonical Notch ligand 1*, ligand Notch Jagged1; **JNK**, ang. *c-Jun N-terminal kinase*, kinaza N-końcowa c-Jun; **KBTD7**, ang. *kelch repeat and BTB domain-containing protein 7*, białko 7 zawierające powtórzenia Kelch i domenę BTB; **KIF1a**, ang. *kinesin family member 1A*, członek rodziny kinezyn 1A; **KO**, ang. *knockout*, nokaut genu; **LAD**, ang. *left anterior descending artery*, gałąź przednia zstępująca lewej tętnicy wieńcowej; **LC3-II / Lc3-II**, ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3-II*, forma II lekkiego łańcucha 3 białka 1 związanego z mikrotubulami; **LEF**, ang. *low ejection fraction*, niska frakcja wyrzutowa; **LV**, ang. *left ventricle*, lewa komora serca; **LV-GFP**, ang. *lentiviral green fluorescent protein vector*, wektor lentiwirusowy z białkiem GFP; **LVR**, ang. *left ventricular remodeling*, remodeling lewej komory; **M-EVs**, ang. *modified extracellular vesicles*, modyfikowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe; **MI**, ang. *myocardial infarction*, zawał mięśnia sercowego; **MKK3/6**, ang. *mitogen-activated protein kinase kinase 3/6*, kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami 3/6; **mRNA**, ang. *messenger RNA*, informacyjny RNA / matrycowy RNA; **NC**, ang. *negative control*, kontrola negatywna; **N-EVs**, ang. *nicotinamide mononucleotide-conditioned extracellular vesicles*, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe kondycjonowane mononukleotydem nikotynamidu; **NEDD4**, ang. *neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4*, ligaza ubikwitynowa NEDD4; **NEF**, ang. *normal ejection fraction*, prawidłowa frakcja wyrzutowa; **NF-κB**, ang. *nuclear factor kappa B*, jądrowy czynnik κB; **NLRP3** ang. *NLR family pyrin domain containing 3*, białko NLRP3 zawierające domenę pirynową; **NOS3**, ang. *nitric oxide synthase 3*, syntaza tlenu azotu 3; **NRCMs**, ang. *neonatal rat cardiomyocytes*, kardiomiocyty noworodków szczurów; **NRVMs**, ang. *neonatal rat ventricular myocytes*, komorowe miocyty noworodków szczurów; **NSTEMI**, ang. *non-ST-elevation myocardial infarction*, zawał mięśnia sercowego bez uniesienia odcinka ST; **P**, ang. *prognostic*, zastosowanie prognostyczne; **p38**, ang. *p38 mitogen-activated protein kinase*, kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenami; **PB-sEVs**, ang. *peripheral blood-derived small extracellular vesicles*, małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące z krwi obwodowej; **PCI**, ang. *percutaneous coronary intervention*, przezskórna interwencja wieńcowa; **PDCD4**, ang. *programmed cell death 4*, białko programowanej śmierci komórki 4; **PEG**, ang. *polyethylene glycol*, glikol polietylenowy; **PLA**, ang. *polylactic acid*, kwas polimlekowy; **PTEN**, ang. *phosphatase and tensin homolog*, homolog fosfatazy i tensyny; **QKI**, ang. *QKI, KH domain-containing RNA binding protein*, białko wiążące RNA QKI zawierające domenę KH; **RGD**, ang. *arginine-glycine-aspartic acid motif*, motyw arginina–glicyna–kwas asparaginowy; **Rian**, ang. *RNA imprinted and accumulated in nucleus*, RNA imprintowany i akumulowany w jądrze; **RUNX3**, ang. *runt-related transcription factor 3*, czynnik transkrypcyjny RUNX3; **SA**, ang. *stable angina*, stabilna dławica piersiowa; **SAP**, ang. *stable angina pectoris*, stabilna dławica piersiowa; **SCD**, ang. *sudden cardiac death*, nagły zgon sercowy; **SD**, ang. *Sprague-Dawley*, szczep szczurów Sprague-Dawley; **sEVs**, ang. *small extracellular vesicles*, małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe; **siRNA**, ang. *small interfering RNA*, mały interferujący RNA; **SIRT1**, ang. *sirtuin 1*, sirtuina 1; **SIRT3**, ang. *sirtuin 3*, sirtuina 3; **Smad3**, ang. *SMAD family member 3*, białko z rodziny SMAD 3; **Smad4**, ang. *SMAD family member 4*, białko z rodziny SMAD 4; **Smad7**, ang. *SMAD family member 7*, białko z rodziny SMAD 7; **SOCS1**, ang.

suppressor of cytokine signaling 1, supresor sygnalizacji cytokin 1; **Spry1/Sprouty1**, ang. *sprouty RTK signaling antagonist 1*, antagonist sygnalizacji RTK Sprouty1; **STEMI**, ang. *ST-elevation myocardial infarction*, zawał mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST; **STRN**, ang. *striatin*, striatyna; **SUD**, ang. *sudden unexpected death*, nagły nieoczekiwany zgon; **T**, ang. *therapeutic*, zastosowanie terapeutyczne; **TCF7**, ang. *transcription factor 7*, czynnik transkrypcyjny 7; **TGF- β** , ang. *transforming growth factor beta*, transformujący czynnik wzrostu beta; **TGF- β 1**, ang. *transforming growth factor beta 1*, transformujący czynnik wzrostu beta 1; **TNF- α** , ang. *tumor necrosis factor alpha*, czynnik martwicy nowotworów alfa; **TNRC6a**, ang. *trinucleotide repeat-containing adaptor 6A*, adaptor 6A zawierający powtórzenia trójnukleotydowe; **TP53INP1**, ang. *tumor protein p53-inducible nuclear protein 1*, jądrowe białko 1 indukowane przez p53; **Treg cells**, ang. *regulatory T cells*, limfocyty T regulatorowe; **TTC**, ang. *Takotsubo cardiomyopathy* albo *triphenyltetrazolium chloride* - zależnie od kontekstu: kardiomiopatia Takotsubo lub chlorek trifenyltetrazoliowy; **UA**, ang. *unstable angina*, niestabilna dławica piersiowa; **UAP**, ang. *unstable angina pectoris*, niestabilna dławica piersiowa; **UCA1**, ang. *urothelial cancer-associated 1*, transkrypt UCA1 związany z rakiem urotelialnym; **UPS**, ang. *ubiquitin-proteasome system*, układ ubikwityna–proteasom; **VEGF**, ang. *vascular endothelial growth factor*, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; **VEGF-A**, ang. *vascular endothelial growth factor A*, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu A; **WT**, ang. *wild type*, typ dziki; **XIAP**, ang. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*, sprzężone z chromosomem X białko hamujące apoptozę; **ZNF280c**, ang. *zinc finger protein 280C*, białko palca cynkowego 280C; **α -SMA**, ang. *alpha-smooth muscle actin*, alfa-aktyna mięśni gładkich.

13. Piśmiennictwo

1. Jarosz-Popek J, Eyileten C, Gager GM, Nowak A, Szwed P, Wicik Z, et al. The interaction between non-coding RNAs and SGLT2: A review. *Int J Cardiol.* 2023; 131419.
2. Frantz S, Hundertmark MJ, Schulz-Menger J, Bengel FM, Bauersachs J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies. *Eur Heart J.* 2022;43: 2549–2561.
3. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. [2023 Focused update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure]. *G Ital Cardiol (Rome).* 2024;25: 202–213.
4. Sulo G, Sulo E, Jørgensen T, Linnenberg A, Prescott E, Tell GS, et al. Ischemic heart failure as a complication of incident acute myocardial infarction: Timing and time trends: A national analysis including 78,814 Danish patients during 2000-2009. *Scand J Public Health.* 2020;48: 294–302.
5. Cahill TJ, Kharbanda RK. Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World J Cardiol.* 2017;9: 407–415.
6. Triposkiadis F, Xanthopoulos A, Parissis J, Butler J, Farmakis D. Pathogenesis of chronic heart failure: cardiovascular aging, risk factors, comorbidities, and disease modifiers. *Heart Fail Rev.* 2022;27: 337–344.
7. Kittleson MM, Panjrath GS, Amancherla K, Davis LL, Deswal A, Dixon DL, et al. 2023 ACC Expert Consensus Decision Pathway on Management of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee. *J Am Coll Cardiol.* 2023;81: 1835–1878.
8. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur*

Heart J. 2021;42: 3599–3726.

9. Roberto M, Hoepli A, Cattaneo M, Radovanovic D, Rickli H, Erne P, et al. Patients With AMI and Severely Reduced LVEF, a Well-Defined, Still Extremely Vulnerable Population (Insights from AMIS Plus Registry). *Am J Cardiol.* 2023;200: 190–201.
10. Penna C, Andreadou I, Aragno M, Beauloye C, Bertrand L, Lazou A, et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *Br J Pharmacol.* 2020;177: 5312–5335.
11. Lee JH, Kim YJ, Cho YH, Kim JB, Kim HJ. Preoperative diabetes duration and long-term outcomes in patients with acute myocardial infarction undergoing coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2025;170: 1650–1658.e9.
12. American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes*. Summary of Revisions: Standards of Care in Diabetes-2026. *Diabetes Care.* 2026;49: S6–S12.
13. Gholap NN, Achana FA, Davies MJ, Ray KK, Gray L, Khunti K. Long-term mortality after acute myocardial infarction among individuals with and without diabetes: A systematic review and meta-analysis of studies in the post-reperfusion era. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19: 364–374.
14. Cui J, Liu Y, Li Y, Xu F, Liu Y. Type 2 Diabetes and Myocardial Infarction: Recent Clinical Evidence and Perspective. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8: 644189.
15. Schlesinger S, Neuenschwander M, Barbaresko J, Lang A, Maalmi H, Rathmann W, et al. Prediabetes and risk of mortality, diabetes-related complications and comorbidities: umbrella review of meta-analyses of prospective studies. *Diabetologia.* 2022;65: 275–285.
16. Li Y, Liu Y, Liu S, Gao M, Wang W, Chen K, et al. Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8: 152.

17. Bjornstad P, Drews K, Zeitler PS. Long-Term Complications in Youth-Onset Type 2 Diabetes. Reply. *N Engl J Med*. 2021;385: 2016.
18. von Lewinski D, Kolesnik E, Tripolt NJ, Pferschy PN, Benedikt M, Wallner M, et al. Empagliflozin in acute myocardial infarction: the EMMY trial. *Eur Heart J*. 2022;43: 4421–4432.
19. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9: 402.
20. Burki T. 2024 Nobel Prize awarded for work on microRNAs. *Lancet*. 2024;404: 1507–1508.
21. Sun T, Dong Y-H, Du W, Shi C-Y, Wang K, Tariq M-A, et al. The Role of MicroRNAs in Myocardial Infarction: From Molecular Mechanism to Clinical Application. *Int J Mol Sci*. 2017;18. doi:10.3390/ijms18040745
22. Jakubik D, Fitas A, Eyileten C, Jarosz-Popek J, Nowak A, Czajka P, et al. MicroRNAs and long non-coding RNAs in the pathophysiological processes of diabetic cardiomyopathy: emerging biomarkers and potential therapeutics. *Cardiovasc Diabetol*. 2021;20: 55.
23. Soplinska A, Zareba L, Wicik Z, Eyileten C, Jakubik D, Siller-Matula JM, et al. MicroRNAs as Biomarkers of Systemic Changes in Response to Endurance Exercise-A Comprehensive Review. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10. doi:10.3390/diagnostics10100813
24. Sayed ASM, Xia K, Salma U, Yang T, Peng J. Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases. *Heart Lung Circ*. 2014;23: 503–510.
25. Mir R, Elfaki I, Khullar N, Waza AA, Jha C, Mir MM, et al. Role of Selected miRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Cardiovascular Diseases, Including Coronary Artery Disease, Myocardial Infarction and Atherosclerosis. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8. doi:10.3390/jcdd8020022

26. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3: 311–330.
27. Pinti MV, Hathaway QA, Hollander JM. Role of microRNA in metabolic shift during heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312: H33–H45.
28. Udali S, Guarini P, Moruzzi S, Choi S-W, Friso S. Cardiovascular epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *Mol Aspects Med*. 2013;34: 883–901.
29. Dangwal S, Thum T. MicroRNAs in platelet biogenesis and function. *Thromb Haemost*. 2012;108: 599–604.
30. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15: 509–524.
31. Ban E, Song EJ. Considerations and Suggestions for the Reliable Analysis of miRNA in Plasma Using qRT-PCR. *Genes (Basel)*. 2022;13. doi:10.3390/genes13020328
32. Zareba L, Fitas A, Wolska M, Junger E, Eyileten C, Wicik Z, et al. MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Coronary Artery Disease: New and Potential Therapeutic Targets. *Cardiol Clin*. 2020;38: 601–617.
33. Eyileten C, Sharif L, Wicik Z, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Soplinska A, et al. The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol*. 2020. doi:10.1007/s12035-020-02101-2
34. Gasecka A, Siwik D, Gajewska M, Jaguszewski MJ, Mazurek T, Filipiak KJ, et al. Early Biomarkers of Neurodegenerative and Neurovascular Disorders in Diabetes. *J Clin Med Res*. 2020;9. doi:10.3390/jcm9092807
35. Pordzik J, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Wicik Z, Eyileten C, De Rosa S, et al. Significance of circulating microRNAs in diabetes mellitus type 2 and platelet reactivity: bioinformatic analysis and review. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18: 113.

36. Eyileten C, Wicik Z, De Rosa S, Mirowska-Guzel D, Soplinska A, Indolfi C, et al. MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Ischemic Stroke-A Comprehensive Review and Bioinformatic Analysis. *Cells*. 2018;7. doi:10.3390/cells7120249
37. Pordzik J, Piszcz K, De Rosa S, Jones AD, Eyileten C, Indolfi C, et al. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9: 74.
38. Wicik Z, Eyileten C, Jakubik D, Simões SN, Martins DC Jr, Pavão R, et al. ACE2 Interaction Networks in COVID-19: A Physiological Framework for Prediction of Outcome in Patients with Cardiovascular Risk Factors. *J Clin Med Res*. 2020;9. doi:10.3390/jcm9113743
39. Olson SR, Tang WHW, Liu C-F. Non-Coding Ribonucleic Acids as Diagnostic and Therapeutic Targets in Cardiac Fibrosis. *Curr Heart Fail Rep*. 2024;21: 262–275.
40. de Gonzalo-Calvo D, Vea A, Bär C, Fiedler J, Couch LS, Brotons C, et al. Circulating non-coding RNAs in biomarker-guided cardiovascular therapy: a novel tool for personalized medicine? *Eur Heart J*. 2019;40: 1643–1650.
41. Thum T, Condorelli G. Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. *Circ Res*. 2015;116: 751–762.
42. Pinchi E, Frati P, Aromatario M, Cipolloni L, Fabbri M, La Russa R, et al. miR-1, miR-499 and miR-208 are sensitive markers to diagnose sudden death due to early acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2019;23: 6005–6016.
43. Grabmaier U, Clauss S, Gross L, Klier I, Franz WM, Steinbeck G, et al. Diagnostic and prognostic value of miR-1 and miR-29b on adverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction - The SITAGRAMI-miR analysis. *Int J Cardiol*. 2017;244: 30–36.
44. Wei L, Zhang Y, Qi X, Sun X, Li Y, Xu Y. Ubiquitin-proteasomes are the dominant

mediators of the regulatory effect of microRNA-1 on cardiac remodeling after myocardial infarction. *Int J Mol Med*. 2019;44: 1899–1907.

45. Mansouri F, Seyed Mohammadzad MH. Up-Regulation of Cell-Free MicroRNA-1 and MicroRNA-221-3p Levels in Patients with Myocardial Infarction Undergoing Coronary Angiography. *Adv Pharm Bull*. 2021;11: 719–727.
46. Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119: 87–95.
47. Ren X, Ellis BW, Ronan G, Blood SR, DeShetler C, Senapati S, et al. A multiplexed ion-exchange membrane-based miRNA (MIX·miR) detection platform for rapid diagnosis of myocardial infarction. *Lab Chip*. 2021;21: 3876–3887.
48. Mildeberger L, Bueto J, Wilmes V, Scheiper-Welling S, Niess C, Gradhand E, et al. Suitable biomarkers for post-mortem differentiation of cardiac death causes: Quantitative analysis of miR-1, miR-133a and miR-26a in heart tissue and whole blood. *Forensic Sci Int Genet*. 2023;65: 102867.
49. Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, Glavac D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology*. 2010;115: 163–169.
50. Su T, Shao X, Zhang X, Yang C, Shao X. Value of circulating miRNA-1 detected within 3 h after the onset of acute chest pain in the diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2020;307: 146–151.
51. Wang Y, Pan X, Fan Y, Hu X, Liu X, Xiang M, et al. Dysregulated expression of microRNAs and mRNAs in myocardial infarction. *Am J Transl Res*. 2015;7: 2291–2304.
52. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31: 2765–2773.

53. Liu X, Fan Z, Zhao T, Cao W, Zhang L, Li H, et al. Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population. *Exp Gerontol*. 2015;72: 230–238.
54. Long G, Wang F, Duan Q, Chen F, Yang S, Gong W, et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction. *Int J Biol Sci*. 2012;8: 811–818.
55. Li C, Fang Z, Jiang T, Zhang Q, Liu C, Zhang C, et al. Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC Med Genomics*. 2013;6: 16.
56. Wang G-K, Zhu J-Q, Zhang J-T, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010;31: 659–666.
57. Su T, Shao X, Zhang X, Han Z, Yang C, Li X. Initial Concentrations of miR-1 MicroRNA Precursor and High-Sensitivity Troponin in the Diagnosis of Non-ST Myocardial Infarction among Patients with and Those without Chronic Kidney Disease. *Cardiorenal Med*. 2019;9: 274–283.
58. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391: 73–77.
59. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4: 446–454.
60. Li Y-Q, Zhang M-F, Wen H-Y, Hu C-L, Liu R, Wei H-Y, et al. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68: 75–80.
61. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Götberg M, Erlinge D. 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.

62. Hromádka M, Černá V, Pešta M, Kučerová A, Jarkovský J, Rajdl D, et al. Prognostic Value of MicroRNAs in Patients after Myocardial Infarction: A Substudy of PRAGUE-18. *Dis Markers*. 2019;2019: 2925019.
63. Coelho-Lima J, Mohammed A, Cormack S, Jones S, Ali A, Panahi P, et al. Kinetics Analysis of Circulating MicroRNAs Unveils Markers of Failed Myocardial Reperfusion. *Clin Chem*. 2020;66: 247–256.
64. Cheng M, Yang J, Zhao X, Zhang E, Zeng Q, Yu Y, et al. Circulating myocardial microRNAs from infarcted hearts are carried in exosomes and mobilise bone marrow progenitor cells. *Nat Commun*. 2019;10: 959.
65. Jaguszewski M, Osipova J, Ghadri J-R, Napp LC, Widera C, Franke J, et al. A signature of circulating microRNAs differentiates takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2014;35: 999–1006.
66. Cheng Y, Wang X, Yang J, Duan X, Yao Y, Shi X, et al. A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;53: 668–676.
67. Yan Y, Zhang B, Liu N, Qi C, Xiao Y, Tian X, et al. Circulating Long Noncoding RNA UCA1 as a Novel Biomarker of Acute Myocardial Infarction. *Biomed Res Int*. 2016;2016: 8079372.
68. Bostjancic E, Zidar N, Glavac D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. *Dis Markers*. 2009;27: 255–268.
69. Gao L, Liu Y, Guo S, Yao R, Wu L, Xiao L, et al. Circulating Long Noncoding RNA HOTAIR is an Essential Mediator of Acute Myocardial Infarction. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44: 1497–1508.
70. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary

syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51: 872–875.

71. Kang J-Y, Kim H, Mun D, Yun N, Joung B. Therapeutic potential of miR-21 regulation by human peripheral blood derived-small extracellular vesicles in myocardial infarction. *Clin Sci (Lond).* 2020;134: 985–999.
72. Yang L, Wang B, Zhou Q, Wang Y, Liu X, Liu Z, et al. MicroRNA-21 prevents excessive inflammation and cardiac dysfunction after myocardial infarction through targeting KBTBD7. *Cell Death Dis.* 2018;9: 769.
73. Mi X-L, Gao Y-P, Hao D-J, Zhang Z-J, Xu Z, Li T, et al. Prognostic value of circulating microRNA-21-5p and microRNA-126 in patients with acute myocardial infarction and infarct-related artery total occlusion. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9: 947721.
74. Li D, Mao C, Zhou E, You J, Gao E, Han Z, et al. MicroRNA-21 Mediates a Positive Feedback on Angiotensin II-Induced Myofibroblast Transformation. *J Inflamm Res.* 2020;13: 1007–1020.
75. Zhou X-L, Xu H, Liu Z-B, Wu Q-C, Zhu R-R, Liu J-C. miR-21 promotes cardiac fibroblast-to-myofibroblast transformation and myocardial fibrosis by targeting Jagged1. *J Cell Mol Med.* 2018;22: 3816–3824.
76. Gao C, Zhao D, Wang J, Liu P, Xu B. Clinical significance and correlation of microRNA-21 expression and the neutrophil-lymphocyte ratio in patients with acute myocardial infarction. *Clinics (Sao Paulo).* 2019;74: e1237.
77. Roy S, Khanna S, Hussain S-RA, Biswas S, Azad A, Rink C, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res.* 2009;82: 21–29.
78. Wang Z-H, Sun X-Y, Li C-L, Sun Y-M, Li J, Wang L-F, et al. miRNA-21 Expression in the Serum of Elderly Patients with Acute Myocardial Infarction. *Med Sci Monit.* 2017;23: 5728–5734.

79. Li L, Chen Q, Feng C, Jin Y, Xia S. Aberrant expression of TNRC6a and miR-21 during myocardial infarction. *3 Biotech*. 2019;9: 285.
80. Zhou X-H, Chai H-X, Bai M, Zhang Z. LncRNA-GAS5 regulates PDCD4 expression and mediates myocardial infarction-induced cardiomyocytes apoptosis via targeting MiR-21. *Cell Cycle*. 2020;19: 1363–1377.
81. Yuan J, Chen H, Ge D, Xu Y, Xu H, Yang Y, et al. Mir-21 Promotes Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction Via Targeting Smad7. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42: 2207–2219.
82. Xu L, Tian L, Yan Z, Wang J, Xue T, Sun Q. Diagnostic and prognostic value of miR-486-5p, miR-451a, miR-21-5p and monocyte to high-density lipoprotein cholesterol ratio in patients with acute myocardial infarction. *Heart Vessels*. 2023;38: 318–331.
83. Raupach A, Torregroza C, Niestegge J, Feige K, Klemm-Meyer S, Bauer I, et al. MiR-21-5p but not miR-1-3p expression is modulated by preconditioning in a rat model of myocardial infarction. *Mol Biol Rep*. 2020;47: 6669–6677.
84. Zhang J-C, Xia L, Jiang Y, Wu D-Q, Liu S-C, Zhou X-N, et al. Effect of lncRNA GAS5 on rats with acute myocardial infarction through regulating miR-21. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23: 8573–8579.
85. Liu X, Dong Y, Chen S, Zhang G, Zhang M, Gong Y, et al. Circulating MicroRNA-146a and MicroRNA-21 Predict Left Ventricular Remodeling after ST-Elevation Myocardial Infarction. *Cardiology*. 2015;132: 233–241.
86. Yang F, Liu W, Yan X, Zhou H, Zhang H, Liu J, et al. Effects of mir-21 on Cardiac Microvascular Endothelial Cells After Acute Myocardial Infarction in Rats: Role of Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)/Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signal Pathway. *Med Sci Monit*. 2016;22: 3562–3575.
87. Gu G-L, Xu X-L, Sun X-T, Zhang J, Guo C-F, Wang C-S, et al. Cardioprotective Effect of MicroRNA-21 in Murine Myocardial Infarction. *Cardiovasc Ther*. 2015;33: 109–117.

88. Zhang Y, Yuan B, Xu Y, Zhou N, Zhang R, Lu L, et al. MiR-208b/miR-21 Promotes the Progression of Cardiac Fibrosis Through the Activation of the TGF- β 1/Smad-3 Signaling Pathway: An and Study. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9: 924629.
89. Huang W, Tian S-S, Hang P-Z, Sun C, Guo J, Du Z-M. Combination of microRNA-21 and microRNA-146a Attenuates Cardiac Dysfunction and Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in Mice. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5: e296.
90. Zhang Y, Liu Y-J, Liu T, Zhang H, Yang S-J. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20: 323–329.
91. Pedersen OB, Hvas A-M, Pasalic L, Kristensen SD, Grove EL, Nissen PH. Platelet Function and Maturity and Related microRNA Expression in Whole Blood in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Thromb Haemost*. 2024;124: 192–202.
92. Wang F, Long G, Zhao C, Li H, Chaugai S, Wang Y, et al. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2014;9: e105734.
93. Charrier H, Cuvelliez M, Dubois-Deruy E, Mulder P, Richard V, Bauters C, et al. Integrative System Biology Analyses Identify Seven MicroRNAs to Predict Heart Failure. *Noncoding RNA*. 2019;5. doi:10.3390/ncrna5010022
94. Liang H, Zhang C, Ban T, Liu Y, Mei L, Piao X, et al. A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGF β RIII is involved in cardiac fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44: 2152–2160.
95. Kim EN, Kim CJ, Kim SR, Song J-A, Choe H, Kim K-B, et al. High serum CRP influences myocardial miRNA profiles in ischemia-reperfusion injury of rat heart. *PLoS One*. 2019;14: e0216610.
96. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, et al. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-

apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res.* 2010;87: 431–439.

97. Velle-Forbord T, Eidlaug M, Debik J, Sæther JC, Follestad T, Nauman J, et al. Circulating microRNAs as predictive biomarkers of myocardial infarction: Evidence from the HUNT study. *Atherosclerosis.* 2019;289: 1–7.
98. Li S, Fan Q, He S, Tang T, Liao Y, Xie J. MicroRNA-21 negatively regulates Treg cells through a TGF- β 1/Smad-independent pathway in patients with coronary heart disease. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37: 866–878.
99. Li Q-H, Ge Z-W, Xiang Y, Tian D, Tang Y, Zhang Y-C. Upregulation of microRNA-34a enhances myocardial ischemia-reperfusion injury via the mitochondrial apoptotic pathway. *Free Radic Res.* 2022;56: 229–244.
100. Wang Z, Wang Z, Wang T, Yuan J, Wang X, Zhang Z. Inhibition of miR-34a-5p protected myocardial ischemia reperfusion injury-induced apoptosis and reactive oxygen species accumulation through regulation of Notch Receptor 1 signaling. *Rev Cardiovasc Med.* 2019;20: 187–197.
101. Fu B-C, Lang J-L, Zhang D-Y, Sun L, Chen W, Liu W, et al. Suppression of miR-34a Expression in the Myocardium Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury Through SIRT1 Protective Pathway. *Stem Cells Dev.* 2017;26: 1270–1282.
102. Huang Y, Qi Y, Du J-Q, Zhang D-F. MicroRNA-34a regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting Smad4. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18: 1355–1365.
103. Fan F, Sun A, Zhao H, Liu X, Zhang W, Jin X, et al. MicroRNA-34a promotes cardiomyocyte apoptosis post myocardial infarction through down-regulating aldehyde dehydrogenase 2. *Curr Pharm Des.* 2013;19: 4865–4873.
104. Shao H, Yang L, Wang L, Tang B, Wang J, Li Q. MicroRNA-34a protects myocardial cells against ischemia-reperfusion injury through inhibiting autophagy via regulating TNF α expression. *Biochem Cell Biol.* 2018;96: 349–354.

105. Bian W-S, Tian F-H, Jiang L-H, Sun Y-F, Wu S-X, Gao B-F, et al. Influence of miR-34a on myocardial apoptosis in rats with acute myocardial infarction through the ERK1/2 pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23: 3034–3041.
106. Lv P, Zhou M, He J, Meng W, Ma X, Dong S, et al. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Int J Mol Sci*. 2014;15: 5774–5788.
107. Wang Y, Luo J, Yang H, Liu Y. LncRNA Peg13 Alleviates Myocardial Infarction/Reperfusion Injury through Regulating MiR-34a/Sirt1-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress. *Int Heart J*. 2024;65: 517–527.
108. Xue S, Liu D, Zhu W, Su Z, Zhang L, Zhou C, et al. Circulating MiR-17-5p, MiR-126-5p and MiR-145-3p Are Novel Biomarkers for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Front Physiol*. 2019;10: 123.
109. He Y, Zhong J, Huang S, Shui X, Kong D, Chen C, et al. Elevated circulating miR-126-3p expression in patients with acute myocardial infarction: its diagnostic value. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10: 11051–11056.
110. Ren Y, Bao R, Guo Z, Kai J, Cai C-G, Li Z. miR-126-5p regulates H9c2 cell proliferation and apoptosis under hypoxic conditions by targeting IL-17A. *Exp Ther Med*. 2021;21: 67.
111. Fei L, Zhang J, Niu H, Yuan C, Ma X. Effects of Rosuvastatin and MiR-126 on Myocardial Injury Induced by Acute Myocardial Infarction in Rats: Role of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A). *Med Sci Monit*. 2016;22: 2324–2334.
112. Ozuynuk-Ertugrul AS, Ekici B, Erkan AF, Coban N. Alteration of circulating miRNAs during myocardial infarction and association with lipid levels. *Lab Med*. 2024;55: 361–372.
113. Zhong Z, Wu H, Zhong W, Zhang Q, Yu Z. Expression profiling and bioinformatics analysis of circulating microRNAs in patients with acute myocardial infarction. *J Clin Lab Anal*. 2020;34: e23099.

114. Lakhani HV, Khanal T, Gabi A, Yousef G, Alam MB, Sharma D, et al. Developing a panel of biomarkers and miRNA in patients with myocardial infarction for early intervention strategies of heart failure in West Virginian population. *PLoS One*. 2018;13: e0205329.
115. Ewelina K, Eljaszewicz A, Kazimierczyk R, Tynecka M, Zembko P, Tarasiuk E, et al. Altered microRNA dynamics in acute coronary syndrome. *Postepy Kardiol Interwencyjnej*. 2020;16: 287–293.
116. Hsu A, Chen S-J, Chang Y-S, Chen H-C, Chu P-H. Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 418628.
117. Ibrahim S, Osama D, Hegazy A, Hashmi H, Abou-Aisha K, Gad MZ. Expression of microRNA-133a and microRNA-208b in acute myocardial infarction; A randomized clinical trial. *Research Square*. 2023. doi:10.21203/rs.3.rs-2995851/v1
118. Website. Available: Sun, Bixi, Shuwen Liu, Rubin Hao, Xinyue Dong, Lanbo Fu, and Bing Han. 2020. “RGD-PEG-PLA Delivers MiR-133 to Infarct Lesions of Acute Myocardial Infarction Model Rats for Cardiac Protection.” *Pharmaceutics* 12 (6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060575>
119. Cai X, Shi J, Xu Y, Fu L, Feng X, Zhao R. An important diagnostic marker of acute myocardial infarction patients: Plasma miRNA133 levels. *Medicine (Baltimore)*. 2024;103: e38781.
120. Yu B-T, Yu N, Wang Y, Zhang H, Wan K, Sun X, et al. Role of miR-133a in regulating TGF- β 1 signaling pathway in myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23: 8588–8597.
121. Zhou Y, Huang H, Hou X. MicroRNA-133b Alleviates Hypoxia Injury by Direct Targeting on NOD-Like Receptor Protein 3 in Rat H9c2 Cardiomyocyte. *Cardiol Res Pract*. 2019;2019: 8092461.
122. Yuan L, Liu X, Chen F, Zhang L, Chen X, Huang Q, et al. Diagnostic and

Prognostic Value of Circulating MicroRNA-133a in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Clin Lab*. 2016;62: 1233–1241.

123. Peng L, Chun-guang Q, Bei-fang L, Xue-zhi D, Zi-hao W, Yun-fu L, et al. Clinical impact of circulating miR-133, miR-1291 and miR-663b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Diagn Pathol*. 2014;9: 89.
124. Wang J, He D, Xiong M, Liu Y. Epigenetic Biomarker and Personalized Precision Medicine. *Frontiers Media SA*; 2020.
125. Bauters C, Kumarswamy R, Holzmann A, Bretthauer J, Anker SD, Pinet F, et al. Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013;168: 1837–1840.
126. Guo J, Liu H-B, Sun C, Yan X-Q, Hu J, Yu J, et al. MicroRNA-155 Promotes Myocardial Infarction-Induced Apoptosis by Targeting RNA-Binding Protein QKI. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019: 4579806.
127. Kazimierczyk E, Eljaszewicz A, Zembko P, Tarasiuk E, Rusak M, Kulczynska-Przybik A, et al. The relationships among monocyte subsets, miRNAs and inflammatory cytokines in patients with acute myocardial infarction. *Pharmacol Rep*. 2019;71: 73–81.
128. Latet SC, Van Herck PL, Claeys MJ, Van Craenenbroeck AH, Haine SE, Vandendriessche TR, et al. Failed Downregulation of Circulating MicroRNA-155 in the Early Phase after ST Elevation Myocardial Infarction Is Associated with Adverse Left Ventricular Remodeling. *Cardiology*. 2017;138: 91–96.
129. Zhao D, Zhao J, Sun J, Su Y, Jian J, Ye H, et al. The expression level of miR-155 in plasma and peripheral blood mononuclear cells in coronary artery disease patients and the associations of these levels with the apoptosis rate of peripheral blood mononuclear cells. *Exp Ther Med*. 2018;16: 4373–4378.
130. Hu C, Liao J, Huang R, Su Q, He L. MicroRNA-155-5p in serum derived-exosomes promotes ischaemia-reperfusion injury by reducing CypD ubiquitination by NEDD4.

ESC Heart Fail. 2023;10: 1144–1157.

131. Yang H-T, Li L-L, Li S-N, Wu J-T, Chen K, Song W-F, et al. MicroRNA-155 inhibition attenuates myocardial infarction-induced connexin 43 degradation in cardiomyocytes by reducing pro-inflammatory macrophage activation. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2022;12: 325–339.
132. He W, Huang H, Xie Q, Wang Z, Fan Y, Kong B, et al. MiR-155 Knockout in Fibroblasts Improves Cardiac Remodeling by Targeting Tumor Protein p53-Inducible Nuclear Protein 1. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016;21: 423–435.
133. Eisenhardt SU, Weiss JBW, Smolka C, Maxeiner J, Pankratz F, Bemtgen X, et al. MicroRNA-155 aggravates ischemia-reperfusion injury by modulation of inflammatory cell recruitment and the respiratory oxidative burst. *Basic Res Cardiol.* 2015;110: 32.
134. Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, et al. A subset of circulating microRNAs are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427: 280–284.
135. Long G, Wang F, Duan Q, Yang S, Chen F, Gong W, et al. Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction. *PLoS One.* 2012;7: e50926.
136. Zhang X, Ji R, Liao X, Castellero E, Kennel PJ, Brunjes DL, et al. MicroRNA-195 Regulates Metabolism in Failing Myocardium Via Alterations in Sirtuin 3 Expression and Mitochondrial Protein Acetylation. *Circulation.* 2018;137: 2052–2067.
137. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation.* 2010;122: S124–31.
138. Song R, Dasgupta C, Mulder C, Zhang L. MicroRNA-210 Controls Mitochondrial Metabolism and Protects Heart Function in Myocardial Infarction. *Circulation.* 2022;145: 1140–1153.

139. Zhong L, Jia J, Ye G. Rian/miR-210-3p/Nfkb1 Feedback Loop Promotes Hypoxia-Induced Cell Apoptosis in Myocardial Infarction Through Deactivating the PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2020;76: 207–215.
140. Pu Y, Li C, Qi X, Xu R, Dong L, Jiang Y, et al. Extracellular Vesicles from NMN Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Ameliorated Myocardial Infarction via miR-210-3p Promoted Angiogenesis. *Stem Cell Rev Rep.* 2023;19: 1051–1066.
141. Fan Z-G, Qu X-L, Chu P, Gao Y-L, Gao X-F, Chen S-L, et al. MicroRNA-210 promotes angiogenesis in acute myocardial infarction. *Mol Med Rep.* 2018;17: 5658–5665.
142. Catana C-S, Crişan C-A, Opre D, Berindan-Neagoe I. Implications of Long Non-Coding RNAs in Age-Altered Proteostasis. *Aging Dis.* 2020;11: 692–704.
143. Statello L, Guo C-J, Chen L-L, Huarte M. Author Correction: Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22: 159.
144. Viereck J, Thum T. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circ Res.* 2017;120: 381–399.
145. Caporali A, Anwar M, Devaux Y, Katare R, Martelli F, Srivastava PK, et al. Non-coding RNAs as therapeutic targets and biomarkers in ischaemic heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2024;21: 556–573.
146. Dzau VJ, Hodgkinson CP. RNA Therapeutics for the Cardiovascular System. *Circulation.* 2024;149: 707–716.
147. Wang L, Jin Y. Noncoding RNAs as Biomarkers for Acute Coronary Syndrome. *Biomed Res Int.* 2020;2020: 3298696.
148. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012;110: 483–495.

149. Condorelli G, Latronico MVG, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63: 2177–2187.
150. Jarosz-Popek J, Eyileten C, Wicik Z, Ahmadova S, Siller-Matula J, von Lewinski D, et al. Circulating microRNA signatures differentiate type 2 diabetes and predict myocardial infarction severity: bench to bedside analysis. *Eur J Med Res.* 2026. doi:10.1186/s40001-026-04486-7
151. Benedikt M, Mangge H, Aziz F, Curcic P, Pailer S, Herrmann M, et al. Impact of the SGLT2-inhibitor empagliflozin on inflammatory biomarkers after acute myocardial infarction - a post-hoc analysis of the EMMY trial. *Cardiovasc Diabetol.* 2023;22: 166.
152. Zaccagnini G, Greco S, Voellenkle C, Gaetano C, Martelli F. miR-210 hypoxamiR in Angiogenesis and Diabetes. *Antioxid Redox Signal.* 2022;36: 685–706.
153. Lin K-H, Ng S-C, Paul CR, Chen H-C, Zeng R-Y, Liu J-S, et al. MicroRNA-210 repression facilitates advanced glycation end-product (AGE)-induced cardiac mitochondrial dysfunction and apoptosis via JNK activation. *J Cell Biochem.* 2021;122: 1873–1885.
154. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care.* 2014;37: 1375–1383.
155. Sardu C, Trotta MC, Pieretti G, Gatta G, Ferraro G, Nicoletti GF, et al. MicroRNAs modulation and clinical outcomes at 1 year of follow-up in obese patients with pre-diabetes treated with metformin vs. placebo. *Acta Diabetol.* 2021;58: 1381–1393.
156. Zheng D, Ma J, Yu Y, Li M, Ni R, Wang G, et al. Silencing of miR-195 reduces diabetic cardiomyopathy in C57BL/6 mice. *Diabetologia.* 2015;58: 1949–1958.
157. Shi Y, Yan C, Li Y, Zhang Y, Zhang G, Li M, et al. Expression signature of miRNAs and the potential role of miR-195-5p in high-glucose-treated rat

cardiomyocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 2020;34: e22423.

158. Liu J, Wang J, Fu W, Wang X, Chen H, Wu X, et al. MiR-195-5p and miR-205-5p in extracellular vesicles isolated from diabetic foot ulcer wound fluid decrease angiogenesis by inhibiting VEGFA expression. *Aging (Albany NY).* 2021;13: 19805–19821.
159. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008;456: 980–984.
160. Dai B, Li H, Fan J, Zhao Y, Yin Z, Nie X, et al. MiR-21 protected against diabetic cardiomyopathy induced diastolic dysfunction by targeting gelsolin. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17: 123.
161. Engström A, Söderling J, Hviid A, Eliasson B, Gudbjörnsdottir S, Wintzell V, et al. Comparative cardiovascular and renal effectiveness of empagliflozin and dapagliflozin: Scandinavian cohort study. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2024;10: 432–443.
162. Butler J, Jones WS, Udell JA, Anker SD, Petrie MC, Harrington J, et al. Empagliflozin after Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2024;390: 1455–1466.
163. James S, Erlinge D, Storey RF, McGuire DK, de Belder M, Eriksson N, et al. Dapagliflozin in Myocardial Infarction without Diabetes or Heart Failure. *NEJM Evid.* 2024;3: EVIDoa2300286.
164. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105: 10513–10518.
165. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods.* 2010;50: 298–301.

166. Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* 2016;17: 204–212.
167. Bauersachs J, Solomon SD, Anker SD, Antorrena-Miranda I, Batkai S, Viereck J, et al. Efficacy and safety of CDR132L in patients with reduced left ventricular ejection fraction after myocardial infarction: Rationale and design of the HF-REVERT trial. *Eur J Heart Fail.* 2024;26: 674–682.
168. Roberts TC, Coenen-Stass AML, Wood MJA. Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine serum. *PLoS One.* 2014;9: e89237.

14. Opinia Komisji Bioetycznej lub Etycznej

Ethikkommission



Medizinische Universität Graz

Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Fax: -14348

FOLGEVOTUM

gültig bis 03.03.2018

EK-Nummer: 29-179 ex 16/17 **EudraCT Nr.:** 2016-004591-22
Studientitel: Impact of EMPagliflozin on cardiac function and biomarkers of heart failure in patients with acute MYocardial infarction (EMMY-Trial) – a phase III Study
Prüfer: Assoz.Prof.Dr. Harald Sourij
Univ.Klinik für Innere Medizin
Sponsor: Med. Universität Graz
Ansprechpartner: Assoz.Prof.PD Dr. Dirk von Lewinski, 8036 Graz, Auenbruggerplatz 15
CRO: -
Antragsteller: Univ. Klinik für Innere Medizin
Ansprechpartner: Dr. Norbert Tripolt, 8036 Graz, Auenbruggerplatz 15

Die o.a. Studie wurde von der Ethikkommission erstmals in der Sitzung 04-16/17 am 16.01.2017 behandelt.

Die Ethikkommission ist zu folgendem Schluss gekommen:

Es besteht kein Einwand gegen die Durchführung der Studie in der vorliegenden Form.

Stimmberechtigte bzw. anwesende Mitglieder bei der Behandlung waren: Siehe beiliegende Liste vom 16.01.2017.

Kommissionsmitglieder, die für diesen Tagesordnungspunkt als befangen anzusehen waren und daher gemäß Geschäftsordnung an der Entscheidungsfindung und Abstimmung nicht teilgenommen haben: keine

Zur Beurteilung vorliegende Dokumente:

Dokumente eingegangen am 23.12.2016, begutachtet in der Sitzung 04-16/17 am 16.01.2017

✓ Cover Letter	23.12.2016
✓ Antragsformular ECS Unterschriftenseiten	23.12.2016
✓ Antragsformular ECS	23.12.2016
Originalprotokoll Empagliflozin_Protocol V2.4 2.4	15.12.2016
Informed Consent Form Informed Consent V1.0 1.0	14.11.2016
✓ Case Report Form CRF V1.1 1.1	15.12.2016
CV CV Prof. Hoppe (PI Salzburg) ohne Version	19.12.2016
✓ CV Dirk von Lewinski CV -	22.12.2016
✓ CV CV Sourij keine Version	16.03.2016
✓ Investigator's Brochure Investigator Brochure 14	15.07.2016

Dokumente eingegangen am 27.12.2016, begutachtet in der Sitzung 04-16/17 am 16.01.2017

Antrag Teil B ECS unterschrieben, Zentrum Hoppe	23.12.2016
---	------------

EK-Nummer: 29-179 ex 16/17

Votum (28.04.2017)

Seite 1 von 3

Medizinische Universität Graz, Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz. www.medunigraz.at

Rechtsform: Juristische Person öffentlichen Rechts gem. Universitätsgesetz 2002. Information: Mitteilungsblatt der Universität und www.medunigraz.at. DVR-Nr. 210 9494.
UID: ATU 575 111 79. Bankverbindung: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000 Konto-Nr. 500 948 400 04, Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 38000 Konto-Nr. 49510.

Dokumente eingegangen am 04.01.2017, begutachtet in der Sitzung 04-16/17 am 16.01.2017		
✓ Conflict of Interest Erklärung Lewinski		03.01.2017
✓ Conflict of Interest Erklärung Sourij		03.01.2017
✓ EudraCT Formular (CT1) Signature Page		03.01.2017
✓ Sonstiges: e-mail Stellungnahme		04.01.2017
✓ Sonstiges: GCP Zertifikat, Sourij		10.06.2015
✓ Sonstiges: Vereinbarung mit Boehringer Ingelheim Draft		
Dokumente eingegangen am 13.01.2017, begutachtet in der Sitzung 04-16/17 am 16.01.2017		
✓ Cover Letter		12.01.2017
✓ EudraCT Formular (CT1) undatiert		
✓ Sonstiges: E-Mail - Stellungnahme zu Punkten im ECS Antragsformular		13.01.2017
Dokumente eingegangen am 31.01.2017 (in der nächsten Begutachtung mitbegutachtet)		
✓ Originalprotokoll 2.5		31.01.2017
✓ Sonstiges: Informationsblatt Hausarzt/Rehabilitationsteam 1.0		31.01.2017
✓ Sonstiges: Stellungnahme zur Bearbeitungsmitteilung		31.01.2017
Dokumente eingegangen am 10.02.2017 (in der nächsten Begutachtung mitbegutachtet)		
✓ Informed Consent Form Zentrum Sourij 1.1		31.01.2017
Dokumente eingegangen am 14.02.2017, begutachtet im 'expedited Review' am 03.03.2017		
✓ Versicherungsbestätigung Wiener Städtische 08-N811.957		14.02.2017
Dokumente eingegangen am 18.04.2017 (in der nächsten Begutachtung mitbegutachtet)		
✓ Cover Letter		14.04.2017
✓ Protokoll Amendment 1		14.04.2017
✓ Informed Consent Form 1.1		14.04.2017
✓ Sonstiges: EK-Meldeformular		14.04.2017
Dokumente eingegangen am 27.04.2017, begutachtet im 'expedited Review' am 28.04.2017		
✓ Originalprotokoll 2.6		14.04.2017

Datum Erstvotum: 03.03.2017

Die Ethikkommission geht – rechtlich unverbindlich – davon aus, dass es sich um eine klinische Prüfung nach AMG handelt und macht darauf aufmerksam, dass vor Beginn der Prüfung ein ordnungsgemäßer Antrag auf Genehmigung an das Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen zu stellen ist.

Das Votum der Ethikkommission berührt in keiner Weise die alleinige Verantwortung der Prüferin / des Prüfers / der Prüfer für die ordnungsgemäße Durchführung der Studie unter Einhaltung aller einschlägiger gesetzlicher Bestimmungen und Richtlinien.

Weiters machen wir darauf aufmerksam, dass der Kommission unverzüglich zu melden sind:

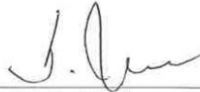
- Abweichungen vom Protokoll aus Sicherheitsgründen oder Protokolländerungen
- Änderungen, die das Risiko der Teilnehmer/-innen erhöhen oder die Durchführung der Studie wesentlich beeinflussen
- Mutmaßliche unerwartete schwerwiegende Nebenwirkungen - SUSARs (AMG-Studien ab 1.5.2004) oder schwerwiegende unerwünschte Ereignisse - SAEs (andere Studien)
- Jegliche Information über sonstige Umstände, die die Sicherheit der Teilnehmer/-innen oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen können

Die Gültigkeit des Votums umfasst die in der Liste vom 03.03.2017 angeführten Zentren.

Graz, 28. April 2017



Univ.-Prof. DI Dr. Josef Haas
Vorsitzender



Univ.-Prof. Dr. Hermann Toplak
Stv. Vorsitzender

Achtung: Bitte bei allen das Projekt betreffende Schreiben oder telefonischen Anfragen die EK-Nummer angeben!

Ethikkommission



Medizinische Universität Graz

Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Fax: -14348

Zuständige Ethikkommissionen und Prüfzentren

Liste vom 03.03.2017

Ethikkommission Med.Universität Graz

Medizinische Universität Graz,, Innere Medizin, Abteilung für Endokrinologie und
Venerologie
Assoz.-Prof. Dr. Harald Sourij

TLUMACZENIE PRZYSIĘGŁE Z JĘZYKA NIEMIECKIEGO

[Uwagi tłumacza podano w nawiasach kursywą]

Ethikkommission Medizinische Universität Graz

Komisja Etyczna Uniwersytetu Medycznego w Grazu, Auenbruggerplatz 2, A-8036

Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz ethikkommission@medunigraz.at Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Fax: -14348

POSTANOWIENIE (FOLGEVOTUM) ważne do 03.03.2018

Nr EK: 29-179 ex 16/17 Nr EudraCT: 2016-004591-22

Tytuł badania: Wpływ empagliflozyny na funkcję serca i markery niewydolności serca u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego (EMMY-Trial) - badanie fazy III

Promotor / badający:], Klinika Chorób Wewnętrznych

Sponsor: Uniwersytet Medyczny Graz

Osoba kontaktowa sponsora:, Auenbruggerplatz 15, 8036 Graz

CRO:

Wnioskodawca: Univ. Klinik für Innere Medizin

Osoba kontaktowa wnioskodawcy: dr Norbert Tripolt , Auenbruggerplatz 15, 8036 Graz

Powyższe badanie zostało po raz pierwszy rozpatrzone przez Komisję Etyczną na posiedzeniu 04-16/17 w dniu 16.01.2017. Komisja etyczna doszła do następującego wniosku:

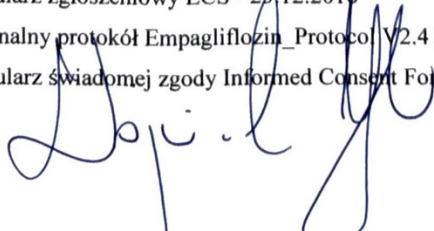
Nie stwierdzono zastrzeżeń do przeprowadzenia badania w przedstawionej formie.

Członkowie uprawnieni do głosowania lub obecni przy rozpatrywaniu: patrz załączona lista z dnia 16.01.2017.

Członkowie komisji, którzy byli uznani za stronnictwych wobec tego punktu porządku obrad i w związku z tym nie brali udziału w podejmowaniu decyzji i głosowaniu: brak.

Dokumenty przedłożone do oceny: Dokumenty wpłynęły 23.12.2016, rozpatrzone na posiedzeniu 04-16/17 w dniu 16.01.2017

- Cover Letter - 23.12.2016
- Formularz zgłoszeniowy ECS - strony podpisów - 23.12.2016
- Formularz zgłoszeniowy ECS - 23.12.2016
- Oryginalny protokół Empagliflozin_Protocol V2.4 2.4 - 15.12.2016
- Formularz świadomej zgody Informed Consent Form V1.0 1.0 - 14.12.2016



- Case Report Form CRF V1.1 1.1 - 15.12.2016
- CV prof. Hoppe (PI Salzburg) - brak wersji - 19.12.2016
- CV Dirk von Lewinski - 22.12.2016
- CV Sourij - brak wersji - 15.03.2016
- Investigator's Brochure Investigator Brochure 14 - 15.07.2016

Dokumenty wpłynęły 27.12.2016, rozpatrzone na posiedzeniu 04-16/17 w dniu 16.01.2017:

- Wniosek Część B ECS podpisany, Centrum Hoppe - 23.12.2016

Na dole strony: EK-Nummer: 29-179 ex 16/17 · Votum (28.04.2017) · Strona 1 z 3

Medizinische Universität Graz, Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz, www.medunigraz.at

Forma prawna: osoba prawna prawa publicznego zgodnie z Universitätsgesetz 2002;

informacje: Biuletyn informacyjny Uniwersytetu i www.medunigraz.at. DVR-Nr.: 210 9494.

UID: ATU 575 111 79. Dane bankowe: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000, konto nr 500 948 400 04; Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 32000, konto nr 49510.

Dokumenty wpłynęły 04.01.2017, zaopiniowane na posiedzeniu 04-16/17 w dniu 16.01.2017

- Conflict of Interest - Oświadczenie Lewinski - 03.01.2017
- Conflict of Interest - Oświadczenie Sourij - 03.01.2017
- Formularz EudraCT (CT1) - Strona podpisów - 03.01.2017
- Inne: e-mail - Oświadczenie - 04.01.2017
- Inne: Certyfikat GCP, Sourij - 10.06.2015
- Inne: Umowa z Boehringer Ingelheim - projekt

Dokumenty wpłynęły 13.01.2017, zaopiniowane na posiedzeniu 04-16/17 w dniu 16.01.2017

- Cover Letter - 12.01.2017
- Formularz EudraCT (CT1) bez daty
- Inne: E-mail - Oświadczenie do punktów w formularzu zgłoszeniowym ECS - 13.01.2017

Dokumenty wpłynęły 31.01.2017 (zaopiniowane przy następnej ocenie)

- Oryginalny protokół 2.5 - 31.01.2017
- Inne: Informator dla lekarza rodzinnego/zespół rehabilitacyjny 1.0 - 31.01.2017
- Inne: Oświadczenie w odpowiedzi na zawiadomienie o przetwarzaniu - 31.01.2017

Dokumenty wpłynęły 10.02.2017 (zaopiniowane przy następnej ocenie)

- Formularz świadomej zgody - Centrum Sourij/1.1 - 31.01.2017

Dokumenty wpłynęły 14.02.2017, zaopiniowane w „expedited Review” (przyspieszony trybie) w dniu 03.03.2017'



- Zaświadczenie ubezpieczeniowe Wiener Städtische 08-N811.957 - 14.02.2017

Dokumenty wpłynęły 18.04.2017 (zaopiniowane przy następnej ocenie)

- Cover Letter - 14.04.2017
- Protokół - Amendment 1 - 14.04.2017
- Formularz świadomej zgody 1.1 - 14.04.2017
- Inne: Formularz zgłoszenia do EK - 14.04.2017

Dokumenty wpłynęły 27.04.2017, zaopiniowane w „expedited Review” w dniu 28.04.2017

- Oryginalny protokół 2.6 - 14.04.2017

Data pierwszego votum: 03.03.2017

Komisja Etyczna stwierdza - bez skutków prawnych - przyjmuje, że jest to badanie kliniczne w rozumieniu AMG i zwraca uwagę, że przed rozpoczęciem badania należy złożyć właściwy wniosek o zezwolenie do Federalnego Urzędu ds. Bezpieczeństwa w Ochronie Zdrowia (Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen).

Votum Komisji Etycznej w żaden sposób nie zwalnia wyłącznie badacza / badaczki z odpowiedzialności za prawidłowe przeprowadzenie badania zgodnie z obowiązującymi przepisami i wytycznymi.

Ponadto zwracamy uwagę, że komisji należy niezwłocznie zgłaszać:

- odstępstwa od protokołu z powodów bezpieczeństwa lub zmiany protokołu,
- zmiany, które zwiększają ryzyko dla uczestników/uczestniczek lub istotnie wpływają na przeprowadzenie badania,
- domniemane nieoczekiwane poważne niepożądane zdarzenia - SUSARy (studia AMG od 1.5.2004),
- każde inne zdarzenie lub okoliczność, które mogą mieć wpływ na bezpieczeństwo uczestników/uczestniczek lub na przeprowadzenie badania.

Termin ważności votum obejmuje ośrodki wymienione na liście z 03.03.2017.

EK-Nummer: 29-179 ex 16/17 Votum (28.04.2017) Strona 2 z 3

Medizinische Universität Graz, Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz, www.medunigraz.at

Forma prawna: osoba prawna prawa publicznego zgodnie z Universitätsgesetz 2002;

informacje: Biuletyn informacyjny Uniwersytetu i www.medunigraz.at. DVR-Nr.: 210 9494.

UID: ATU 575 111 79. Dane bankowe: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000, konto nr 500 948 400 04; Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 32000, konto nr 49510.

Graz, 28 kwietnia 2017



(podpis)

Prof. univ. DI dr Josef Haas

Przewodniczący

(podpis)

Prof. univ. dr Hermann Toplak

Z-ca przewodniczącego

Uwaga: Prosimy we wszystkich pismach lub przy zapytaniach telefonicznych dotyczących Projektu podawać numer EK!

Nr EK: 29-179 ex 16/17 Opinia (28.04.2017) Strona 3 z 3

Uniwersytet Medyczny w Graz, Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz, www.medunigraz.at

Forma prawna: osoba prawna prawa publicznego zgodnie z ustawą uniwersytecką z 2002 r.;

informacje: Biuletyn Uniwersytetu i www.medunigraz.at. Nr DVR: 210 9494.

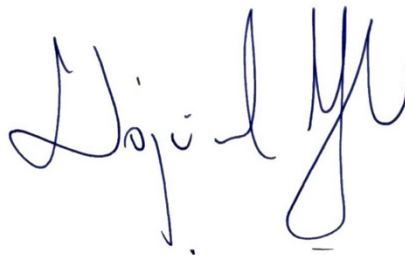
NIP (UID): ATU 575 111 79. Dane bankowe: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000, nr

konta 500 948 400 04; Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 32000, nr konta 49510.

XX
REPERTORIUM NR 2354/2026

Ja, Wojciech Szeffler, tłumacz przysięgły języka niemieckiego (TP/3467/05), poświadczam niniejszym zgodność powyższego tłumaczenia z okazanym mi oryginalnym dokumentem sporządzonym w języku niemieckim.

Ciechanów, dnia 24.04.2026



TŁUMACZENIE PRZYSIĘGŁE Z JĘZYKA NIEMIECKIEGO

[Uwagi tłumacza podano w nawiasach kursywą]

Komisja Etyczna Uniwersytet Medyczny w Grazu Auenbruggerplatz 2, A-8036

Graz ethikkommission@medunigraz.at Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Faks: -14348

Właściwe komisje etyczne i ośrodki badawcze Lista z dnia 03.03.2017

Komisja Etyczna Uniwersytetu Medycznego w Grazu Uniwersytet Medyczny w Grazu,

Klinika Chorób Wewnętrznych, Zakład Endokrynologii i Wenerologii

Prof. nadzw. dr Harald Sourij

Nr EK: 29-179 ex 16/17 Strona 1 z 1

Forma prawna: osoba prawna prawa publicznego zgodnie z ustawą o szkolnictwie wyższym z

2002 r.; informacje: Biuletyn Uniwersytetu i www.medunigraz.at. Nr DVR: 210 9494. UID

(NIP): ATU 575 111 79. Dane bankowe: Bank Austria Creditanstalt, kod banku 12000, nr

konta 500 948 400 04; Raiffeisen Landesbank Steiermark, kod banku 32000, nr konta 49510.

XX
REPERTORIUM NR 2355/2026

Ja, Wojciech Szeffler, tłumacz przysięgły języka niemieckiego (TP/3467/05), poświadczam niniejszym zgodność powyższego tłumaczenia z okazanym mi oryginalnym dokumentem sporządzonym w języku niemieckim.

Ciechanów, dnia 24.04.2026

