

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej
Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej



Grażyna Sygitowicz

**ROLA NOWYCH BIOMARKERÓW
W DIAGNOSTYCE, OCENIE SKUTECZNOŚCI LECZENIA
I PATOFIZJOLOGII CHORÓB UKŁADU
SERCOWO-NACZYNIOWEGO**

Autoreferat

(Załącznik 2)

Warszawa 2016

Zawartość Autoreferatu (Załącznika 2):

1. Nazwisko i imię
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podzieleniem miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych
4. Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego
 - Tytuł zgłoszonego osiągnięcia naukowego
 - Prace oryginalne
 - Komunikaty zjazdowe, prezentowane na Krajowych i Międzynarodowych Konferencjach Naukowych
 - Komunikaty zjazdowe, prezentowane na Międzynarodowych Konferencjach Naukowych (dane jeszcze nie opublikowane w postaci publikacji)
- 4.1. *Wprowadzenie i cel badań*
- 4.2. *Modyfikowana niedokrwieniem albumina – rola w diagnostyce zawału mięśnia sercowego*
- 4.3. *Rola miRNA-208a w diagnostyce zawału serca*
- 4.4. *Rola cząsteczek miRNA w patofizjologii niewydolności serca*
- 4.5. *Mieloperoksydaza jako marker ryzyka oraz skuteczności leczenia statynami*
- 4.6. *Najważniejsze rezultaty i wnioski wynikające z przeprowadzonych badań, wchodzący w skład osiągnięcia*
- 4.7. *Ograniczenia*
- 4.8. *Podziękowania*
- 4.9. *Piśmiennictwo cytowane*
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych
 - 5.1. *Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora*
 - 5.2. *Działalność naukowo-badawcza inna niż zgłoszona do postępowania habilitacyjnego, po uzyskaniu stopnia doktora*
6. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

1. IMIĘ I NAZWISKO:

Grażyna Sygitowicz

**2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE –
Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ
TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.**

1986 – 1992 studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie (kierunek analityka kliniczna).

30.03.1992 uzyskanie stopnia magistra farmacji,
praca magisterska: „Zaburzenia gospodarki lipidowej i lipoproteinowej u dzieci z cukrzycą typu I” pod naukowym kierownictwem prof. dr hab. Jana Pachecka.

24.10.1995 I° specjalizacji z analityki klinicznej (Dyplom I° specjalizacji).

7.06.2000 uzyskanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych,
rozprawa doktorska: „Zaburzenia metabolizmu lipoprotein u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą typu I w warunkach intensywnej insulinoterapii”.

Promotor: prof. dr hab. Jan Pachecka.

Recenzenci: prof. dr hab. Artur Czyżyk,
prof. dr hab. Marek Naruszewicz,
prof. dr hab. Wiesław Piechota.

24.04.2003 II° specjalizacji z analityki klinicznej (Dyplom specjalisty II°).

15.11.2006 Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego na Obszarze Rzeczypospolitej Polskiej, na podstawie Uchwały Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych z dnia 15 października 2003 roku, o numerze: **AA 03334**.

12.04.2010 Prawo Wykonywania Zawodu Farmaceuty na Obszarze Rzeczypospolitej Polskiej, na podstawie Uchwały Okręgowej Rady Aptekarskiej z dnia 9 kwietnia 2010 roku, o numerze: **19008547**.

13.12.2011 Specjalista w dziedzinie Zdrowie publiczne.

**3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU
W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH**

11.11.1991 - 30.04.1994 etat inżynieryjno-techniczny w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie.

1.05.1994 - 30.09.2001 asystent w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie.

1.10.2001 – 30.09.2010 adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie.

1.10.2010 - nadal adiunkt w Zakładzie Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej Katedry Biochemii i Chemii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

1.06.1993 – 31.12.2015 asystent w Centralnym Laboratorium Samodzielnego Publicznego Centralnego Szpitala Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego ul. Banacha 1a (praca w systemie dyżurowym).

4. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE ZGŁOSZONE DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO

(wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Tematem zgłoszonego osiągnięcia jest: „*Rola nowych biomarkerów w diagnostyce, ocenie skuteczności leczenia i patofizjologii chorób układu sercowo-naczyniowego*”. Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl siedmiu prac, opublikowanych w latach: 2013-2016 oraz dziesięć komunikatów, zaprezentowanych na Zjazdach Międzynarodowych i Krajowych Towarzystw Naukowych. Wykaz publikacji oryginalnych i komunikatów zjazdowych, stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego, został zamieszczony poniżej. W spisie publikacji podano współczynniki oddziaływania czasopisma (*Impact factor IF – ISI Journal Citation Report*) oraz punktację KBN/MNiSW i IC według Ujednoliconego Wykazu Czasopism Naukowych prowadzonego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Wartości powyższych współczynników zostały przygotowane przez Bibliotekę Główną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (stan na rok opublikowania).

1. Prace oryginalne

- 1.1. **Sygitowicz G**, Janas J, Białek S, Pręgowski J, Pera Ł, Sitkiewicz D. Ischaemia modified albumin in patients with acute coronary syndrome and negative cardiac troponin I. *Scan J Clin Lab Invest* 2013; 73(2): 130-134. (IF=2.009, KBN/MNiSW=20, IC= -)
Wkład własny: współudział w koncepcji badań, zaplanowaniu badań, opracowaniu i analizie statystycznej uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 70%.
- 1.2. Maciejak A, Leszczynska A, Warchol I, Gora M, Kaminska J, Plochocka D, Wysocka-Kapcinska M, Tulacz D, Siedlecka J, Swiezewska E, Sojka M, Danikiewicz W, Odolczyk N, Szkopinska A, **Sygitowicz G**, Burzynska B. The effects of statins on the mevalonic acid pathway in recombinant yeast strains expressing human HMG-CoA reductase. *BMC Biotechnology* 2013; 13(1): 68-78. (IF=2.592, KBN/MNiSW=30, IC= -)
Wkład własny: współudział w zaplanowaniu badań, opracowaniu uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 6.5%.
- 1.3. **Sygitowicz G**, Białek S, Wrzosek M, Pręgowski J, Sitkiewicz D. Ischaemia modified albumin after elective percutaneous coronary intervention. *Diagn Lab* 2014; 50(4): 307-310. (IF= -, KBN/MNiSW=3, IC= 4.08)
Wkład własny: współudział w koncepcji badań, zaplanowaniu badań, analizie statystycznej uzyskanych wyników i ich opracowaniu, przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 70%.

- 1.4. Białek S, Górko D, Zajkowska A, Kołtowski Ł, Grabowski M, Stachurska A, Kochman J, **Sygitowicz G**, Małecki M, Opolski G, Sitkiewicz D. Release kinetics of circulating miRNA-208a in the early phase of myocardial infarction. *Kard Pol* 2015; 73(8): 613-619. (IF=0.539, KBN/MNiSW=15, IC=12.03)
Wkład własny: współudział w koncepcji badań, analizie statystycznej uzyskanych wyników i ich opracowaniu, przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 25%.
- 1.5. **Sygitowicz G***, Tomaniak M, Błaszczuk O, Kołtowski Ł, Filipiak KJ, Sitkiewicz D. Circulating microribonucleic acids: miR-1, miR-21 and miR-208a in patients with symptomatic heart failure: Preliminary results. *Arch Cardiovasc Dis* 2015; 108: 634-642. (IF=2.140, MNiSW=25, IC= -)
Wkład własny: współudział w koncepcji badań, zebraniu materiału klinicznego, wykonaniu badań, opracowaniu i analizie statystycznej uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 40%.
- 1.6. **Sygitowicz G***, Tomaniak M, Filipiak KJ, Kołtowski Ł, Sitkiewicz D. Galectin-3 in patients with acute heart failure – preliminary report on first Polish experience. *Adv Clin Exp Med* 2016; 4. DOI: 10.17219/acem/51615. (IF=1.095, KBN/MNiSW=15, IC=10.24)
Wkład własny: współudział w koncepcji badań, zebraniu materiału klinicznego, zaplanowaniu i wykonaniu badań, opracowaniu i analizie statystycznej uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 60%.
- 1.7. **Sygitowicz G***, Maciejak A, Piniewska-Juraszek J, Pawlak M, Góra M, Burzyńska B, Dłużniewski M, Opolski G, Sitkiewicz D. Interindividual variability of atorvastatin treatment on the *MPO* gene expression in patients after acute myocardial infarction. *Acta Bioch Pol* 2016; 63. DOI: 10.18388/abp.2015_1014. (IF=1.153, KBN/MNiSW=15, IC= -)
Wkład własny: współudział w koncepcji badań, zebraniu materiału klinicznego, wykonaniu badań, opracowaniu i analizie statystycznej uzyskanych wyników a także w przygotowaniu manuskryptu i w korekcie edytorskiej. Mój udział szacuję na 60%.

*Publikacje, w których jestem autorem korespondencyjnym.

Łącznie (prace 1.1 – 1.7): **IF = 9.528, KBN/MNiSW=123, IC=26.35.**

Wykaz komunikatów zjazdowych (n=10), prezentujących wyniki badań doświadczalnych stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego został zamieszczony poniżej.

2. Komunikaty zjazdowe, prezentowane na Krajowych i Międzynarodowych Konferencjach Naukowych:

- 2.1. Janas J, **Sygitowicz G**, Białek S, Pręgowski J, Tarnowska A, Sitkiewicz D. Modyfikowana niedokrwieniem albumina u pacjentów z zawałem serca. XVII Naukowy Zjazd PTDL - Wisła 2010. *Diagn Lab* 2010; 46(2): 233 (Ustne doniesienie 8-U-3).
- 2.2. **Sygitowicz G**, Pręgowski J, Białek S, Sitkiewicz D. Ischemia modified albumin after elective percutaneous coronary intervention. IFCC WorldLab - Berlin 2011. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(Special Suppl.): S344 (Poster Abstract 0298).

- 2.3. Sygitowicz G, Maciejak A, Pawlak M, Gajda S, Piniewska J, Burzyńska B, Opolski G, Dłużniewski M, Sitkiewicz D. Wpływ atorwastatyny na ekspresję genu mieloperoksydazy (MPO) i stężenie białka C-reaktywnego (CRP) u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca. I Polski Kongres Farmakogenetyki, VI Kongres PTFKiT: Geny i Leki - Poznań 2012. (Abstract Book 33-34).
- 2.4. Maciejak A, Leszczyńska A, Kamińska J, Płochocka D, Góra M, Wiek I, Tułacz D, Siedlecka J, Świeżewska E, Sojka M, Danikiewicz W, Sygitowicz G, Burzyńska B. Badanie wpływu statyn na komórkę z użyciem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. I Polski Kongres Farmakogenetyki, VI Kongres PTFKiT: Geny i Leki - Poznań 2012. (Abstract Book 34).
- 2.5. Maciejak A, Sygitowicz G, Pawlak M, Piniewska J, Burzyńska B. The anti-inflammatory effects of statins therapy in patients with acute myocardial infarction. 5th Pan Arab, Human Genetics Conference and 2013 Golden Helix Symposium - Dubai, United Arab Emirates 2013: 104 (Abstract Book P99).
- 2.6. Białek S, Górko D, Zajkowska A, Sygitowicz G, Kołtowski Ł, Stachurska A, Grabowski M, Małecki M, Opolski G, Sitkiewicz D. Potential implication of circulating miR-208a into diagnose of acute myocardial infarction. IFCC WorldLab - Istanbul 2014. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52, Special Suppl. S500 (Poster Abstract 0311).
- 2.7. Sygitowicz G, Tomaniak M, Kołtowski Ł, Białek S, Filipiak KJ, Sitkiewicz D. Galectin-3 in patients with acute heart disease – preliminary report. IFCC WorldLab - Istanbul 2014. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52, Special Suppl. S532 (Poster Abstract 0344).

3. Komunikaty zjazdowe, prezentowane na Międzynarodowych Konferencjach Naukowych (dane jeszcze nie opublikowane w postaci publikacji):

- 3.1. Tomaniak M, Sygitowicz G, Filipiak KJ, Blaszczyk O, Kołtowski Ł, Gasecka A, Kochanowski J, Sitkiewicz D. miR-1, miR-21 and galectin-3 in symptomatic heart failure patients with left ventricle dilatation. EHA - Wien 2015. *Eur Heart J: Acute Cardiovascular Care* 2015; 4: 87 (P219).
- 3.2. Tomaniak M, Sygitowicz G, Filipiak KJ, Blaszczyk O, Kołtowski Ł, Malesa K, Puchta D, Kochanowski J, Sitkiewicz D. Circulating microRNAs: miR-1, miR-21 and galectin-3 in patients with symptomatic heart failure and left atrium enlargement. EHA - Wien 2015. *Eur Heart J: Acute Cardiovascular Care* 2015; 4: 214 (P531).
- 3.3. Tomaniak M, Sygitowicz G, Filipiak KJ, Blaszczyk O, Kołtowski Ł, Malesa K, Puchta D, Kochanowski J, Sitkiewicz D. miR-1, miR-21 and galectin-3 in hypertensive patients with symptomatic ischaemic heart failure and left ventricle hypertrophy. EHA - Wien 2015. *Eur Heart J: Acute Cardiovascular Care* 2015; 4: 101 (P246).

Badania przedstawione jako osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego były prowadzone w ramach grantu NCN 4987/B/PO1/2011/40 „*Osoczowy miRNA-208 jako biomarker uszkodzenia mięśnia sercowego*” w latach 2011-2014 oraz w ramach działalności statutowej Zakładu Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej Katedry Biochemii i Chemii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego FW114/N/2012 „*Badania mechanizmów plejotropowego działania statyn*” w latach 2011-2013. W obydwu projektach należałam do jednych z głównych wykonawców a kierownikiem obydwóch projektów był prof. Dariusz Sitkiewicz, ówczesny Kierownik Katedry Biochemii i Chemii Klinicznej i Zakładu Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

CEL NAUKOWY WYMIENIONYCH PRAC, OSIĄGNIĘTE WYNIKI I ICH WYKORZYSTANIE

4.1. WPROWADZENIE i CEL BADAŃ

Choroby układu sercowo-naczyniowego od lat stanowią główną przyczynę zgonów na świecie. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2008 r. choroby te były przyczyną ponad 17 mln zgonów, co stanowiło blisko 27% wszystkich zgonów. W tym czasie odnotowano ponad 20%-owy wzrost liczby zgonów w stosunku do statystyk z początku lat 90-tych [1]. W 2011 roku w Polsce wskaźniki śmiertelności sercowo-naczyniowej (skorygowane o wiek) wynosiły u mężczyzn 415.3 na 100 tys. osób, natomiast u kobiet były prawie o połowę niższe i wynosiły 244.8 na 100 tys. osób [2].

Choroby układu krążenia na podłożu miażdżycy w chwili obecnej obok chorób nowotworowych stanowią najpoważniejsze zagrożenie dla zdrowia i życia ludności w krajach rozwiniętych, w tym również w Polsce. Choroby te, stanowiąc niezwykle istotny problem w systemie opieki zdrowotnej, są często rozpatrywane w aspekcie ekonomiczno-społecznym. Raport Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) już w 2004 roku wskazywał, że w Polsce tylko w ciągu jednego roku w szpitalach przebywało z powodu chorób układu krążenia aż 987 258 osób, co stanowiło w tym czasie 44% wszystkich hospitalizowanych pacjentów [3-4]. W roku 2011 – liczba osób hospitalizowanych z powodu chorób układu krążenia wynosiła ogółem: 1 082 652. Do najczęściej występujących chorób należała: choroba niedokrwienna serca (291 012 osób hospitalizowanych, w tym zawał serca – 76 693 osób co stanowiło 26.9% oraz 7.1% ogólnej liczby hospitalizowanych z powodu chorób układu krążenia), niewydolność serca (169 239 osób, 15.6%) oraz choroby naczyń mózgu (124 839 osób, 11.5%) [5].

W populacji polskiej nie tylko istotną rolę ograła sama zachorowalność na choroby układu sercowo-naczyniowego ale również wysoka umieralność z nimi związana. W latach 1960-1991 wzrost umieralności w Polsce był w zdecydowanej mierze spowodowany chorobą niedokrwienną serca. Okresem przełomowym był rok 1991, po którym obserwowano powolny, aczkolwiek zauważalny i systematyczny spadek liczby zgonów z powodu chorób układu krążenia [6]. Aktualne wskaźniki umieralności z powodu chorób układu krążenia a zwłaszcza wieloletnie trendy zmian są bardziej korzystne w Polsce niż w większości krajów Środkowej i Wschodniej Europy. Redukcja umieralności z powodu chorób układu krążenia była najważniejszym czynnikiem, który spowodował wyraźne wydłużanie średniej długości życia społeczeństwa polskiego w latach 1991-2005 [5].

Spadek umieralności na choroby układu krążenia jest efektem: 1). działania prewencyjnego zarówno w zakresie tzw. prewencji pierwotnej, jak i prewencji wtórnej, 2). znaczącego rozwoju kardiologicznych technik interwencyjnych oraz 3). postępu w diagnostyce zarówno obrazowej, jak i laboratoryjnej. Ostatnie lata ubiegłego i pierwsza dekada obecnego stulecia to szybki rozwój badań nad rolą biochemicznych markerów zarówno w diagnostyce, jak również w identyfikacji pacjentów wysokiego ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Biomarkery stanowią swoistą „biopsję biochemiczną” dostarczającą informacji nie tylko diagnostycznych, ale także pozwalających określić zakres uszkodzeń i zaawansowania procesu patologicznego. W literaturze opisywanych jest około 100 różnych biomarkerów, obrazujących różne szlaki patofizjologiczne. Spośród wielu biomarkerów sercowych tylko dla czterech z nich zostało udowodnione istotne znaczenie kliniczne zgodnie z kryteriami medycyny laboratoryjnej opartej na dowodach naukowych. Są nimi: sercowe troponiny I i T (cTnI i cTnT), peptyd natriuretyczny typu B (BNP, NT-proBNP), białko C-reaktywne (CRP) oraz dimer D. Powyższe markery nie spełniają jednak wszystkich oczekiwań kardiologów. Te wątpliwości upoważniają mnie do podjęcia badań (zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego), których **celem było określenie roli nowych biomarkerów w diagnostyce, ocenie skuteczności leczenia i patofizjologii chorób układu sercowo-naczyniowego.** Szczególną uwagę skupiłam na: modyfikowanej niedokrwieniem albuminie (*Ischaemia Modified Albumin, IMA*), galektynie-3 (*Galectin-3, Gal-3*), cząsteczkach miRNA (*Microribonucleic acids, miRNAs, miRs*) oraz mieloperoksydazie (*Mieloperoxidase, MPO*). Biomarkery te badałam i analizowałam w różnych sytuacjach klinicznych. Badania opublikowane w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego obejmują następujące obszary tematyczne:

1. określenie roli IMA w diagnostyce ostrego zawału serca a także w monitorowaniu uszkodzeń kardiomiocytów w następstwie interwencyjnych zabiegów wieńcowych.
2. określenie roli wybranych cząsteczek miRNA we wczesnej fazie zawału serca, jak i w patomechanizmach niewydolności serca.
3. znaczenie MPO i ekspresji genu *MPO* do oceny skuteczności leczenia, szczególnie w prewencji wtórnej pacjentów po zawale serca.

Ad.1. Istotnym problemem klinicznym jest szybkie potwierdzenie i/lub wykluczenie ostrego zespołu wieńcowego. Powszechnie stosowane oznaczanie sercowych troponin nie we wszystkich przypadkach pacjentów z podejrzeniem zawału serca pozwala na szybkie i jednoznaczne jego rozpoznanie. Spowodowane jest to faktem, iż w wielu stanach

patologicznych, często niezwiązanych z incydem wieńcowym, dochodzi do „wyrzutu” troponin do krążenia. Coraz częściej spotyka się też opinię, że w takich sytuacjach dobrym rozwiązaniem byłaby strategia multimarkerowa. Rolą takiego „dodatkowego” biomarkera byłoby wskazanie na mechanizm odpowiedzialny za uwolnienie troponin. Idealnym markerem obrazującym niedokrwienny mechanizm uwalniania troponin z kardiomiocytów wydaje się być modyfikowana niedokrwieniem albumina. Dlatego też podjęte badania dotyczyły określenia przydatności IMA zarówno w przypadkach ostrego/nieodwracalnego zawału serca, jak i odwracalnego niedokrwienia miocytów w następstwie interwencji wieńcowych (*publikacje 1.1, 1.3 oraz komunikaty 2.1, 2.2*).

Ad.2. Rozwój wiedzy w zakresie biologii molekularnej i mechanizmów odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym zwrócił moją uwagę na rolę cząsteczek miRNA tak w patofizjologii, jak i w diagnostyce chorób układu krążenia. Celem realizowanych badań było określenie mechanizmów i kinetyki uwalniania miRNA-208a we wczesnej fazie zawału serca a także roli cząsteczek miRNA-1 i miRNA-21 w patomechanizmach niewydolności serca. Poszukiwałam również zależności pomiędzy zmianami ekspresji krążących cząsteczek miRNA a stężeniami: NT-proBNP jako markera funkcji serca oraz galektyny-3 jako markera zwłóknienia a także zmianami strukturalnymi serca (*publikacje 1.4, 1.5, 1.6 oraz komunikaty 2.6, 2.7, 3.1, 3.2, 3.3*).

Ad.3. Z punktu widzenia oceny skuteczności leczenia, szczególnie w prewencji wtórnej pacjentów po zawale serca, w przedstawianych badaniach skupiłam się na wpływie statyn na stężenie MPO i ekspresję genu *MPO* na tle ich efektów hipolipemicznych i przeciwzapalnych. Liczne badania wskazują, że frakcje lipoproteinowe nie są jednorodnymi cząstkami i wykazują niezwykle zróżnicowane oddziaływania tak w przebiegu miażdżycy, jak i w jej klinicznych powikłaniach. Zainteresowanie MPO wynika także z faktu, że jest to enzym aktywnie zaangażowany w powstawanie aterogennych form LDL (ox-LDL) a także tworzenia dysfunkcyjnych cząstek HDL w krążeniu (*publikacje 1.2, 1.7 oraz komunikaty 2.3, 2.4, 2.5*).

4.2. MODYFIKOWANA NIEDOKRWIENIEM ALBUMINA - ROLA W DIAGNOSTYCE ZAWAŁU MIĘŚNIA SERCOWEGO (publikacje 1.1, 1.3 oraz komunikaty 2.1, 2.2)

Uznawanym powszechnie złotym standardem w diagnostyce zawału mięśnia sercowego są sercowe izoformy troponin I i T [7]. Historia troponin rozpoczęła się jeszcze w latach 80-tych ubiegłego stulecia. Przełomowym momentem okazał się jednak ostatni rok XX wieku, kiedy to opublikowano dokument Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i Amerykańskiego Kolegium Kardiologów o redefinicji zawału mięśnia sercowego [8]. W dokumencie tym uznano sercowe izoformy troponiny T lub I za złoty standard w diagnostyce zawału serca. Dokument ten definiował zawał jako kliniczną sytuację, w której stężenie troponin w surowicy krwi przekracza poziom 99-tego percentyla wyznaczonego dla zdrowej populacji. Jednocześnie dodano warunek, aby precyzja oznaczeń na tym poziomie stężeń nie przekraczała CV - 10%. Ten warunek okazał się jednak dla ówczesnych testów bardzo trudny do spełnienia. Opublikowany w 2004 roku raport Komitetu Standaryzacji Markerów Uszkodzenia Serca Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej wyraźnie pokazał, że żaden z dostępnych wówczas na rynku testów troponinowych nie osiągał precyzji CV <10% na poziomie stężenia 99-tego percentyla przyjętego jako limit referencyjny definiowany przez producenta testu [9]. Innym, poważnym dylematem klinicznym był fakt, że u blisko 50% pacjentów zgłaszających się do szpitala z objawami sugerującymi podejrzenie ostrego zespołu wieńcowych nie stwierdzano stężenia troponin powyżej przyjętego poziomu decyzyjnego [10]. Istotnie wyższe stężenia troponin, świadczące o martwicy kardiomiocytów wykrywano dopiero po około 6-ciu godzinach od wystąpienia objawów.

Pod koniec ubiegłej dekady opublikowano pierwsze prace dotyczące wczesnej diagnostyki zawału mięśnia sercowego, w których oznaczenia sercowej troponiny I wykonywano testami o wysokiej czułości (hs-cTnI) [11-12]. Badania te wykazały, że w czasie do 6-ciu godzin od wystąpienia objawów u blisko 90% pacjentów stwierdzano stężenia cTnI przekraczające wartość 99-tego percentyla zdrowej populacji. Wydawało się wówczas, że te nowe, wysokoczułe testy stanowią będą znaczący postęp w biochemicznej diagnostyce kardiologicznej. Szybko jednak pojawiły się problemy interpretacyjne, szczególnie niskich stężeń troponin. Zakres detekcji nowych testów obejmuje fizjologiczny poziom troponin, jak również ich stężenie w wielu chorobach sercowo-naczyniowych a nie tylko martwicę komórek mięśnia sercowego, powodowaną incydem niedokrwiennym [13].

Stężenia troponin wykrywane testami starszej generacji były na tyle wysokie, iż pozwalały na niemal jednoznaczną interpretację diagnostyczną. Stąd prawdopodobnie gorzka konstatacja profesora Roberta Jesse'go, iż dawne „*marnie*” analityczne testy były „*wielkimi*” badaniami diagnostycznymi [14]. Zastosowanie wysoko czułych testów udowodniło, że stężenie troponin w surowicy jest zmienną ciągłą a interpretacja wyniku wymaga szczegółowego uwzględnienia kontekstu klinicznego, decydującego o dalszym postępowaniu z pacjentem. Wprowadzenie testów o wysokiej czułości zaowocowało więc znacznym obniżeniem diagnostycznej swoistości testu i spowodowało istotne trudności interpretacyjne szczególnie w grupie pacjentów niskiego ryzyka i niewielkiego przedtestowego prawdopodobieństwa ostrego zespołu wieńcowego. W tej grupie pacjentów obserwuje się często wyniki fałszywie dodatnie [15]. Rozróżnienie wzrostu stężenia troponin jako następstwa niedokrwienia prowadzącego do martwicy kardiomiocytów od przewlekłego, podwyższonego poziomu troponin wymaga oznaczeń seryjnych, wykonywanych w momencie prezentacji pacjenta (czas 0) oraz po 3 godzinach [16]. Obserwacja dynamiki wzrostu i/lub spadku stężenia troponin stanowi bardzo istotny czynnik wpływający na ostateczne rozpoznanie. Badania Apple i wsp. [17] pokazują, że już wzrost o 30% stężenia hs-cTnI obserwowany po 3 godzinach od pierwszego oznaczenia podnosi swoistość diagnostyczną i umożliwia ocenę ryzyka. Z drugiej strony, na podstawie analizy krzywych ROC, Giannitsis i wsp. [18] sugerują, że dopiero zmiana $\geq 117\%$ stężenia hs-cTnT powoduje istotny wzrost swoistości diagnostycznej.

W przypadkach wątpliwych, oznaczenie innych markerów może stanowić istotną pomoc tak w ocenie krótkoterminowego ryzyka, jak i w odróżnieniu pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym od pacjentów z innymi zdarzeniami klinicznymi, w których dochodzi do wzrostu stężenia troponin w surowicy krwi [19]. Warunkiem rozpoznania ostrego zespołu wieńcowego jest nie tylko stwierdzenie wzrostu stężenia sercowych troponin w surowicy krwi, ale również wykazanie niedokrwiennego mechanizmu ich uwalniania. Wzrost stężenia troponin oznacza uszkodzenie kardiomiocytów, ale nie obrazuje mechanizmu uwalniania troponin z miocytów serca.

Jednym z narzędzi pomocnych w definiowaniu mechanizmu odpowiedzialnego za uwolnienie markerów martwicy (cTnI, CK-MB) mogą być markery niedokrwienia. Takim markerem jest modyfikowana niedokrwieniem albumina [20-21]. IMA powstaje w stanie niedokrwienia mięśnia sercowego w następstwie hipoksji, kwasicy, uszkodzeń powodowanych przez reaktywne formy tlenu i zależne od energii zmiany przepuszczalności błon komórkowych. W stanie niedokrwienia mięśnia sercowego dochodzi do zmian

w strukturze N-końcowego regionu albuminy o sekwencji aminokwasów: N-Asp-Ala-His-Lys. Zmiany te powodują obniżenie zdolności wiązania przez albuminę jonów metali: kobaltu, miedzi oraz niklu [22-23]. Szczegółowy mechanizm prowadzący do modyfikacji albuminy nie jest dotychczas poznany. Niektóre badania sugerują, że generowane podczas niedokrwienia reaktywne formy tlenu prowadzą do modyfikacji N-końcowego regionu cząsteczek krążącej albuminy powodując zmiany wiązania jonów metali [20,24]. Zmiany te stały się podstawą do opracowania testu wiązania kobaltu ACB (*Albumin Cobalt Binding*), który pozwala na wykrycie i oznaczenie stężenia modyfikowanej niedokrwieniem albuminy w surowicy krwi.

W prezentowanych badaniach (*publikacja 1.1 oraz komunikat 2.1*) została podjęta próba oceny przydatności oznaczania stężenia IMA, w przypadkach pacjentów z podejrzeniem ostrego zespołu wieńcowego, u których stężenie sercowej troponiny I w momencie prezentacji nie przekraczało wartości decyzyjnej (co oznacza *wynik negatywny cTnI*). Badanych pacjentów podzielono na dwie podgrupy w zależności od końcowego rozpoznania: 1). zawał z przetrwałym uniesieniem odcinka ST (STEMI) oraz 2). zawał bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI). Badania te wykazały, że IMA jest wczesnym markerem niedokrwienia mięśnia sercowego. Wzrost stężenia IMA następuje przed pojawieniem się cTnI w krążeniu, nawet w warunkach braku zmian sugerujących niedokrwienie w zapisie Ekg (uniesienie odcinka ST). Analiza uzyskanych wyników wykazała, że stężenie IMA powyżej 104.0 U/ml identyfikuje pacjentów z niedokrwieniem z czułością 72.1% (95% CI 56.3-84.7) oraz swoistością 75.6% (95% CI: 60.5-87.1). Krzywe ROC (*Receiver Operator Characteristic*) nie wykazały różnic pomiędzy pacjentami STEMI i NSTEMI (AUC odpowiednio 0.752 (95% CI: 0.629-0.874) i 0.793 (95% CI: 0.645-0.940). Ponadto, uzyskane wyniki demonstrują, że zabieg rewaskularyzacji zarówno u pacjentów z STEMI, jak i NSTEMI nie jest związany ze wzrostem stężenia IMA w surowicy. Wczesna reperfuzja chroni niedokrwione miokardium przed uszkodzeniami powodowanym reaktywnymi formami tlenu, generowanymi po przywróceniu krążenia w objętej zawałem strefie mięśnia sercowego. Jednocześnie wyniki te stały się podstawą do dalszych badań dotyczących tworzenia IMA w warunkach odwracalnego niedokrwienia mięśnia sercowego, do którego dochodzi podczas planowych zabiegów angioplastyki wieńcowej u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową (*publikacja 1.3 oraz komunikat 2.2*). U tych pacjentów zaobserwowałam istotnie wyższe stężenia IMA w porównaniu z grupą osób zdrowych (120.1±33.2 U/ml vs 96.2±6.1 U/ml; $p < 0.0001$). Stężenie to przekraczało znacznie wyznaczony w poprzednich badaniach punkt odcięcia różnicujący pacjentów

z niedokrwieniem od pacjentów bez niedokrwienia, który wynosił 104.0 U/ml. W oparciu o uzyskane wyniki uzasadnione jest twierdzenie, że stabilna choroba wieńcowa jest związana ze stanem przewlekłego względnego niedokrwienia mięśnia sercowego, objawiającego się wysokim stężeniem IMA w surowicy krwi. Zabieg angioplastyki wieńcowej u tych pacjentów powodował znamienny wzrost stężenia IMA (132.1 ± 25.6 U/ml). Po 6-ciu godzinach stężenie IMA powracało do poziomu obserwowanego przed zabiegiem. Podkreślenia wartym jest fakt, że stężenie cTnI bezpośrednio po zabiegu nie różniło się od stężenia przed zabiegiem. Niewielki, ale znamienny statystycznie wzrost obserwowano dopiero po 6-ciu godzinach. Podsumowując przedstawione wyniki badań wskazują, że generacja IMA jest związana z niedokrwieniem mięśnia sercowego. Oznaczanie stężenia IMA u pacjentów z podejrzeniem ostrego zawału serca i jednocześnie ujemnym wynikiem stężenia troponiny lub też przy jego niewielkim wzroście pozwala na sprecyzowanie niedokrwiennego mechanizmu uszkodzenia kardiomiocytów. Oznaczenie stężenia IMA u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową może być pomocne w podjęciu decyzji o kwalifikacji do zabiegu angioplastyki wieńcowej, bowiem jej stężenie obrazuje przewlekły stan niedokrwienia serca co wpływa na obraz kliniczny choroby. Ciekawą obserwacją jest stwierdzenie różnic w stężeniach IMA po zabiegach pierwotnej angioplastyki w ostrej fazie zawału w porównaniu do zabiegów planowych u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową. Zabieg przeprowadzany w warunkach ostrego niedokrwienia nie był powiązany ze zmianami stężenia IMA, podczas gdy wykonywany w warunkach przewlekłego niedokrwienia powodował istotny wzrost stężenia tego markera. Na pytanie o przyczyny tak różnego efektu zabiegów wieńcowych na generację IMA trudno udzielić jednoznacznej odpowiedzi. Wydaje się jednak prawdopodobnym, że przewlekłe niedokrwienie miokardium czyni je bardziej wrażliwym, nawet na niewielkie, odwracalne niedokrwienie co manifestuje się istotnym zwiększeniem generacji IMA. Proces ten jednak, nie prowadzi do martwicy kardiomiocytów. Niewielki wzrost stężenia cTnI nie przekracza bowiem wartości charakterystycznych dla martwicy i pochodzi prawdopodobnie z cytozolowej puli troponin.

Podsumowując, przedstawione badania wyraźnie wskazują, że IMA spełnia kryteria wczesnego biomarkera niedokrwienia mięśnia sercowego zarówno w przypadkach ostrych zespołów wieńcowych, jak i monitorowania ewentualnych uszkodzeń kardiomiocytów w przebiegu planowych zabiegów koronaroplastyki połączonej z implantacją stentu. Stężenie IMA powyżej wyznaczonej wartości różnicującej (104.0 U/ml) pozwala na wykazanie niedokrwiennej etiologii bólu w klatce piersiowej.

4.3. ROLA miRNA-208a W DIAGNOSTYCE ZAWAŁU SERCA (publikacja 1.4 oraz komunikat 2.6)

W poszukiwaniu biochemicznych markerów wspomagających wczesną diagnostykę zawału mięśnia sercowego zwrócono uwagę na odkryte w 2003 roku cząsteczki miRNA [25]. Obecność cząsteczek miRNA po raz pierwszy została wykazana u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Badania Craiga C. Mello i Andrew Z. Fire przyczyniły się do poznania mechanizmu działania cząsteczek miRNA [26]. Za prace nad miRNA obaj badacze zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w 2006 roku. Odkrycia te wskazują na możliwość sterowania liczbą cząsteczek mRNA w komórce za pomocą miRNA, niezależnie od tempa transkrypcji DNA. Pozwala to na wyciszenie czy wręcz hamowanie ekspresji genów odpowiedzialnych za występowanie niektórych chorób.

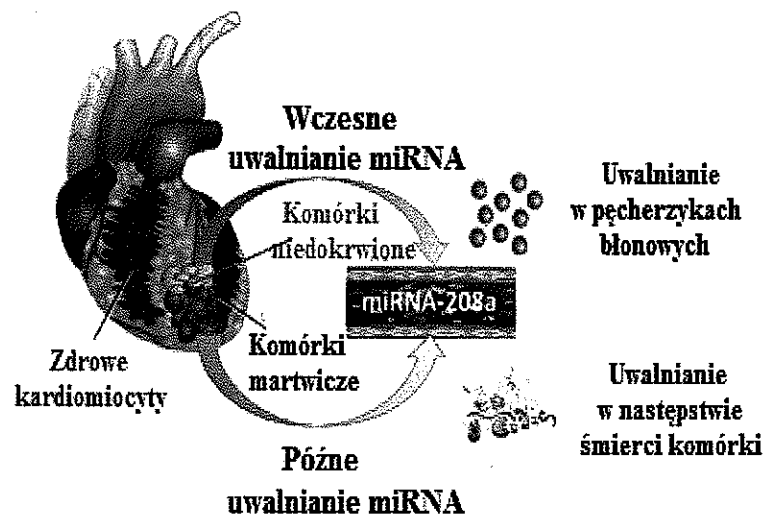
miRNA należą do grupy małych niekodujących RNA (sncRNAs), zawierających 17–25 nukleotydów. Szacuje się, że ludzki genom jest w stanie kodować około 1000 różnych miRNA. Dotychczas zidentyfikowano około 721 odmiennych cząsteczek miRNA. Fragmenty genomu kodujące miRNA, występują zarówno między genami kodującymi białka jak również w intronach a nawet egzonach tych genów [27-28].

Biogeneza miRNA jest procesem złożonym, w którym zaangażowane są dwie różne endonukleazy: Drosha i Dicer; składa się z dwóch etapów (jeden w jądrze i jeden w cytoplazmie). W jądrze endonukleaza Drosha katalizuje przemianę prekursorowej cząsteczki pri-miRNA w pre-miRNA. Pre-miRNA jest transportowane do cytoplazmy przez eksportynę-5. W cytoplazmie, przy udziale endonukleazy Dicer powstaje dojrzałe miRNA, które jest inkorporowane jako pojedyncza nić RNA do kompleksu RISC (*RNA induced silencing complex*), który umożliwia przyłączenie miRNA do miejsca docelowego 3'nieulegającego translacji regionu mRNA, prowadząc do zahamowania translacji lub degradację mRNA. Celem każdego miRNA może być kilka różnych mRNA, jednocześnie na daną cząsteczkę mRNA może oddziaływać kilka różnych miRNA [29].

Badania Ji i wsp. [30] wykazały ekspresję miRNA-208 wyłącznie w kardiomiocytach obu komór i przedsionków serca szczura. Autorzy ci stwierdzili zwiększoną ekspresję miRNA-208 w doświadczalnym modelu indukowanego izoproterenolem uszkodzenia serca. Poziom ekspresji krążącego miRNA-208 korelował ze wzrostem stężenia cTnI. Ten model doświadczalny różni się jednak znacznie od niedokrwienego uszkodzenia kardiomiocytów.

Wyniki prezentowanych badań kinetyki uwalniania miRNA-208a do krążenia we wczesnej fazie zawału serca (publikacja 1.4 oraz komunikat 2.6) wykazały, że cząsteczki tego sercowo swoistego miRNA są uwalniane do krążenia (3-krotny wzrost uwalniania

miRNA-208a vs kontrola) jeszcze przed pojawieniem się tradycyjnych markerów martwicy kardiomiocytów: cTnI i CK-MB. Najwyższą ekspresję miRNA-208a (90-krotny wzrost ekspresji miRNA-208a vs kontrola) zaobserwowałam w trzeciej godzinie po reperfuzji. Maksymalna ekspresja miRNA-208a korelowała ze stężeniami cTnI ($r= 0.683$, $p<0.05$) a także z CK-MB ($r= 0.570$, $p<0.05$). Wyniki te wyraźnie wskazują, że oznaczane cząsteczki miRNA-208a w osoczu były uwolnione z miocytów serca. Po 24-ch godzinach ekspresja miRNA-208a obniżała się do poziomu obserwowanego w momencie przyjęcia pacjenta do szpitala. Odmienne wyniki przedstawił Zile i wsp. [31], który zaobserwował jedynie trzykrotny wzrost ekspresji miRNA-208 w stosunku do kontroli dopiero w 5-tym dniu ostrego zawału serca (AMI). Maksimum ekspresji występowało w 28-ym dniu (5-krotny wzrost ekspresji vs kontrola). Podwyższona ekspresja utrzymywała się przez 90 dni. Porównując powyższe obserwacje z poczynionymi w prezentowanych badaniach wydaje się, że istnieją przynajmniej dwa różniące się między sobą mechanizmy uwalniania cząsteczek miRNA-208 z uszkodzonych kardiomiocytów (Ryc. 1). Wczesna, intensywna, ale krótkotrwała ekspresja krążącego miRNA-208a jest związana prawdopodobnie z uwalnianiem tych cząsteczek w pęcherzykach błonowych oraz późna ekspresja jest związana z martwicą i/lub apoptozą kardiomiocytów.



Rycina 1. Proponowane mechanizmy uwalniania miRNA-208a w zawałe serca.

Uwolniony miRNA-208a pochodzi najprawdopodobniej z obszaru niedokrwionego i jest uwalniany w mechanizmie transportu pęcherzykowego. Badania Schwartz et al. [32] a także Hickmana et al. [33] wykazały, że już 30-minutowe niedotlenienie indukuje tworzenie pęcherzyków błonowych, które są odpowiedzialne za uwalnianie białek cytozolowych.

Transport pęcherzykowy jest prawdopodobnie również zaangażowany we wczesne uwolnienie nie tylko białek, ale także cząsteczek miRNA. Wydaje się więc, że obserwowany w prezentowanych badaniach wzrost ekspresji miRNA-208a w surowicy obrazuje stan niedokrwienia poprzedzający martwicę miocytów serca. W odróżnieniu, późne i znacznie niższe uwalnianie obserwowane przez Zile i wsp. [31] jest raczej związane z martwicą i/lub apoptozą kardiomiocytów. Cząsteczki miRNA mogą w krążeniu tworzyć kompleksy z białkami: Ago-2 (Argonaute-2), NPM-1 (Nucleophosmin 1) czy też z HDL, a także mogą być uwalniane w egzosomach lub ciałkach apoptycznych [28,34]. Stwarza to prawdopodobnie możliwość znacznie dłuższego utrzymywania się tych cząsteczek w krążeniu ze względu na ochronę przed działaniem osoczowych RNA-az.

Podsumowując, badania zawarte w powyższych publikacjach wykazują, że sercowo swoiste cząsteczki miRNA-208a są uwalniane do krążenia już we wczesnej fazie zawału mięśnia sercowego. Znaczący wzrost osoczowej ekspresji miRNA-208a jest następstwem nieodwracalnego niedokrwienia poprzedzającego martwicę kardiomiocytów.

4.4. ROLA CZĄSTECZEK miRNA W PATOFIZJOLOGII NIEWYDOLNOŚCI SERCA (publikacje 1.5, 1.6 oraz komunikaty 2.7, 3.1, 3.2, 3.3)

Niewydolność serca jest związana z patologiczną hipertrofią mięśnia sercowego. Patologiczna hipertrofia jest związana z procesem włóknienia a także z martwicą i apoptozą miocytów. Zmiany te indukowane są: nadciśnieniem tętniczym, stenozą aortalną, zawałem serca. Efektem tych zaburzeń jest powiększenie serca, przede wszystkim lewej komory, intensyfikacja włóknienia, zmiany ekspresji genów i w konsekwencji postępująca dysfunkcja serca.

Cząsteczki miRNA są zaangażowane w procesy fizjologiczne zachodzące w mięśniu sercowym, ale także są związane z patologicznym jego przerostem. Cząsteczki miRNA-1 i miRNA-133 biorą udział w prawidłowym rozwoju serca przez regulację proliferacji i różnicowania kardiomiocytów oraz systemów przewodzenia. Również miRNA-208a uczestniczy w regulacji systemu przewodzenia. W uszkodzonym sercu wiele cząsteczek miRNA jest zaangażowanych w przebudowę serca i progresję niewydolności mięśnia sercowego. Równowaga pomiędzy pro-włóknieniowymi cząsteczkami miRNA (*miRNA-18b*, *miRNA-21*, *miRNA-23*, *miRNA-195*, *miRNA-199a* i *b*, *miRNA-208*, *miRNA-499*) a pro-apoptycznymi cząsteczkami miRNA (*miRNA-1*, *miRNA-9*, *miRNA-29*, *miRNA-98*, *miRNA-133*) bierze prawdopodobnie udział w rozwoju niewydolności serca [29,35-40]. W prezentowanych badaniach skupiłam się na trzech cząsteczkach: miRNA-21 oraz

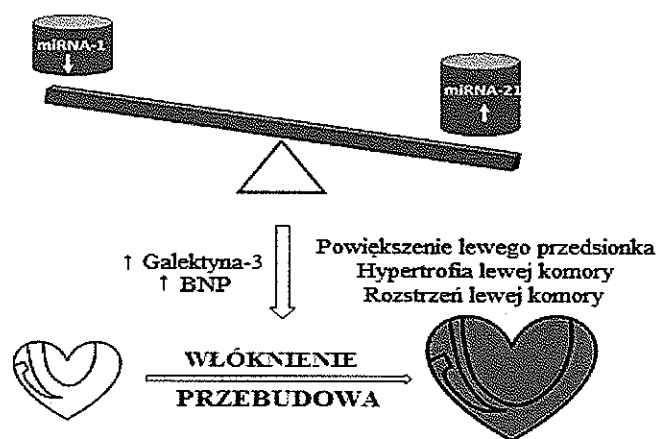
miRNA-208a z grupy cząsteczek pro-zwłóknieniowych oraz miRNA-1 z grupy pro-apoptycznych. Znajomość ekspresji tych cząsteczek w krążeniu może przyczynić się do poznania szczegółowego, molekularnego mechanizmu niewydolności serca ale i także odzwierciedlać stadium rozwoju choroby.

W badaniach pacjentów (*publikacja 1.5*) z objawową niewydolnością serca, w odróżnieniu od zawału mięśnia sercowego nie stwierdziłam ekspresji krążącego miRNA-208a. Wydaje się, że mechanizmy odpowiedzialne za uwalnianie miRNA-208a związane z niedokrwieniem i martwicą kardiomiocytów nie są zaangażowane w patomechanizm niewydolności serca. Wykazałam natomiast, zmniejszoną ekspresję miRNA-1 pogłębiającą się wraz z rozwojem choroby. Obniżona ekspresja miRNA-1 ujemnie korelowała ze stężeniem NT-proBNP ($r = -0.389$; $p = 0.023$) u pacjentów w II/III klasie NYHA, podczas gdy w IV klasie NYHA powyższe korelacje nie były znamienne statystycznie ($r = 0.025$; $p = 0.90$). Warty zaznaczenia jest fakt, że nie obserwowałam żadnych powiązań pomiędzy zmianami ekspresji miRNA-1 a stężeniem galektyny-3 w surowicy pacjentów zarówno w II/III, jak i IV klasie NYHA (odpowiednio: $r = -0.299$; $p = 0.08$ oraz $r = -0.109$; $p = 0.60$).

W przeciwieństwie do miRNA-1 w surowicy krwi pacjentów z objawową niewydolnością serca, wykazałam wzrost ekspresji miRNA-21 niezależny od zaawansowania choroby. Wzrost ekspresji miRNA-21 nie korelował istotnie ze wzrostem stężenia NT-proBNP i nie zależał od stopnia zaawansowania choroby ($r = -0.075$; $p = 0.67$ i $r = 0.182$; $p = 0.38$ odpowiednio w II/III i IV klasie NYHA). Wzrost ekspresji miRNA-21 korelował natomiast ze wzrostem stężenia galektyny-3 w surowicy pacjentów w IV klasie NYHA ($r = 0.422$; $p = 0.032$). Szereg badań wskazuje na udział Gal-3 nie tylko w procesach włóknienia i przebudowy serca, ale także w innych stanach takich jak: zapalenie trzustki, marskość, idiopatyczne włóknienie płuc czy niewydolności nerek [41]. Galektyna-3 należy do rodziny zwierzęcych lektyn wiążących β -galaktozydy. Zdolność wiązania ligandów, takich jak: laminina, syneksyna, integryny i kolagen może modulować procesy zapalne i immunologiczne [42]. Ostatnie badania wskazują, że sercowe makrofagi wydzielają Gal-3 w następstwie ich aktywacji. Obecność miejsc wiązania Gal-3 wykazano w sercowych fibroblastach i macierzy zewnątrzkomórkowej [43]. Galektyna-3 jest transportowana do cytoplazmy komórek, przede wszystkim do sercowych fibroblastów, które ulegają aktywacji i proliferacji, w następstwie czego dochodzi do wzmożonej syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie kolagenu typu 1. Następstwem tych procesów jest włóknienie i patologiczna przebudowa prowadząca do niewydolności serca [44]. Prezentowane wyniki

wskazują, że ekspresja miRNA-21 jest związana ze zmianami syntezy i/lub uwalniania galektyny-3, obrazującej proces włóknienia miokardium.

W prezentowanym badaniu (*publikacja 1.6 oraz komunikat 2.7*), na niewielkiej wprawdzie grupie pacjentów w większości (90%) z ostrą niedokrwienną skurczową niewydolnością serca, udało się wykazać znacząco wyższe stężenia Gal-3 w porównaniu do grupy kontrolnej (wyniki przedstawione jako mediana (25-75percentyl): 17.8 (10.3–27.8) ng/ml vs 8.4 (6.5–11.0) ng/ml; $p=0.004$). Stężenie galektyny-3 korelowało ze stężeniem NT-proBNP ($r=0.565$; $p=0.035$). Stężenia Gal-3, podobnie jak NT-proBNP nie korelowały z frakcją wyrzutową lewej komory (LVEF). W rocznej obserwacji - 4-ch pacjentów (28.6%) zmarło. U tych pacjentów stężenie galektyny-3 podczas pobytu w Klinice było istotnie wyższe niż u pacjentów, którzy przeżyli (55.6 ± 37.6 ng/ml vs 15 ± 7.04 ng/ml; $p=0.005$).



Rycina 2. Rola miRNA-1 i miRNA-21 w niewydolności serca.

Kolejnym pytaniem jakie sobie zadałam było: czy zaobserwowane zmiany biochemiczne związane z ekspresją cząsteczek pro-apoptycznych miRNA-1 i pro-zwłóknieniowych miRNA-21 oraz stężenia NT-proBNP i galektyny-3 u pacjentów z niewydolnością serca są związane ze zmianami anatomicznymi mięśnia sercowego?

U pacjentów (*komunikat 3.2*), u których wielkość lewego przedsionka (LAd) była > 48 mm dochodziło do obniżenia ekspresji miRNA-1, któremu towarzyszył przerost lewej komory oceniany jako grubość przegrody międzykomorowej (IVS) ($r=-0.453$, $p<0.05$). W tej grupie pacjentów zaobserwowałam również ujemną korelację pomiędzy stężeniem NT-proBNP a ekspresją miRNA-1: $r=-0.388$, $p<0.05$).

W grupie pacjentów ze zdekompensowaną pozawałową niewydolnością serca (*komunikat 3.1*) z wymiarem końcowo-rozkurczowym lewej komory LVEDd >60 mm w porównaniu z pacjentami z LVEDd <60 mm zaobserwowałam niższą ekspresję miRNA-21

(wyniki przedstawione jako mediana (25-75percentyl): 2.092 (1.216-3.35) względnej krotności zmian ekspresji vs 2.458 (1.101-6.34) względnej krotności zmian ekspresji; $p=0.034$) przy istotnie statystycznie niższej frakcji wyrzutowej lewej komory LVEF ($26.2\pm 11.1\%$ vs $41.3\pm 11.5\%$; $p<0.0001$) oraz większej średnicy lewego przedsionka LAd (5.40 ± 0.61 cm vs 4.47 ± 0.58 cm; $p<0.0001$) i większej średnicy prawej komory RVd (3.58 ± 0.44 cm vs 3.02 ± 0.55 cm; $p<0.001$).

Wśród pacjentów (komunikat 3.3) z przerostem lewej komory LVMI>115(mężczyźni)/95(kobiety) g/m² została wyłoniona grupa pacjentów z grubszą przegrodą międzykomorową IVS>12 mm vs pacjenci z IVS<12 mm, gdzie stężenie Gal-3 było istotnie wyższe (wyniki przedstawione jako mediana (25-75percentyl): 18 (15.4-25.6) pg/ml vs 16.9 (10.8-21.4) pg/ml; $p=0.028$). W tej grupie pacjentów, stężenie Gal-3 istotnie dodatnio korelowało z LVEDd ($r= 0.600$; $p<0.05$) oraz stężeniem NT-proBNP ($r= 0.660$; $p<0.05$). Zacieśniając jeszcze bardziej kryteria przerostu lewej komory, uzyskałam podgrupę pacjentów z ogromnym przerostem lewej komory LVMI>149(mężczyźni)/122(kobiety) g/m². W tej podgrupie zaobserwowałam ujemną zależność ekspresji miRNA-1 z grubością przegrody międzykomorowej IVS ($r= -0.533$, $p<0.05$) oraz z grubością tylnej ściany w rozkurczu (PWDT) ($r= -0.404$, $p<0.05$).

Podsumowując, powyższe badania potwierdzają, że wśród chorych ze zdekompensowaną pozawałową niewydolnością serca obserwuje się zmiany w ekspresji cząsteczek miRNA-1 i miRNA-21, które korelują z anatomicznymi zmianami w sercu, potwierdzonymi w przezklatkowej echokardiografii. Wydaje się, że mechanizmy prowadzące do zaostrzenia niewydolności serca mogą być związane z zaburzeniami ekspresji miRNA-1 i miRNA-21, które oddziałują na procesy apoptozy i włóknienia kardiomiocytów.

4.5. MIELOPEROKSYDAZA JAKO MARKER RYZYKA ORAZ SKUTECZNOŚCI LECZENIA STATYNAMI (publikacje 1.2, 1.7 oraz komunikaty 2.3, 2.4, 2.5)

Priorytetem w wieloczynnikowej prewencji pierwotnej i wtórnej choroby niedokrwiennej serca oraz udarów mózgu jest systematyczne wyrównywanie zaburzeń lipidowych. Ugruntowaną pozycję w terapii zaburzeń gospodarki lipidowej zajmują inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-koenzymu A (HMG-CoA) czyli statyny.

Odkrycie statyn przypisuje się japońskim naukowcom Akiro Endo i Masudo Kuroda, którzy w 1976 roku wyizolowali mewastatynę z grzybni *Penicillium citrinum*. Nie znalazła ona jednak klinicznego zastosowania z uwagi na jej toksyczne działanie. Kolejne lata badań zaowocowały odkryciem lowastatyny, wyizolowanej z *Aspergillus terreus* a zarejestrowanej

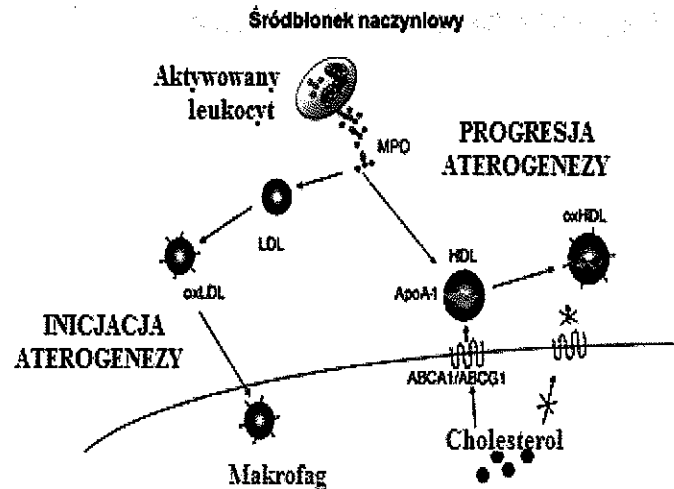
w Stanach Zjednoczonych w roku 1987. W chwili obecnej, na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej dopuszczonych jest do obrotu 6 rodzajów statyn: atorwastatyna, fluwastatyna, lowastatyna, prawastatyna, simwastatyna, rozuwastatyna [45].

Statyny, jako kompetycyjne, nieodwracalne inhibitory reduktazy HMG-CoA hamują aktywność tego enzymu, co prowadzi do zmniejszenia syntezy cholesterolu w wątrobie i obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia cholesterolu oraz stymulowania ekspresji receptorów dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) na powierzchni hepatocytów. Przyczynia się to do zwiększenia wychwytu czyli wzrostu usuwanego cholesterolu LDL (LDL-Ch) z krążenia, a zatem obniżenia stężenia krążącego LDL-Ch i innych lipoprotein zawierających apolipoproteinę B, w tym cząstek bogatych w triglicerydy. Przez wiele lat uważano, że podstawowym efektem terapeutycznym statyn jest ich działanie hipolipemizujące [46-47]. Liczne badania wykazały, że nie mniej ważnym elementem tak dużej skuteczności terapeutycznej statyn jest ich działanie plejotropowe, obejmujące hamowanie stresu oksydacyjnego, poprawę funkcji śródbłonna, hamowanie proliferacji mięśni gładkich i makrofagów, działanie przeciwzapalne, przeciwwzkrzepowe oraz immunomodulujące [48-50].

Istotnym elementem działania statyn jest ich wpływ na indukcję ekspresji genów. Badania, we współpracy z Zakładem Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN wykonane na modelu drożdżowym wykazały, że statyny nie są jednorodne tak pod względem siły działania obniżającej poziom steroli, jak i wpływu na ekspresję genów. Udało się wykazać (*publikacja 1.2 oraz komunikaty 2.4, 2.5*), że simwastatyna, atorwastatyna, fluwastatyna i rozuwastatyna podwyższają ekspresję genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy steroli, w tym reduktazy HMG-CoA. Jednakże, nasilenie ekspresji tych genów było różne. Badając ekspresję genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy ubichinonu (*COQ2, COQ3, CAT5*), dolicholu (*RER2, SEC59*) oraz enzymy biorące udział w procesie prenylacji białek (*BTS1*) zauważono, że analizowane statyny mają różny wpływ na ekspresję genów powyższych szlaków. Największy wpływ na ekspresję genów wywierała rozuwastatyna, która podwyższała ekspresję genów: *COQ3, BTS1* i *RER2*, natomiast obniżała ekspresję genów: *COQ2, CAT5* i *SEC59*.

Wyniki tych badań spowodowały zainteresowanie się wpływem statyn na ekspresję genu mieloperoksydazy. Mieloperoksydaza została odkryta w 1941 roku przez Agnera. W trzydzieści lat później, w 1970 roku - Klebanoff wykazał antybakteryjne działanie MPO i jej udział w procesie fagocytozy mikroorganizmów. W ostatniej dekadzie ubiegłego wieku wykazano wpływ MPO na lipoproteiny surowicy (*Ryc.3*) oraz na reakcję zapalną w ścianie

naczyniowej. Prozapalne właściwości mieloperoksydazy w stosunku do ściany naczyniowej obejmują procesy: 1). oksydacyjnej modyfikacji LDL (powstawanie aterogennych cząsteczek ox-LDL), 2). tworzenia dysfunkcyjnych cząsteczek HDL oraz 3). aktywacji metaloproteinaz macierzy [51-52].



Rycina 3. Działanie mieloperoksydazy w stosunku do HDL i LDL w ścianie naczyniowej.

Na szczególną uwagę zasługuje udział MPO w tworzeniu dysfunkcyjnych HDL (Ryc.3). Rola biologiczna cząstek HDL polega na indukcji transportu zwrotnego cholesterolu za pośrednictwem zależnej od ATP kasety transportującej (ABCA-1). MPO katalizuje reakcje chlorowania i nitrowania HDL. Reszty tyrozynowe Y192 i Y166 w ApoA-1 ulegają chlorowaniu a reszta Y18 nitrowaniu przez powstający w obecności MPO jon ONOO⁻. Modyfikacja ApoA-1 prowadzi do powstania dysfunkcyjnych cząstek HDL, niezdolnych do indukcji transportu zwrotnego cholesterolu [51,53]. Wydaje się więc, że znajomość wpływu statyn na ekspresję genu mieloperoksydazy i jej stężenie w osoczu stanowi istotny element oceny efektu terapeutycznego. Dotychczas jedynymi wskaźnikami stosowanymi w ocenie efektu terapeutycznego są: spadek stężenia cholesterolu całkowitego, wzrost stężenia cholesterolu HDL (HDL-Ch) i znaczące obniżenie stężenia cholesterolu LDL [54-56]. Coraz częściej pojawiają się głosy wątpiące: *czy osiągnięcie zalecanych stężeń HDL-Ch i LDL-Ch jest wystarczającym wskaźnikiem nie tylko efektu terapeutycznego, ale przede wszystkim zmniejszenia ryzyka rozwoju miażdżycy i jej klinicznych powikłań?* Stężenie cholesterolu w tych frakcjach lipoprotein nie obrazuje bowiem ani ich struktury, ani funkcji. Ze względu na udział MPO w procesach powstawania dysfunkcyjnych HDL

i aterogennych form LDL wydaje się, że stężenie MPO w osoczu może być istotnym elementem nie tylko oceny efektywności leczenia ale i ryzyka sercowo-naczyniowego.

W przedstawionych badaniach skupiłam się na jednej ze statyn, cieszącej się uznaniem wśród wielu klinicystów – atorwastatynie. Atorwastatyna, która jak potwierdzono w wielu doniesieniach, bierze udział w modyfikacji reakcji zachodzących na każdym etapie powstawania blaszki miażdżycowej, a dzięki stosunkowo niewielkiej liczbie powikłań jest uznawana za jedną z bezpieczniejszych statyn [57-58]. We współpracy z ośrodkami klinicznymi Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego: I Katedrą i Kliniką Kardiologii oraz Katedrą i Kliniką Kardiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych oraz Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN podjęłam badania (*publikacja 1.7 oraz komunikat 2.3*) dotyczące ekspresji genu *MPO* i jej stężenia w osoczu w zależności od efektu hipolipemizującego i przeciwzapalnego atorwastatyny w dawce 40 mg na dobę przez 1 miesiąc u pacjentów po przebytym zawale mięśnia sercowego. W tej szczególnej grupie pacjentów, którzy wcześniej nie otrzymywali żadnych statyn uzyskałam zaskakujące wyniki. Po 30-dniowej terapii w całej grupie badanej odnotowałam spadek ekspresji genu *MPO* (względna krotność zmian ekspresji: 1.461 w porównaniu z wartością wyjściową - względna krotność zmian ekspresji: 1.711) przy jednoczesnym niewielkim, ale znamionym wzroście stężenia MPO w osoczu (wyniki przedstawione jako mediana (25-75percentyl): przed terapią: 152.5 (109.5-240.5) pmol/L vs po terapii: 165.9 (104.5-220.5) pmol/L. Ten brak relacji pomiędzy ekspresją genu *MPO* a jej stężeniem w osoczu sprowokował mnie do dokładniejszej analizy uzyskanych wyników. Zadałam sobie jednocześnie pytanie: *czy u wszystkich badanych pacjentów uzyskałam obniżenie ekspresji genu MPO?* Okazało się, że nie wszyscy pacjenci reagują tak samo na leczenie atorwastatyną. Ten fakt był dla mnie niezwykle istotny. Wyodrębniłam (*publikacja 1.7 oraz komunikat 2.3*) dwie subpopulacje pacjentów: 1). z obniżoną i 2). z podwyższoną ekspresją genu *MPO*. U pacjentów z obniżoną ekspresją genu *MPO* po miesięcznej terapii (względna krotność zmian ekspresji wynosiła: -1.845) zaobserwowałam obniżenie stężenia MPO w osoczu (przed terapią: 189.9 (128.6-378.7) pmol/L vs po terapii: 176.0 (95.7-224.5) pmol/L), zaś w grupie pacjentów z podwyższoną ekspresją genu *MPO* (względna krotność zmian ekspresji wynosiła 1.545) zaobserwowałam podwyższenie stężenia MPO w osoczu (przed terapią: 121.8 (88.1-165.0) pmol/L vs po terapii: 139.0 (114.1-220.5) pmol/L). Mechanizmy odpowiedzialne za zróżnicowany efekt atorwastatyny na ekspresję genu pozostają niewyjaśnione. Przyczyną tak różnego oddziaływania atorwastatyny może być zarówno polimorfizm HMG-CoA reduktazy, jak i aktywność czynników transkrypcyjnych

odpowiedzialnych za ekspresję genu *MPO*. Sugestie te wymagają jednak potwierdzenia w następnych badaniach, które są planowane.

Fakt zróżnicowanego osobniczo efektu atorwastatyny na ekspresję genu *MPO* skłonił mnie do zadania kolejnego pytania: czy działanie hipolipemizujące i przeciwzapalne jest uzależnione od kierunku wpływu na ekspresję genu *MPO*? Podałam więc szczegółowej analizie stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i HDL oraz białka C-reaktywnego. W obydwu subpopulacjach pacjentów niezależnie od wpływu na ekspresję genu i stężenie *MPO* uzyskałam zamierzony efekt hipolipemizujący z istotnymi statystycznie różnicami w stężeniach cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL ($p < 0.0001$) a także zamierzony efekt przeciwzapalny, z silniejszym jednak obniżeniem stężenia hsCRP u pacjentów z obniżoną ekspresją genu *MPO* (spadek hsCRP o 85.3%) w stosunku do pacjentów z podwyższoną ekspresją genu *MPO* (spadek hsCRP o 72.5%) po miesięcznym leczeniu atorwastatyną. Ponadto, stwierdziłam wysoką istotną statystycznie korelację pomiędzy zmianami stężenia hsCRP w surowicy oraz zmianami stężenia *MPO* w osoczu ($r = 0.632, p < 0.05$). Znajomość stężenia *MPO* w osoczu oraz ocena ekspresji genu *MPO* może być użytecznym narzędziem do oceny i prognozowania przyszłych zdarzeń sercowo-naczyniowych oraz korzyści z leczenia atorwastatyną, szczególnie w prewencji wtórnej u pacjentów po przebytych zawale mięśnia sercowego. Wydaje się, że pacjenci u których stężenia parametrów lipidowych osiągnęły stężenia docelowe, ale u których nie dochodzi do zmniejszenia ekspresji genu *MPO* i w konsekwencji obniżenia stężenia *MPO* osocza są pacjentami potencjalnie wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego. Taka bowiem sytuacja, stwarza warunki do powstawania zarówno aterogennych form LDL, jak i dysfunkcyjnych cząstek HDL.

Podsumowując, przedstawione badania wykazały, że istotnym elementem działania atorwastatyny jest jej wpływ na ekspresję niektórych genów. W stosunku do genu mieloperoksydazy wpływ ten charakteryzuje się istotnymi różnicami międzyosobniczymi. Ekspresja genu *MPO* i/lub stężenie tego enzymu w osoczu powinno być ważnym elementem w ocenie osiągnięcia spodziewanego efektu terapeutycznego niezależnie od uzyskania normalizacji parametrów lipidowych.

4.6. NAJWAŻNIEJSZE REZULTATY I WNIOSKI WYNIKAJĄCE Z PRZEPROWADZONYCH BADAŃ, WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA:

1. Istotnym problemem klinicznym jest szybkie (1 godzina) rozpoznanie zawału mięśnia sercowego. Obecne standardy rekomendują w przypadkach wątpliwych (stężenie troponin poniżej najwyższego poziomu referencyjnego, brak przetrwałego uniesienia odcinka ST w Ekg) algorytm postępowania diagnostycznego przewidujący dwukrotne oznaczenie sercowych troponin (w momencie prezentacji pacjenta oraz po 3-ch godzinach) co znacznie wydłuża czas podjęcia decyzji klinicznych [59]. Prezentowane badania wskazują, że stężenie modyfikowanej niedokrwieniem albuminy wzrasta w czasie, gdy stężenie cTnI pozostaje jeszcze poniżej wartości decyzyjnej. Wzrost IMA wskazuje jednocześnie na mechanizm niedokrwienno odpowiedzialny za uwolnienie wolnej puli troponin do krążenia. Różnicuje więc ostry zespół wieńcowy od innych stanów klinicznych związanych ze wzrostem stężenia troponin. Oznaczenie stężenia IMA łącznie z oznaczeniem sercowych troponin I lub T, stanowiący element dwumarkerowej strategii diagnostycznej ostrych zespołów wieńcowych, może przyczynić się do szybszego rozpoznania a zatem i szybszego wdrożenia odpowiedniego postępowania leczniczego.
2. IMA jest także wskaźnikiem przewlekłego stanu niedokrwienia u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową. Jej stężenia u tych pacjentów osiągają znacząco wyższe wartości niż u pacjentów z ostrym niedokrwieniem, poprzedzającym martwicę kardiomiocytów. Jednocześnie zabieg angioplastyki wieńcowej jest związany ze wzrostem stężenia IMA przed wzrostem stężenia cTnI. Sugeruje to przydatność oznaczania stężenia IMA w monitorowaniu uszkodzeń mięśnia sercowego w przebiegu zabiegów interwencyjnych u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową.
3. Wzrastająca ekspresja miRNA-208a w krążeniu we wczesnej fazie zawału serca obrazuje stan niedokrwienia kardiomiocytów. Odpowiedzialnym za uwalnianie tych sercowo swoistych cząsteczek miRNA jest prawdopodobnie transport pęcherzykowy. Tworzone podczas niedokrwienia pęcherzyki błonowe, zawierające cytozolowe miRNA są uwalniane do krążenia i szybko z niego eliminowane. Inny mechanizm jest prawdopodobnie odpowiedzialny za późne uwalnianie miRNA-208 i uzyskana wówczas ekspresja miRNA-208 jest związana z martwicą i/lub apoptozą kardiomiocytów w okresie po zawałowym.

4. Niewydolność serca w odróżnieniu od zawału serca nie prowadzi do zwiększonej ekspresji miRNA-208a w krążeniu. Częsteczkami zaangażowanymi w rozwój niewydolności serca są: miRNA-1 i miRNA-21. Zmniejszona ekspresja miRNA-1, pogłębiająca się wraz z rozwojem choroby moduluje reakcję neurohormonalną, objawiającą się wzmożoną syntezą peptydu natriuretycznego typu B. Pro-apoptyczne cząsteczki miRNA-1 nie są prawdopodobnie zaangażowane w proces włóknienia serca, o czym świadczy brak zależności pomiędzy ekspresją miRNA-1 a stężeniem galektyny-3. W przeciwieństwie zaś, ekspresja cząsteczek miRNA-21 wzrasta w objawowej niewydolności serca i jest związana ze wzrostem stężenia galektyny-3.
5. Podwyższone stężenie galektyny-3 świadczące o aktywacji sercowych makrofagów i w konsekwencji aktywacji i proliferacji fibroblastów jest użytecznym narzędziem diagnostycznym i prognostycznym pacjentów z ostrą niewydolnością serca.
6. Zmiany ekspresji cząsteczek miRNA-1 i miRNA-21 prowadzące do intensyfikacji procesu włóknienia a także apoptozy kardiomiocytów, manifestujące się zwiększonymi stężeniami NT-proBNP i galektyny-3 wydają się być jednym z podstawowych molekularnych mechanizmów, odpowiedzialnych za pogłębiającą się niewydolność mięśnia sercowego, co skutkuje niekorzystną adaptacyjną przebudową serca, potwierdzoną w badaniach obrazowych.
7. Skuteczność postępowania leczniczego, prowadzącego do unormowania zaburzeń lipidowych powinna zawierać ocenę czynników, obrazujących komórkowe i molekularne procesy zaangażowane w patogenezę miażdżycy i jej kliniczne powikłania. Jednym z takich czynników jest mieloperoksydaza, której udział zarówno w inicjacji, jak i progresji miażdżycy jest dobrze udokumentowany [51-53]. Prezentowane badania wykazały międzyosobnicze zróżnicowanie reakcji pacjentów leczonych atorwastatyną w stosunku do ekspresji genu *MPO* a także stężenia *MPO* w osoczu. Wskazuje to na przydatność oznaczania *MPO* w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego, szczególnie w prewencji wtórnej niezależnie od osiągnięcia pożądaných stężeń podstawowych parametrów lipidowych.

4.7. OGRANICZENIA

Przedstawiony cykl badań ma charakter badań obserwacyjnych. W badaniach tych uczestniczyły stosunkowo nieliczne populacje pacjentów (od kilkunastu do kilkudziesięciu). W badaniach dotyczących wpływu atorwastatyny na ekspresję genu *MPO* i jej stężenia w osoczu - liczba pacjentów była ograniczona koniecznością rekrutacji wyłącznie pacjentów po zawale serca, którzy nie przyjmowali wcześniej żadnej statyny. Takich pacjentów nie jest zbyt wielu, gdyż już lekarze pierwszego kontaktu często zalecają stosowanie statyny w prewencji pierwotnej. Ponadto, monitorowanie leczenia polegające jedynie na kontroli parametrów lipidowych nie obrazuje w pełni ryzyka sercowo-naczyniowego. U wielu z pacjentów przyjmujących statyny doszło jednak do poważnego incydentu wieńcowego. W badaniach dotyczących modyfikowanej niedokrwieniem albuminy oraz kinetyki uwalniania miRNA-208a do krążenia we wczesnej fazie zawału serca - czynnikiem ograniczającym rekrutację pacjentów był warunek stężenia cTnI poniżej wartości decyzyjnej dla zawału. Istotnym ograniczeniem badań nad rolą cząsteczek miRNA-1 oraz miRNA-21 w patofizjologii niewydolności serca był fakt, iż ekspresję obu cząsteczek miRNA oznaczano jednorazowo w czasie 24 godzin od przyjęcia pacjenta do szpitala. Brak dynamiki zmian ekspresji, szczególnie podczas zastosowanego postępowania leczniczego nie pozwala na wnioskowanie o ich roli diagnostycznej czy monitorującej przebieg choroby.

4.8. PODZIĘKOWANIA

Pragnę szczególnie podziękować Koleżankom i Kolegom wszystkich Zespołów Klinicznych: I Katedry i Kliniki Kardiologii WUM oraz Katedry i Kliniki Kardiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych WUM a także Koleżankom z Zakładu Genetyki Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, z którymi mam przyjemność współpracować, za właściwy dobór i przygotowanie pacjentów do badań oraz za bardzo życzliwą i owocną współpracę podczas planowania badań eksperymentalnych a także przygotowywania publikacji.

4.9. PIŚMIENNICTWO cytowane

- [1] Mendis S, Puska P, Norrving B. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. WHO, Geneva 2011.
- [2] Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J* 2014; 35: 2950-2959.
- [3] Majewicz A, Marcinkowski J. Epidemiologia chorób układu krążenia. Dlaczego w Polsce jest tak mało zainteresowanie istniejącymi programami profilaktycznymi? *Probl Hig Epidemiol* 2008;89(3): 322-325.

- [4] Broda G, Rywik S. Wielośrodkowe ogólnopolskie badanie stanu zdrowia ludności – projekt WOBASZ. *Kard Pol* 2005; 63(supl.4): 601-685.
- [5] Narodowy Program Wyrównywania Dostępności do Profilaktyki i Leczenia Chorób Układu Sercowo-Naczyniowego POLKARD na lata 2013-2016. Ministerstwo Zdrowia, Warszawa 2015.
- [6] Drygas W, Niklas AA, Piwońska A, Piotrowski W, Foltysńska A, Kwaśniewska M, et al. Multi-center National Population Health Examination Survey (WOBASZ II): assumptions, methods and implementation. *Kard Pol* DOI: 10.5603/KP.a2015.0235.
- [7] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD et al. Third Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012; 33: 2551-2567.
- [8] Antman E, Bassand J-P, Klein W, Ohman M, Lopez Sendon JL, Ryden L et al. Myocardial infarction redefined – a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 959-969.
- [9] Panteghini M, Pagani F, Yeo K-TJ, Apple FS, Christenson RH, Dati F et al. Evaluation of imprecision for cardiac troponin assays at low-range concentration. *Clin Chem* 2004; 50: 327-332.
- [10] Lin JC, Apple FS, Murakami MM, Luepker RV. Rates of positive cardiac troponin I and creatine kinase MB mass among patients hospitalized for suspected acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2004; 50: 333-338.
- [11] Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Steizig C, Hartwiger S et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 2009; 361: 858-867.
- [12] Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2009; 361: 868-877.
- [13] Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Jarolim P, Braunwald E. Detection of acute changes in circulating troponin in the setting of transient stress test-induced myocardial ischemia using an ultrasensitive assay: results from TIMI 35. *Eur Heart J* 2009; 30: 162-169.
- [14] Jesse RL. On the relative value of an assay versus that of the test: a history of troponin for the diagnosis of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2125-2128.
- [15] Wu AHB, Lu QA, Todd J, Moecks J, Wians F. Short- and long-term biological variation in cardiac troponin I measured with a high-sensitivity assay: Implication for clinical practice. *Clin Chem* 2009; 55: 52-58.
- [16] Roffi M, Patrono C, Collet J-P, Mueller Ch, Valgimigli M, Andreotti F et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes with patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal* 2015. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv320.
- [17] Apple FS, Pearce LA, Smith SW, Kaczmarek JM, Murakami MM. Role of monitoring changes in sensitive cardiac troponin I assay results for early diagnosis of myocardial infarction and prediction of risk of adverse events. *Clin Chem* 2009; 55: 930-937.
- [18] Giannitsis E, Becker M, Kurz K, Hess G, Zdunek D, Katus HA. High-sensitivity cardiac troponin T for early prediction of evolving non-ST-segment elevation myocardial infarction in patients with suspected acute coronary syndrome and negative troponin results on admission. *Clin Chem* 2010; 56: 642-650.
- [19] Wu AHB, Jaffe AS. The clinical need for high-sensitivity cardiac troponin assays for acute coronary syndromes and the role for serial testing. *Am Heart J* 2008; 155: 208-214.
- [20] Peacock F, Morris DL, Anwaruddin S, Christenson RH, Collinson PO, Goodacre AW et al. Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndrome in the emergency department. *Am Heart J* 2006; 152: 253-262.
- [21] Bar-Or D, Winkler JV, Vanbenthuyzen K, Harris L, Lau E, Hetzel FW. Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to creatine kinase-MB, myoglobin and troponin I. *Am Heart J* 2001; 141: 985-991.

- [22] Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, Wu AHB, Holtman V, Painter P et al. Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem* 2001; 47: 464-470.
- [23] Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, Yang J, Ortega-Lopez AM, Shinoda H et al. Evaluation of human serum Albumin Cobalt Binding Assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin Chem* 2003; 49: 581-585.
- [24] Roy D, Quiles J, Aldama G, Sinha M, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Gaze D, Vollinson P, Kaski JC. Ischemia Modified Albumin for assessment of patients presenting to the emergency department with acute chest pain but normal or non-diagnostic 12-lead electrocardiograms and negative cardiac troponin T. *Int J Cardiol* 2004; 97: 297-301.
- [25] Li Ch, Pei F, Zhu X, Duan DD, Zeng Ch. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial infarction. *Clin Bioch* 2012; 45: 727-732.
- [26] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391: 806-811.
- [27] Klimczak D, Paćzek L, Jazdzewski K, Kuch M. MicroRNAs: powerful regulators and potential diagnostics tools in cardiovascular disease. *Kard Pol* 2015; 1: 1-6.
- [28] Di Stefano V, Zaccagnini G, Capogrossi MC, Martelli F. MicroRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. *Vasc Pharmacol* 2011; 55: 111-118.
- [29] Bauersachs J, Thum T. Biogenesis and regulation of cardiovascular MicroRNAs. *Circ Res* 2011; 109: 334-347.
- [30] Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miRNA-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009; 55: 1944-1949.
- [31] Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, Strond RE, DeSantis SM, Spinak FG. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodelling in patients after myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; 4: 614-619.
- [32] Schwartz P, Piper M, Spahr R, Spieckermann PG. Ultrastructure of cultured adult myocardial cells during anoxia and reoxygenation. *Am J Pathol* 1984; 115: 349-361.
- [33] Hickman PE, Potter JM, Aroney C, Koerbin G, Southcott E, Wu AHB et al. Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 318-323.
- [34] Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res* 2012; 93: 555-562.
- [35] Dai Y, Khaidakov M, Wang X, Ding Z, Su W, Price E et al. MicroRNAs involved in the regulation of postischemic cardiac fibrosis. *Hypertension* 2013; 61: 751-756.
- [36] Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 581-588.
- [37] Gladka MM, da Costa Martins PA, De Windt LJ. Small changes can make a big difference – MicroRNA regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52: 74-82.
- [38] Zhou S, Liu Y, Prater K, Zheng Y, Cai L. Roles of microRNAs in pressure overload- and ischemia-related myocardial remodelling. *Life Sci* 2013; 93: 855-862.
- [39] Villar AV, Garcia R, Merino D, Liano M, Cobo M, Montalvo C et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. *Int J Cardiol* 2013; 167: 2875-2881.
- [40] Orenes-Pinero E, Montoro-Garcia S, Patel JV, Valdes M, Marin F, Lip GY. Role of microRNAs in cardiac remodelling: new insights and future perspectives. *Int J Cardiol* 2013; 167: 1651-1659.
- [41] Tang WH, Shrestha K, Shao Z, Borowski AG, Troughton RW, Thomas JD et al. Usefulness of plasma galectin-3 levels in systolic heart failure to predict renal insufficiency and survival. *Am J Cardiol* 2011; 108: 385-390.
- [42] de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 811-817.

- [43] Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004; 110: 3121-3128.
- [44] Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrim DA, Vasta GR et al. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry* 2011; 50: 7842-7857.
- [45] Obwieszczenie Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z dnia 13 marca 2015 r. w sprawie ogłoszenia Urzędowego Wykazu Produktów Leczniczych Dopuszczonych do Obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej (Dz. Urz. Min. Zdr. z 2015, poz. 15).
- [46] Athyros VG, Elisof M, Papageorgion AA, Symeonidis AN, Pehlivanidis AN, Bouloukos VI et al. Pathogenesis and treatment of kidney disease and hypertension - Effect of statins versus untreated dyslipidemia no serum uric acids levels in patients with coronary heart disease: a subgroup analysis of the GREek Atorvastatin and Coronary-heart disease Evaluation (GREACE) study. *Am J Kidney Dis* 2004; 43(4): 589-599.
- [47] Bruni F, Pasqui AL, Pastorelli M, Bora G, Di Renzo M, Cercigani M et al. Effect atorvastatin on different fibrinolysis mechanisms in hypercholesterolemic subjects. *Int J Cardiol* 2004; 95(2-3): 269-274.
- [48] Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004; 109(suppl.III): III39-III43.
- [49] Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med* 2008; 14: 37-44.
- [50] Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. Basic research and clinical perspectives. *Circ J* 2010; 74: 818-826.
- [51] Nicholls SJ, Zheng L, Hazen SL. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15: 212-219.
- [52] Yoshida H, Kisug R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1875-1882.
- [53] Shao B, Heinecke JW. Impact of HDL oxidation by the myeloperoxidase system on sterol efflux by the ABCA1 pathway. *J Proteomics* 2011; 74: 2289 - 2299.
- [54] Papageorgiou N, Tousoulis D. Is HDL a prognostic biomarker for coronary atherosclerosis? *Int J Cardiol* 2014; 174: 465-467.
- [55] Xu S, Liu Z, Liu P. HDL cholesterol in cardiovascular disease: the good, the bad, and the ugly? *Int J Cardiol* 2013; 168: 3157-3159.
- [56] von Eckardstein A. HDL – a difficult friend. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2008; 5(3-4): e315-e324.
- [57] Durazzo AES, Machado FS, Ikeoka DT, De Bernoche C, Monachini MC, Puech-Leao P et al. Reduction in cardiovascular events after surgery with atorvastatin: a randomized trial. *J Vasc Surg* 2004; 39(5): 967-975.
- [58] Kowalski J, Okopień B, Madej A, Zieliński M, Belowski D, Kalina Z et al. Effects of atorvastatin, simvastatin, and fenofibrate therapy on monocyte chemoattractant protein-1 secretion in patients with hyperlipidemia. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59(3): 189-193.
- [59] Scirica BM, Morrow DA. In search of the 1-hour rule-out for acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2015; 61: 1427-1429.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Moje zainteresowania naukowe do czasu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych były częściowo kontynuacją tematyki podjętej podczas pracy magisterskiej („*Wskaźniki gospodarki lipidowej i glikacja lipoprotein u dzieci z cukrzycą leczonych insuliną*”), którą wykonywałam w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie, gdzie jednocześnie rozpoczęłam pracę zaraz po ukończeniu studiów. Moje zainteresowania lipidami i lipoproteinami trwają już prawie ćwierć wieku. Dotyczą one zaburzeń gospodarki lipidowej w różnych sytuacjach klinicznych. Początkowo skupiałam się na cukrzycy typu 1 u dzieci, w różnych przedziałach wiekowych. Ważnym i wówczas nowatorskim elementem tych badań było oznaczenie glikowanych form lipoprotein. Wykazałam, że u dzieci z cukrzycą typu 1 dochodzi do glikacji lipoprotein surowicy krwi, przy czym bardziej podatne na modyfikacje były HDL niż LDL (Załącznik 4 – II: 1.2.1., 2.1.1., 2.2.1.).

Następnym zagadnieniem badawczym było różnicowanie zaburzeń lipidowych w otępieniu typu naczyniopochodnego oraz typu alzheimerowskiego. Postacie zespołu otępiennego były rozpoznawane na podstawie dobranych kwestionariuszy informacyjnych, wyników skal kliniczno-psychologicznych oraz wyników badań dodatkowych. Pacjentów, u których tomografia komputerowa uwidoczniała uogólniony zanik mózgu, bez uszkodzeń ogniskowych zakwalifikowano do grupy z OA (otępienie typu alzheimerowskiego), zaś do grupy ON (otępienie typu naczyniopochodnego) zaliczono chorych z co najmniej 2 ogniskami zawałowymi. W grupie pacjentów z ON zaobserwowałam podwyższone wartości wskaźnika aterogenności oraz podstawowych parametrów gospodarki lipidowej, w tym apolipoproteiny B w porównaniu z pacjentami z OA. Badania te mogą być pomocne zarówno w diagnostyce, jak i w podejmowaniu decyzji dotyczących sposobu terapii pacjentów z otępieniem (Załącznik 4 – II: 1.2.2).

Inną grupą, która znalazła się w kręgu moich zainteresowań byli pacjenci z ostrym udarem mózgu z cukrzycą i bez cukrzycy. Analizie poddałam stężenia podstawowych parametrów gospodarki lipidowej, w tym stężenie Lp(a), wskaźników aterogenności oraz parametrów wstecznej kontroli glikemii. Analiza statystyczna nie ujawniła istotnych różnic pomiędzy badanymi parametrami w analizowanych podgrupach. Zaobserwowałam jednak, iż stężenia cholesterolu HDL i Lp(a) mieściły się już w zakresie wartości podwyższonego

ryzyka zagrożenia miażdżycą (*Załącznik 4 – II: 1.2.3., 2.1.4., 2.2.3., 2.2.5.*). Analizowałam również parametry gospodarki lipidowej u chorych z ostrym udarem mózgu w zależności od wieku i płci pacjentów. U mężczyzn w wieku >80 lat w porównaniu z mężczyznami w wieku 60-70 lat stwierdziłam znaczne wyższe stężenia cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL. Odmienną tendencję zaobserwowałam u kobiet, z najwyższymi stężeniami tych samych parametrów w wieku 60-70 lat w porównaniu z kobietami w wieku >80 lat (*Załącznik 4 – II: 1.2.4.*).

Moje zainteresowania naukowe w zakresie zaburzeń lipidowo-lipoproteinowych obejmowały również kobiety ciężarne z cukrzycą typu 1, rozpoznaną przed ciążą. Mogłam je realizować dzięki współpracy z Katedrą i Kliniką Gastroenterologii i Chorób Przemiany Materii WUM. Badania wykonałam w okresie planowania ciąży, w kolejnych trymestrach ciąży oraz po porodzie. Taki protokół badawczy pozwalał na oszacowanie wcześniejszego ryzyka zagrożenia miażdżycą badanych kobiet (*Załącznik 4 - II: 2.1.2., 2.1.3., 2.1.5., 2.1.6., 2.1.7., 2.1.8., 2.2.2., 2.2.4., 2.2.6., 2.2.7.*). Owoce tych badań była rozprawa doktorska pt. „*Zaburzenia gospodarki lipidowej u kobiet w ciąży powikłanej cukrzycą w warunkach intensywnej insulinoterapii*”.

Nawiązana współpraca z Zakładem Biochemii Instytutu Reumatologii w Warszawie skierowała moje zainteresowania na metabolizm oksydacyjny neutrofilów izolowanych z płynu stawowego pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) przed i po zastosowaniu krioterapii. W badaniach tych wykorzystałam pomiar chemiluminescencji (CL) lucygenino-zależnej (aktywność zewnątrzkomórkowa) oraz luminolo-zależnej (aktywność wewnątrzkomórkowa) neutrofilów. Zaobserwowałam zwiększoną zdolność płynu stawowego uzyskanego ze stawu poddanego krioterapii do aktywowania kontrolnych neutrofilów oraz obniżenie aktywności neutrofilów izolowanych ze stawów poddanych krioterapii. Wyniki te były pierwszą próbą powiązania korzystnych efektów klinicznych krioterapii z jej wpływem na metabolizm neutrofilów (*Załącznik 4 – II: 1.2.5., 1.2.7.*).

5.2. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA INNA NIŻ ZGŁOSZONA DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO, PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam swoje zainteresowania, skupione na zaburzeniach gospodarki lipidowo-lipoproteinowej oraz innych współistniejących zaburzeniach w różnych sytuacjach klinicznych. Główny nurt prowadzonych badań, dotyczący roli nowych biomarkerów w diagnostyce, ocenie skuteczności leczenia i patofizjologii chorób układu sercowo-naczyniowego, został już podsumowany w części dotyczącej osiągnięcia naukowego, będącego podstawą postępowania habilitacyjnego. Poniżej zaś przedstawię pozostałe prace (oryginalne, pogładowe, komunikaty zjazdowe oraz rozdziały w monografiach), których jestem autorem bądź współautorem.

Kobiety ciężarne z cukrzycą typu 1 były nadal w centrum mojej uwagi. Zaobserwowałam wyższe stężenia $\alpha 1$ -antytrypsyny w surowicy krwi u kobiet w ciąży z cukrzycą typu 1 w porównaniu z kobietami w ciąży bez cukrzycy i były one najwyższe w trzecim trymestrze ciąży. Warto podkreślić, że zwiększone stężenie $\alpha 1$ -antytrypsyny w surowicy krwi u kobiet ciężarnych z cukrzycą nie było uzależnione od wyrównania ich glikemii (Załącznik 4 - III: 1.1.1.). Kontynuowałam również badania zaburzeń gospodarki lipidowej występujące w ciąży powikłanej cukrzycą typu 1 w zależności od czasu trwania cukrzycy i jej metabolicznego wyrównania. Zaobserwowałam, że stan wyrównania metabolicznego u kobiet w ciąży obciążonej cukrzycą typu 1 poprawiał się wraz ze stopniem zaawansowania ciąży, czemu nie towarzyszyła jednak poprawa parametrów gospodarki lipidowej. Pomimo realizacji programu intensywnej insulinoterapii, obserwowałam niekorzystne zmiany metabolizmu lipidowego nasilające się wraz z zaawansowaniem ciąży. Po porodzie nie powracały do stanu z początkowego okresu ciąży, zwiększając ryzyko miażdżycy (Załącznik 4 - III: 1.2.3., 1.2.6., 2.2.1, 2.2.2.).

Innym obszarem moich zainteresowań były zagadnienia dotyczące zaburzeń metabolicznych u dzieci. Było to możliwe dzięki współpracy z Kliniką Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii, Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie. Głównym celem tej współpracy była ocena wpływu długoterminowej terapii immunosupresyjnej na profil lipidowy u dzieci w czasie od 3 do 5 lat po przeszczepie wątroby. Analizowałam trzy protokoły leczenia immunosupresyjnego: 1). cyklosporyna (CsA, Neoral), 2). takrolimus (Tac, Prograf) oraz 3) mykofenolan mofetilu (MMF, CellCept) w połączeniu z cyklosporyną w zakresie zaburzeń metabolizmu lipidów, węglowodanów i stresu oksydacyjnego, związanego z długotrwałą immunosupresją u dzieci po przeszczepie wątroby.

Zaobserwowałam, że zastosowaniu cyklosporyny towarzyszył silniejszy niekorzystny wpływ na metabolizm cholesterolu niż leczenie takrolimusem (Załącznik 4 - III: 1.5.1., 1.6.1, 2.2.5.).

Współpraca z Kliniką Neonatologii CMKP w Warszawie zaowocowała badaniami nad poznaniem mechanizmów niedokrwistości u dzieci z chorobą hemolityczną (ChHN) w I kwartale życia. Głównym celem była ocena i porównanie nasilenia procesu hemolizy i erytropoezy u dzieci leczonych transfuzjami dopłodowymi (TD), jak i nie leczonych w okresie płodowym. Stwierdzono, że przedłużanie się niedokrwistości w I kwartale życia (późna anemia) u dzieci z ChHN, nawet u tych leczonych TD, nie zależy od zahamowania wytwarzania erytrocytów, ale jest wynikiem przewagi procesu hemolizy nad erytropoezą. Nie stwierdziłam niedoboru erytropoetyny (EPO) u dzieci z ChHN, a wręcz obserwowałam u nich wyższe stężenie EPO w surowicy krwi niż u dzieci zdrowych (Załącznik 4 - III: 1.2.5, 2.2.3.).

Hodowle komórkowe *in vitro* stały się moim kolejnym wyzwaniem badawczym. Widziałam wówczas możliwość połączenia głównego nurtu badawczego, jakim były zaburzenia o charakterze aterogennym z poszukiwaniem mechanizmów je powodujących. Skupiłam się na wykorzystaniu hodowli komórek śródbłonka i badaniu wpływu ochronnego, bogatego w antocyjany ekstraktu z *Aronia melanocarpa*, na apoptozę komórek śródbłonka indukowaną 7-beta-hydroksycholesterolem. Przeprowadzone badania wykazały, że zawarte w ekstrakcie *Aronia melanocarpa* polifenole wykazują działanie ochronne na apoptozę komórek śródbłonka. Mechanizm tego zjawiska polega na ograniczeniu powstawania reaktywnych form tlenu i hamowaniu uwalniania cytochromu c z mitochondriów. Zaobserwowane efekty potwierdzają korzystny wpływ roślinnych polifenoli, szczególnie w chorobach sercowo-naczyniowych (Załącznik 4 - III: 1.1.2., 1.6.2., 2.2.6.).

Innym zagadnieniem związanym z hodowlami komórkowymi, chociaż nie dotyczących patogenezy miażdżycy, była hodowla pierwotnych komórek nabłonka przedniego rogówki wołowej. Podjęłam się próby opracowania modelu doświadczalnego, umożliwiającego badanie przenikania substancji leczniczych o charakterze lipo- i hydrofilnym przez barierę nabłonka przedniego rogówki wołowej w warunkach *in vitro*. Zagadnienie to jest niezwykle istotne zwłaszcza w dobie stosowanych przeszczepów rogówki ale wiąże się również z możliwościami poszukiwania nowych metod pozyskiwania materiału klinicznego do transplantacji (Załącznik 4 - III: 1.1.3., 1.6.3., 2.2.4.).

Epizod badań na modelu hodowli komórkowych nie przerwał moich głównych zainteresowań związanych z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, a szczególnie z konsekwencjami nie wyrównanej cukrzycy. Podczas 2-letniej obserwacji pacjentów

z cukrzycą typu 2 bez wyrównania w zakresie gospodarki węglowodanowej mimo stosowanej farmakoterapii, odnotowałam 24%-owy wzrost występowania nadciśnienia tętniczego (>130/80mmHg) u mężczyzn oraz 8%-owy wzrost występowania nadwagi u kobiet (Załącznik 4 - III: 1.2.7., 2.2.9.).

W ocenie ryzyka występowania chorób sercowo-naczyniowych pomocne mogą być badania genetyczne. Stąd też celem badań była ocena polimorfizmu rs20455 genu *KIF6* jako genetycznego czynnika ryzyka choroby wieńcowej. Dokonałam również przeglądu systematycznego doniesień, dotyczących potencjalnego wpływu polimorfizmu rs20455 genu *KIF6* (polimorfizm Trp719Arg) na rozwój choroby wieńcowej oraz jego znaczenia w odpowiedzi terapeutycznej na leczenie statynami. Ze wszystkich przeanalizowanych publikacji, w pięciu badaniach klinicznych w grupie pacjentów z polimorfizmem rs20455 genu *KIF6* stwierdzono zwiększoną zapadalność na chorobę wieńcową (ryzyko względne od 1.18 do 1.55). W grupie pacjentów z polimorfizmem genu *KIF6* Trp719Arg zastosowana terapia simwastatyną (40mg/dzień) skutkowała zmniejszeniem zapadalności na chorobę wieńcową, w zależności od badania o 37%, 50% i 34% (Załącznik 4 - III: 1.2.8., 2.1.1.).

Otyłość stanowi czynnik ryzyka wielu chorób przewlekłych, a głównie chorób układu sercowo-naczyniowego. Efektem tych zainteresowań było przygotowanie monografii „*Otyłość i zespół metaboliczny*”. Szczególną uwagę zwróciłam na charakterystyczne zaburzenia występujące w zespole metabolicznym i kliniczne konsekwencje otyłości, a także typy tkanki tłuszczowej oraz charakterystykę poszczególnych adipocytokin (Załącznik 4 – III:3.1.1.). Zagadnienia dotyczące metabolizmu lipoprotein były tematem przewodnim kilku publikacji poglądowych oraz rozdziałów w monografiach. Przedstawiam w nich aktualny stan wiedzy w zakresie: insulinooporności, aterogennej dyslipidemii, konsekwencji zaburzeń aktywności tkanki tłuszczowej, objawiających się zmienioną produkcją adipocytokin oraz wzmożonej gotowości prozakrzepowej. (Załącznik 4 - III: 1.4.9., 1.4.10., 3.2.5., 3.2.2., 3.2.3., 3.2.4.). Częstym powikłaniem występującym u pacjentów z chorobami układu krążenia są zaburzenia zakrzepowo-zatorowe. Zakrzepica jest krytycznym zjawiskiem w chorobach tętnic, związanych z występowaniem zawału mięśnia sercowego i udarów mózgu. Żyłna choroba zakrzepowo-zatorowa jest przyczyną znacznej chorobowości i umieralności. Niezwykle istotne są mechanizmy fizjologii hemostazy oraz diagnostyka laboratoryjna choroby zakrzepowo-zatorowej i monitorowanie leczenia przeciwzakrzepowego, z uwzględnieniem nowych doustnych antykoagulantów, takich jak: dabigatran, rivaroxaban i apixaban. Zagadnienia te były przedmiotem 3 rozdziałów w monografii pt. „*Zakrzepica*” (Załącznik 4 - III: 3.2.2., 3.2.3., 3.2.4.), której jestem współautorem.

Wiedza i doświadczenie zdobyte w badaniach zaburzeń gospodarki lipidowo-lipoproteinowej skutkowało do przyjęcia zaproszenia do przygotowania 2 rozdziałów w monografii „*Hipercholesterolemie i dyslipidemie – mechanizmy, diagnostyka i leczenie*” pod redakcją Prof. K.J.Filipiaka i Prof. D.Sitkiewicza. Jeden z tych rozdziałów dotyczył aterogennej dyslipidemii w zespole metabolicznym (Załącznik 4 – III: 3.2.5). Kolejny rozdział był poświęcony zależnościom pomiędzy witaminą D a terapią statynami (Załącznik 4 – III: 3.2.6.).

Witaminą D zajęłam się szczególnie, chcąc zwrócić uwagę na jej częste niedobory w ogólnej populacji. Niedobór witaminy D oraz polimorfizm receptora witaminy D (VDR) są często rozpatrywane jako czynnik ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych. Od wielu już lat naukowcy, co też zostało udokumentowane w przygotowanych pracach poglądowych (Załącznik 4 – III: 1.3.1., 1.3.2.), zwracają również uwagę na efekty plejotropowego działania statyn poprzez szlaki metabolizmu witaminy D. Przeprowadziłam również w tym zakresie badania dotyczące stanu zaopatrzenia w witaminę D (oceniane stężeniem 25(OH)D), wpływu poszczególnych polimorfizmów receptora witaminy D (VDR) na działanie hipolipemizujące zastosowanej atorwastatyny w następstwie epizodu ostrego zespołu wieńcowego oraz dokonałam oceny tego efektu po pierwszym miesiącu stosowania atorwastatyny (Załącznik 4 – III: 2.2.11.). U badanych pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym zostały wykazane w 83% niedobory witaminy D. Już po 30 dniach terapii atorwastatyną stężenie 25(OH)D u każdego pacjenta uległo zmianie i ujawniło wzrost w porównaniu ze stężeniem 25(OH)D przed leczeniem atorwastatyną o 8.63%. Zmiana ta była niezależna od typu ostrego zespołu wieńcowego oraz polimorfizmu Fok1 receptora VDR (uzyskane wyniki są przedmiotem przygotowywanej publikacji).

Współpraca z Samodzielną Pracownią Promieniowców i Grzybów Niedoskonałych (EG) Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie pozwoliła na poszerzenie wiedzy z zakresu etiologii zakażeń *Candida albicans* oraz umożliwiła przedstawienie szczegółowej morfologii *C.albicans* metodą mikroskopii elektronowej (Załącznik 4 - III: 1.1.4.). Częstość występowania kandydoz (*Candida spp.* – czwarte miejsce wśród mikroorganizmów izolowanych od pacjentów hospitalizowanych w Oddziałach Intensywnej Terapii na świecie), a także wysoka śmiertelność (40-60%) u chorych z immunosupresją spowodowały konieczność lepszego poznania czynników wirulencji *Candida spp.* oraz opracowania czułych, swoistych metod diagnostycznych i nowych strategii zwalczania kandydoz. Szczegółowe poznanie wirulencji może usprawnić postępowanie diagnostyczne, a następnie pozwoli na zastosowanie właściwych metod terapii

tych kandydoz. W materiale klinicznym pobranym od pacjentów z podejrzeniem wystąpienia kandydozy powierzchniowej (paznokci rąk i jamy ustnej), między innymi pacjentów z długoletnią cukrzycą typu 2, został oceniony poziom transkryptu mRNA badanego genu *APE2*. Przeprowadzona analiza ekspresji wykazała zróżnicowany poziom transkryptu mRNA badanego genu pomiędzy analizowanymi próbkami. W jednej z badanych próbek została odnotowana nadekspresja *APE2*, wskazująca na zakażenie o etiologii *Candida albicans* (Załącznik 4 - III: 1.2.9.).

Poza opisaną działalnością naukowo-badawczą - moja aktywność naukowa dotyczyła również prezentacji najnowszych osiągnięć z kręgu moich zainteresowań, w czasopismach o charakterze popularno-naukowym. Owocem tej działalności jest: 31 artykułów, opublikowanych w czasopismach: Świat Lekarza i Manager Apteki (opis artykułów został zamieszczony w Załączniku 7 w części: Działalność popularyzująca naukę – Prace popularno-naukowe). Prace te, dotyczą głównie cukrzycy i jej klinicznych konsekwencji a także stosowanej terapii farmakologicznej i nefarmakologicznej.

W latach 2012-2014 – byłam promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Pera pt.: „*Witamina D a efektywność stosowania statyn u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca*” (26. listopada 2014 roku - obrona w.w rozprawy doktorskiej na Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego).

6. PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Mój dorobek naukowo-badawczy obejmuje łącznie: 44 publikacje naukowe, w tym:

- 1). **Oryginalne** pełnotekstowe publikacje naukowe posiadające *Impact Factor*:
n=10; IF=13.497, MNiSW/KBN=185, IC=34.9.

Oryginalne pełnotekstowe publikacje naukowe nie posiadające *Impact Factor*:
n=17; IF= -, MNiSW/KBN=59, IC=63.04.

- 2). Publikacje **poglądowe** w czasopismach posiadających *Impact Factor*:
n=3; IF=1.361, MNiSW/KBN=45, IC=33.75.

Publikacje **poglądowe** w czasopismach nie posiadających *Impact Factor*:
n=14; IF= -, MNiSW/KBN=35, IC=29.41.

- 3). Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism posiadających *Impact Factor*:
n=1; IF=1.424.

Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism nie posiadających *Impact Factor*:
n=3; IF= -.

- 4). Komunikaty zjazdowe: *Zjazdy międzynarodowe*: **n=26,**
Zjazdy krajowe: **n=24.**

- 5). Prace popularno-naukowe: **31 artykułów.**

- 6). Recenzje publikacji w czasopismach z *Impact Factor*: **17 recenzji**
Kardiologia Polska: (**n=14**),
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: (**n=2**),
Cardiology: (**n=1**).

- 7). Udział w realizacji: **4 grantów badawczych.**

- 8). Łączna liczba punktów: IF, MNiSW/KBN oraz IC, jaką uzyskały publikacje z moim udziałem: **(n=38); IF=14.858, MNiSW/KBN=324, IC=161.1.**

Łączna liczba punktów: IF, MNiSW/KBN oraz IC za publikacje, które stanowią osiągnięcie naukowe: **(n=7); IF = 9.528, MNiSW/KBN=123, IC=26.35.**

Łączna liczba punktów: IF, MNiSW/KBN oraz IC za publikacje, w których jestem pierwszym autorem: **(n=19); IF=7.599, MNiSW/KBN=143, IC=74.92.**

Łączna liczba punktów: IF, MNiSW/KBN oraz IC za publikacje, w których jestem autorem korespondencyjnym: **(n=17); IF=5.590, MNiSW/KBN=125, IC=71.62.**

Liczba cytowań wg bazy Web of Science = **34** (bez autocytowań),
wg bazy Scopus = **44** (bez autocytowań).

Indeks Hirscha wg bazy Web of Science **h=4**,
wg bazy Scopus **h=4**.

Grażyna Sygnowicz

