



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**EKSPRESJA WYBRANYCH CZĄSTEK MIKRO-RNA U PACJENTÓW
PODDAWANYCH CHIRURGICZNEJ REWASKULARYZACJI NACZYŃ
WIEŃCOWYCH Z ZASTOSOWANIEM RÓŻNYCH METOD
ZNIECZULENIA**

ROZPRAWA DOKTORSKA

LEK. MED. GRZEGORZ WYSOCZAŃSKI

KATEDRA I KLINIKA ANESTEZJOLOGII I INTENSYWNEJ TERAPII
UNIwersytet Medyczny we Wrocławiu

PROMOTOR
PROF. DR HAB. WALDEMAR GOŹDZIK

WROCLAW 2023 r.

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi mojej pracy
prof. dr hab. Waldemarowi Goździkowi,*

*a także dr hab. Barbarze Adamik, dr Mateuszowi Olbromskiemu
oraz mgr Łukaszowi Stróżeckiemu*

Dziękuję także mojej rodzinie za wsparcie i cierpliwość.

***Dedykuję ojcu:
Marianowi Wysoczańskiemu***

SPIS TREŚCI

1	WSTĘP	7
1.1	Wprowadzenie.....	7
1.2	Mechanizm niedokrwienego uszkodzenia mięśnia sercowego	7
1.3	Hartowanie mięśnia sercowego.....	8
1.3.1	Hartowanie farmakologiczne.....	9
1.4	Biochemiczne markery uszkodzenia mięśnia sercowego i urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego	12
1.4.1	Definicja idealnego markera.....	12
1.4.2	Biochemiczne markery w diagnostyce uszkodzenia mięśnia sercowego .	12
1.5	Okołooperacyjny zawał serca – rola biomarkerów urazu niedokrwienno- reperfuzyjnego.....	15
1.5.1	Izoenzym MB kinazy fosfokreatynowej (CK-MB).....	15
1.5.2	Troponiny	16
1.6	MikroRNA (miRNA).....	18
1.6.1	Biologia mikroRNA (miRNA)	19
1.6.2	MiRNA-499	22
1.6.3	MiRNA-133	23
1.6.4	MiRNA-1.....	23
1.6.5	MiRNA-21.....	25
2	Cele badania	27
3	Materiał i metodyka badania.....	28
3.1	Grupa badana i kryteria kwalifikacji do badania.....	28
3.1.1	Kryteria włączenia	28
3.1.2	Kryteria wyłączenia	28

3.1.3	Postępowanie przedoperacyjne.....	29
3.1.4	Postępowanie anestezjologiczne.....	29
3.1.5	Randomizacja i metody znieczulenia.....	30
3.1.6	Dalsze postępowanie anestezjologiczne.....	31
3.1.7	Techniki operacyjne.....	33
3.1.8	Postępowanie pooperacyjne.....	34
3.2	Metodyka badań laboratoryjnych.....	35
3.2.1	Pobierany materiał biologiczny.....	35
3.2.2	Kodowanie i zabezpieczanie próbek krwi oraz bioptatów tkankowych...36	
3.2.3	Badanie ekspresji miRNA.....	36
3.2.4	Badanie troponiny I i CKMB _{akt.}	37
4	Analiza statystyczna.....	38
5	Wyniki.....	39
5.1	Charakterystyka badanej grupy.....	39
5.2	Biomarkery biochemiczne – dynamika ich zmian w czasie we krwi.....	45
5.2.1	CKMB _{akt.}	45
5.2.2	Troponina I (hs-Tn I).....	46
5.3	MiRNA.....	48
5.3.1	MiRNA-499–5p.....	48
5.3.2	MiRNA-1–3p.....	50
5.3.3	MiRNA-133a–5p.....	52
5.3.4	MiRNA-21–5p.....	53
5.4	Ocena wzajemnych korelacji biomarkerów uszkodzenia mięśnia sercowego i analizowanych miRNA we krwi.....	55
5.4.1	MiRNA-133a–5p / Troponina I.....	55
5.4.2	MiRNA-499–5p / CKMB _{akt.}	56

5.5	Ekspresja miRNA w biopsjach prawego przedsionka serca.....	56
5.6	Wpływ stopnia ekspresji miRNA na ryzyko wystąpienia migotania przedsionków	58
5.7	Profil kinetyki miRNA we krwi pełnej, w zawale okołoperacyjnym.....	59
5.8	Wzajemne korelacje badanych miRNA we krwi pełnej w poszczególnych punktach czasowych.	59
5.8.1	MiRNA-499-5p	59
5.8.2	MiRNA-133a-5p	61
5.8.3	MiRNA-1-3p	63
5.8.4	MiRNA-21-5p	64
5.9	Wzajemne korelacje badanych miRNA w biopsjach mięśnia prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.....	66
5.9.1	MiRNA-499-5p	66
5.9.2	MiRNA-133a-5p	67
5.9.3	MiRNA-1-3p	67
5.9.4	MiRNA-21-5p	68
5.10	Wpływ czasu trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasu trwania zaklepowania aorty (ACC), czasu reperfuzji na poziom ekspresji badanych miRNA oraz stężenia troponiny I we krwi.	69
5.10.1	Troponina I	69
5.10.2	MiRNA-499-5p	70
5.10.3	MiRNA-133a-5p	71
5.10.4	MiRNA-1-3p	72
5.10.5	MiRNA-21-5p	72
5.11	Korelacja czasu trwania zaklepowania aorty (ACC) z ekspresją miRNA w biopsjach mięśnia prawego przedsionka po zakończeniu krążenia pozaustrojowego (CBP).....	73
6	Dyskusja.....	75

6.1	MiRNA-499-5p.....	76
6.2	MiRNA-133a-5p.....	79
6.3	MiRNA-1-3p	82
6.4	MiRNA-21-5p.....	83
6.5	Metoda znieczulenia a proces ochrony mięśnia serca podczas operacji rewaskularyzacji wieńcowej	86
6.6	Wpływu czynników operacyjnych na kinetykę stężeń troponiny I oraz ekspresję badanych miRNA	87
6.7	Ograniczenia pracy	89
7	Wnioski	93
8	Piśmiennictwo	94
9	Spis tabel	113
10	Spis rycin.....	117
11	Wykaz skrótów użytych w tekście	118
12	Streszczenie.....	126
13	Summary	132

1 WSTĘP

1.1 WPROWADZENIE

Pomimo postępów w profilaktyce i leczeniu zachowawczym choroba niedokrwienna serca nadal pozostaje jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności i zgonów na świecie. U pacjentów z wielonaczyniową chorobą wieńcową, niezależnie od dynamicznego rozwoju przezskórnych technik małoinwazyjnych, zabieg operacyjny pomostowania aortalno-wieńcowego jest nadal powszechnym i uznanym sposobem rewaskularyzacji wieńcowej. Według Krajowego Rejestru Operacji Kardiologicznych (KROK) w 38 ośrodkach w Polsce wykonuje się około 25 do 26 tys. zabiegów rocznie [1].

Zabieg pomostowania aortalno-wieńcowego ma na celu poprawę przepływu wieńcowego, należy jednak pamiętać, że sam w sobie stanowi różnie nasilony uraz niedokrwiennie-reperfuzyjny (IRI – Ischemia Reperfusion Injury), szczególnie w sytuacji, kiedy wykonywany jest z użyciem krążenia pozaustrojowego (CPB – cardiopulmonary bypass). Skutkować to może okołooperacyjnym uszkodzeniem mięśnia serca lub jego zawałem, nie bez znaczenia pozostają też skutki oddziaływania CPB na funkcjonowanie innych układów i narządów.

1.2 MECHANIZM NIEDOKRWIENNEGO USZKODZENIA MIĘŚNIA SERCOWEGO

Utrzymujące się przewlekłe niedokrwienie serca powoduje stres oksydacyjny z uruchomieniem patologicznych mechanizmów wewnątrzkomórkowych doprowadzający do aktywacji apoptozy (procesu zaprogramowanej śmierci komórki) i martwicy komórek mięśnia serca lub jego stanu zapalnego z patologiczną przebudową i dysfunkcją komór serca. Następstwem niedoboru tlenu w komórce jest wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie, który stymuluje otwarcie megakanałów MPTP (mitochondrial permeability transition pore) w mitochondrium komórkowym, co doprowadza do rozprężenia łańcucha oddechowego i uwolnienia cytochromu C do cytoplazmy. W konsekwencji prowadzi to do postępującego zmniejszania zapasów ATP, obrzęku mitochondriów i śmierci komórki [2]. Przywrócenie przepływu krwi może ochronić

niedokrwiony obszar mięśnia sercowego, ale może też być przyczyną wtórnego urazu związanego z reperfuzją. Jest on spowodowany nagłym wzrostem dostarczania tlenu do uprzednio niedokrwionych tkanek, co zwiększa uwalnianie między innymi reaktywnych form tlenu pochodzących z łańcucha oddechowego. Prowadzić to może w rezultacie do uszkodzenia błon komórkowych, zaburzeń metabolizmu kardiomiocytów oraz funkcji śródbłonna naczyniowego z wtórną embolizacją i zaburzeniami przepływu [3, 4]. Zaburzenia reperfuzyjne prowadzące do uszkodzenia miokardium mogą manifestować się jako: ogłuszenie mięśnia serca (przedłużony okres dysfunkcji skurczowej miocytów), arytmie poreperfuzyjne, zaburzenia mikrokrążenia (w obszarze reperfundowanym (zjawisko tzw. noreflow phenomenon), a w najbardziej krytycznym wymiarze śmiercią komórek w wyniku nekrozy i apoptozy. Splot tych czynników może decydować o prawidłowości przebiegu pooperacyjnego, w tym wystąpieniu powikłań i dalszym rokowaniu pacjenta [4, 5, 6].

1.3 HARTOWANIE MIĘŚNIA SERCOWEGO

Doniesienia ostatnich lat potwierdzają zależność stopnia nasilenia urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego wyrażonego ekspresją markerów biochemicznych od rodzaju znieczulenia zastosowanego podczas zabiegów kardiologicznych, szczególnie tych z użyciem krążenia pozaustrojowego [7, 8]. Mechanizmy endoprotekcyjne serca (tzw. hartowanie albo kondycjonowanie), czyli wytworzenia naturalnej odporności na uraz niedokrwienno-reperfuzyjny wzbudzały szczególne zainteresowanie w ostatnich latach i znalazły zastosowanie kliniczne w chirurgii serca. Tak zwane „hartowanie niedokrwienne” wykorzystuje endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne uruchamiane w odpowiedzi na różne bodźce uszkodzające, na przykład krótkotrwałe incydenty niedokrwienia. Parokrotnie powtarzane, krótkotrwałe okresy niedokrwienia i powrotu przepływu poprzedzające długotrwały etap niedokrwienia powodują powstanie tzw. pamięci wewnątrzkomórkowej w postaci wydłużonej w czasie tolerancji komórek mięśnia sercowego na uraz niedokrwienno-reperfuzyjny. W sytuacji, kiedy kolejny incydent niedokrwienno-reperfuzyjny trafi na okres zwiększonej tolerancji, spowodowane nim uszkodzenia będą mniejsze [9, 10]. Przeprowadzone badania dowiodły, że dzięki uodpornieniu niedokrwienemu nie tylko zmniejsza się strefa martwicy, ale także ryzyko arytmii [11, 12, 13]. Poprawia się kurczliwość mięśnia serca, a to sprzyja powrotowi prawidłowej funkcji niedokrwionego

narządu po reperfuzji [14]. Badania kliniczne nad wykorzystaniem mechanizmów hartowania niedokrwiennego podczas zabiegów chirurgicznego pomostowania naczyń wieńcowych wskazywały na skuteczność takiego postępowania, co manifestowało się zachowaniem większych rezerw ATP w miokardium oraz niższymi wartościami troponiny I po operacji [15].

1.3.1 HARTOWANIE FARMAKOLOGICZNE

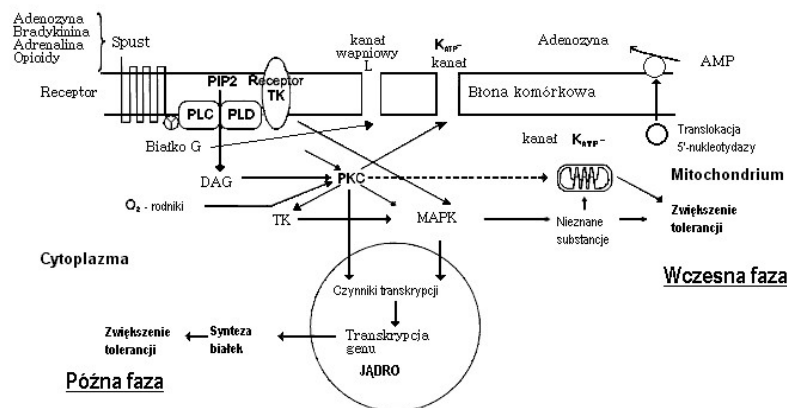
Budząca wątpliwość inwazyjność mechanicznego śródoperacyjnego hartowania mięśnia sercowego (kilkukrotne krótkotrwałe zamknięcie aorty z zatrzymaniem przepływu wieńcowego i powrót przepływu wieńcowego z reperfuzją) oraz związanych z tym ewentualnych powikłań (uraz aorty, uwolnienie materiału zatorowego) skierowały badania na możliwości wykorzystania mechanizmów hartowania z wykorzystaniem metod farmakologicznych. Hartowanie farmakologiczne polega na stymulacji tych samych lub zbliżonych do hartowania niedokrwiennego wewnątrzkomórkowych punktów spustowych za pomocą środków farmakologicznych, które z kolei uruchamiają szlaki sygnałowe odpowiedzialne za wytworzenie odporności mięśnia serca na uraz niedokrwienno-reperfuzyjny [10, 16].

Kluczową rolę w tym wypadku mogą odgrywać środki stosowane w trakcie anestezji do operacji kardiochirurgicznych: opioidy, anestetyki dożyłne – propofol, a w szczególności inhalacyjne środki anestetyczne. Przełomem w tym zakresie okazały się wyniki badań klinicznych opublikowanych przez De Hert'a i wsp. potwierdzających zachowanie lepszej kurczliwości lewej komory oraz niższe stężenia markerów uszkodzenia serca u pacjentów znieczulanych z użyciem anestetyków inhalacyjnych (sewofluranu i desfluranu) w porównaniu z pacjentami znieczulanymi propofolem [17].

Mechanizm ochronny z udziałem anestetyków inhalacyjnych tłumaczony jest głównie ich zdolnościami łączenia się z bogatymi w sfingolipidy wpukleniami błon komórkowych tzw. kaweolami. W kolejnym etapie dochodzi do aktywacji wewnątrzkomórkowych punktów spustowych z udziałem syntazy tlenu azotu, cyklooksygenazy 2 i 12-lipoosygenazy. W konsekwencji prowadzi to do zwiększenia produkcji wolnych rodników tlenowych, które pełnią rolę przekaźników wewnątrzkomórkowych. Na kolejnych etapach dochodzi do aktywacji sekwencji białek o działaniu ochronnym. We wczesnym hartowaniu są to kinazy białkowe (kinaza białkowa C, kinaza tyrozynowa, kinaza p 38, kinaza fosfatidyloinozytolowa-3/Akt-

kinaza białkowa B), a w mechanizmach późnego hartownia, między innymi, białka szoku cieplnego (HSP), które z kolei uruchamiają otwarcie mitochondrialnych oraz sarkolemmalnych ATP–zależnych kanałów potasowych. W końcowym efekcie powoduje to wyciszenie reakcji bioenergetycznych w mitochondrium, jeszcze przed okresem niedotlenienia spowodowanego niedokrwieniem. Dochodzi także do opóźnienia otwarcia kanałów MPTP zmniejszenia ich wrażliwości na wysokie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie w okresie niedokrwienia i wczesnej reperfuzji [18, 19, 20, 21, 22, 23].

Rycina 1. Hartowanie niedokrwienne – proces aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych.



Schemat ilustrujący proces aktywacji wewnątrzkomórkowych dróg podczas hartowania niedokrwiennego PLC-fosfolipaza C, PLD - fosfolipaza D, DAG - dwunacyloglicerol, PKC - białkowa kinaza C, TK - tyrozynowa kinaza, PIP2 - 4,5 difosforan fosfatydilinozytolu, K-ATP - kanały potasowe ATP-zależne, MAPK - kinaza aktywująca geny podzestu

Zaadaptowane [24, 25]

Inną możliwością farmakologicznej indukcji procesów hartowania jest aktywacja receptorów opioidowych. W tkance miokardium potwierdzono obecność receptorów μ , δ i κ . Główną rolę odgrywa aktywacja receptorów δ , sprzężonych z białkami G oraz receptora $\delta 1$, sprzężonego z kanałem potasowym ATP–zależnym. W kolejnych etapach poprzez aktywację szlaków sygnalizacyjnych z wykorzystaniem tlenu azotu, kinazy wczesnej protekcji (RISK – reperfusion injury salvage kinases), mitoK – ATP (mitochondrialny kanał potasowy ATP – zależny), kinazy GSK-3 β (kinaza 3 β syntazy glikogenu), mPTP (megakanal mitochondrialny), NF-kB (nuclear factor kappa-light-

chain-enhancer of activated B cells – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B) dochodzi do rozpoczęcia procesów wczesnego i późnego hartowania. Mechanizmy te mogą być również wykorzystywane w kardioanestezji, w tym przede wszystkim w premedykacji. Leki opioidowe wykazują, bowiem zmienne powinowactwo w stosunku do różnych podtypów receptorów. Morfina, z uwagi na jej działanie na receptory δ , wykazuje doskonały efekt kardioprotekcyjny, w przeciwieństwie do opioidów syntetycznych (np. fentanylu), których silniejsze powinowactwo do receptorów μ nieco ogranicza ich rolę w mechanizmie kardioprotekcji. Wydaje się, że fentanyl w większym stopniu pełni rolę w ograniczaniu reakcji zapalnej po krążeniu pozaustrojowym. W odniesieniu do innych syntetycznych opioidów stwierdzono, że zarówno zastosowanie remifentanylu (o przewodze oddziaływania na receptory μ) jak i sufentanylu (silny wpływ na receptory δ) chroniło czynność skurczową beleczek mięśnia sercowego po okresie niedotlenienia [26, 27, 28].

Propofol jest powszechnie stosowanym anestetykiem dożylnym w kardiochirurgii. Jest stosowany do indukcji znieczulenia, ale także może być wykorzystany, jako główny anestetyk w znieczuleniu całkowicie dożylnym (TIVA – Total intravenous anaesthesia), jest również podstawowym anestetykiem wykorzystywanym do sedacji pacjentów we wczesnym okresie pooperacyjnym. Badania eksperymentalne potwierdziły również jego właściwości kardioprotekcyjne [29, 30]. Stwierdzono, że propofol, podobnie jak witamina E, zawiera fenolową grupę hydroksylową, co wiąże się z jego działaniem przeciwutleniającym [31]. Propofol może zmiatać wolne rodniki, zarówno in vitro, jak in vivo [32], łagodzić zaburzenia rytmu serca i zmniejszać jego dysfunkcję skurczową [33] oraz ograniczać rozmiar zawału [34]. Ponadto wykazano, że propofol osłabia niekorzystne następstwa urazu niedokrwiennie reperfuzyjnego poprzez hamowanie apoptozy i zachowanie funkcji, aczkolwiek ten mechanizm działania nie jest do końca wyjaśniony [35].

1.4 BIOCHEMICZNE MARKERY USZKODZENIA MIĘŚNIA SERCOWEGO I URAZU NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNEGO

1.4.1 DEFINICJA IDEALNEGO MARKERA

Wszystkie wymienione farmakologiczne metody prewencji uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego w chirurgii serca nie gwarantują pełnej prewencji uszkodzenia błon komórkowych i struktur wewnątrzkomórkowych (retikulum endoplazmatycznego), w tym aparatu kurczliwego. Może to prowadzić do uszkodzenia/martwicy kardiomiocytów, a w konsekwencji uwolnienia ich zawartości, w tym markerów niedokrwienia mięśnia serca.

Obok oceny czynników ryzyka (przedoperacyjnego, śródoperacyjnego, pooperacyjnego), stanu klinicznego pacjenta oraz monitorowania parametrów życiowych, bardzo ważną rolę w opiece okołoperacyjnej odgrywa monitorowanie biomarkerów będących wykładnikiem prawidłowej funkcji poszczególnych narządów. Ich wysoka swoistość i czułość narządowa powinna pozwalać na wczesne wykrycie nieprawidłowości, a co za tym idzie szybką diagnostykę, stratyfikację ryzyka i wdrożenie odpowiedniej profilaktyki i leczenia. Istnieje wiele definicji idealnego biochemicznego markera niedokrwienia mięśnia sercowego, ale większość z nich sprowadza się do spełnienia następujących kryteriów:

- musi być obecny w kardiomiocytach w wysokim stężeniu
- nie powinien występować w innych tkankach
- powinien być uwalniany szybko po uszkodzeniu miokardium
- jego uwalnianie powinno być proporcjonalne do skali uszkodzenia
- powinien pozostawać w surowicy krwi w określonych przedziałach czasowych, w stężeniach pozwalających na ilościowe oznaczenie będące odzwierciedleniem narastania zmian martwiczych w zawale [36, 37, 38].

1.4.2 BIOCHEMICZNE MARKERY W DIAGNOSTYCE USZKODZENIA MIĘŚNIA SERCOWEGO

Minęło już ponad 69 lat od odkrycia pierwszych biochemicznych markerów

niedokrwienia mięśnia serca. W 1954 roku na łamach Science ukazała się praca wskazująca na wzrost aktywności aminotransferazy asparaginowej w surowicy krwi pacjentów z zawałem mięśnia sercowego [39]. W kolejnych etapach rozwoju badań, w latach 60-tych ubiegłego stulecia, odkryto wzrost aktywności kinazy fosfokreatynowej (CK) a w szczególności jej izoenzymu sercowego (CK-MB_{akt.}) w zawale mięśnia serca oraz korelację tego izoenzymu z obszarem niedokrwienia, martwicy mięśnia serca. Krokami milowymi w diagnostyce niedokrwienia mięśnia serca okazały się w latach 80-tych: rozwój ilościowych metod oznaczania stężenia białek strukturalnych kardiomiocytów – izoform troponin T (cTnT) i troponin I (cTnI) oraz stężenia sercowego izoenzymu kinazy kreatynowej (CK-MB_{mass}).

Przełomowym okazał się rok 2000 w którym na nowo zdefiniowano zawał serca uznając sercowe izoformy troponin za standardowy marker w jego diagnostyce [40]. Od tego czasu nastąpił ogromny postęp w diagnostyce biochemicznej jak i obrazowej stopnia niedokrwienia mięśnia sercowego. Z biegiem lat wprowadzano kolejne kryteria diagnostyczne zawału mięśnia sercowego, także z uwzględnieniem specyfiki okresu okołoperacyjnego zabiegów kardiologicznych. W kryteriach tych obok stanu klinicznego pacjenta, patologicznych zmian w zapisach EKG, pojawiających się zaburzeń w badaniach obrazowych nadal jedną z ważniejszych ról odgrywają zmiany w stężeniach biomarkerów. Na przełomie ostatnich lat, w poszukiwaniu idealnego markera, obok wyżej wymienionych, do najbardziej popularnych markerów, które próbowano wykorzystać w diagnostyce choroby niedokrwiennej serca i jej powikłań w postaci ostrych zespołów wieńcowych należały [41]:

- aminotransferaza alaninowa (AlAt) [42, 43, 44],
- dehydrogenaza mleczanowa (LDH) [45, 46],
- gammaglutamylotranspeptydaza (GGTP) [47, 48, 49],
- mioglobina [50, 51],
- kopeptyna C – końcowy fragment prohormonu wazopresyny [52],
- fosforylaza glikogenu – GPBB (*glycogen phosphorylase isoenzyme, GP-BB*) [53],
- rozpuszczalny lektynopodobny receptor dla oxyLDL - sLox-1 (*soulble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*) – marker niestabilności blaszki miażdżycowej [54, 55],
- peptydy natiuretyczne (BNP, NT-proBNP) [56, 57],
- białko C - reaktywne (hs-CRP) [58, 59, 60],

- albumina modyfikowana przez niedokrwienie (*IMA – ischemia modified albumin*) [61],
- sercowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (*h-FABP – heart, fat acid binding protein*) [62, 63],
- lekkie łańcuchy miozyny (*MLC – myosin light chain*) [64, 65, 66, 67],
- galektyna 3 [68],
- ciążowe białko osocza A (*PAPP-A – pregnancy-associated plasma protein*) [69],
- mieloperozydaza (MPO) – hemoproteina ziarnistości granulocytów obojętnochłonnych makrofagów [70, 71, 72],
- białko amyloidu A – (*serum amyloid A – SAA*) [59, 73],
- czynnik wzrostu GDF -15 (*Growth differentiation factor 15*) [74],
- cholina [75, 76],
- białko związane z receptorem interleukiny-1 ST2 (*Interleukin-1 receptor-related protein ST2*) [77, 78, 79]
- interleukina 6 (IL-6) [80, 81, 82],
- interleukina 18 (IL-18) [81, 83],
- metaloproteinaza macierzy 9 (MMP-9) [81],
- rozpuszczalny ligand CD 40 (sCD40L) [81, 84, 85],
- fibrynogen [86],
- pentraksyna 3 (PTX-3) [87],
- czynnik martwicy nowotworu alfa (*Tumor necrosis factor-alpha - TNF-α*) [81, 88, 89],
- czynnik wzrostu łożyska (*PlGF – placental growth factor*) [90, 91],
- anhidraza węglowa III (*Carbonic anhydrase CA III*) [92],
- białka sirtuinowe (SIRT) [93],
- białko S100 (białko wiążące wapń) [94],
- białko wiążące miozynę C (cMyC) [95].

Każdy z wymienionych biomarkerów pozwala monitorować nie tylko stopień ostrego niedokrwienia mięśnia serca, ale także pozwala śledzić stopień zaawansowania choroby niedokrwiennej serca na każdym z jej etapów rozwoju. Ponadto, markery te oznaczane kompleksowo w panelach diagnostycznych pozwalają wyodrębnić grupy chorych zwiększonego ryzyka o niekorzystnym rokowaniu, wymagających dalszego

ściśłego monitorowania po zakończeniu leczenia szpitalnego. Z uwagi na specyfikę operacji kardiochirurgicznej większość z nich nie spełniła pokładanych nadziei w okresie pooperacyjnym.

1.5 OKOŁOOPERACYJNY ZAWAŁ SERCA – ROLA BIOMARKERÓW URAZU NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNEGO

Uniwersalna czwarta definicja zawału mięśnia sercowego z 2018 roku doprecyzowała kryteria zawału mięśnia sercowego po operacjach kardiochirurgicznych (typ 5) jako: wzrost stężenia troponiny sercowej we krwi do wartości przekraczającej 10-krotność URL na poziomie 99 centyla u pacjentów z prawidłowym stężeniem przed zabiegiem. U chorych ze zwiększonym stężeniem troponiny sercowej przed zabiegiem, które jest stabilne (zmienność $\leq 20\%$) lub wykazuje tendencję spadkową, wzrost stężenia troponiny sercowej po zabiegu musi wynosić $> 20\%$, ale wciąż konieczne jest osiągnięcie bezwzględnej wartości przekraczającej 10-krotność URL na poziomie 99. centyla. Ponadto wymagane jest spełnienie jednego z następujących kryteriów: nowe patologiczne załamki Q w elektrokardiogramie, nowe zamknięcie pomostu lub natywnej tętnicy wieńcowej udokumentowane w koronarografii; nowy ubytek żywotnego mięśnia sercowego lub nowe regionalne zaburzenia czynności skurczowej, których umiejscowienie odpowiada etiologii niedokrwiennej uwidocznione w badaniach obrazowych. Izolowane pojawienie się nowych patologicznych załamek Q spełnia kryteria zawału mięśnia sercowego typu 5, jeżeli stężenie troponiny sercowej jest podwyższone, wzrasta, ale nie osiąga 10-krotności URL na poziomie 99 centyla. Podwyższenie stężenia troponiny sercowej w osoczu jest wymagane, ale przy braku tych innych cech klinicznych jest niewystarczające do postawienia rozpoznania zawału mięśnia sercowego typu 5 [96].

1.5.1 IZOENZYM MB KINAZY FOSFOKREATYNOWEJ (CK-MB)

Kinaza fosfokreatynowa należy do enzymów występujących w cytoplazmie komórkowej. Jest ona odpowiedzialna za katalizowanie odwracalnej reakcji fosforylacji kreatyny przez transfer wysokoenergetycznych wiązań między ATP a kreatyną. W wyniku tej reakcji powstaje fosfokreatyna, jako magazyn energii dla komórek mięśniowych wykorzystywanej w transporcie komórkowych oraz procesach skurczu i

relaksacji [97]. Cząsteczka izoenzymu zbudowana jest z dwóch izoform CK-M i CK-B. W diagnostyce uszkodzenia mięśnia serca wykorzystuje się dwa sposoby oznaczeń zmian profilu CK-MB: pomiar aktywności (CK-MB_{akt.}) lub pomiar całkowitego stężenia (CK-MB_{mass}) – jako bardziej czuły wskaźnik (wzrost stężenia wyprzedza o 1 godzinę wzrost aktywności). Okno diagnostyczne dla CK-MB_{mass} to 3,5 godziny (4,5 godziny dla CK-MB_{akt.}), szczyt stężenia/aktywności występuje po 12 – 16 godzinach, powrót do wartości wyjściowych w ciągu 48 – 96 godzin. Problemem stosowania CK-MB, jako biomarkera uszkodzenia miokardium jest to, że nie tylko występuje w komórkach mięśnia serca, ale także w mięśniach szkieletowych, co może być przyczyną fałszywie dodatnich lub ujemnych wyników. W związku z tym arbitralnie wprowadzono kryteria ułatwiające diagnostykę zawału w postaci wartości aktywności CK-MB powyżej 6% całkowitej aktywności CPK (CK) lub obecnie zalecanego oznaczania wartości stężenia powyżej URL na poziomie 99. centyla. W przypadku zawału okołoperacyjnego jednoznaczne kryteria były znacznie trudniejsze do wprowadzenia. Wartości referencyjne zależały od producentów urządzeń testujących i doświadczeń ośrodków kardiologicznych [98]. Obecnie według czwartej definicji zawału serca CK-MB, jako marker stracił na znaczeniu, zastąpiły go testy troponin o wysokiej czułości. Dopuszcza się nadal oznaczanie jej kinetyki w przypadku braku możliwości oznaczania troponin. Należy przy tym pamiętać o posługiwaniu się normami swoistymi dla płci [96].

1.5.2 TROPONINY

Troponiny są białkami strukturalnymi miocytów. Wchodzą one w skład aparatu kurczliwego mięśni poprzecznie prążkowanych, które odpowiadają za kontrolę siły skurczu i szybkość mięśnia sercowego. Kompleks troponin tworzący wraz z tropomiozyną i aktywną strukturę filamentu cienkiego mięśni składa się z trzech białek pełniących ściśle określone funkcje: zasadowe białko troponina T wiąże się z tropomiozyną, kolejne zasadowe białko troponina I wiąże aktynę i hamuje jej kontakt z miozyną, zaś kwaśna troponina C jest odpowiedzialna za wiązanie jonów wapnia w miejscach aktywnych. [99]. Ekspresja występującej w sercu izoformy troponiny C jest także charakterystyczna dla mięśni szkieletowych, co eliminuje ją jako marker uszkodzenia mięśnia serca. Specyficzne dla komórek serca izoformy troponiny I i T różnią się od dwóch pozostałych izoform występujących w mięśniach szkieletowych długością i sekwencją aminokwasów wchodzących w skład N końca tych białek.

Sekwencje te tworzą swoisty kod umożliwiający wykorzystanie specyficznych przeciwciał w testach immunodiagnostycznych do oceny stopnia ich ekspresji [100]. W wyniku zadziałania czynnika uszkadzającego mięsień sercowy obserwowana jest specyficzna kinetyka uwalniana troponin:

- Troponina T cTnT wzrost 3 – 6 h szczyt 10 – 24 h, spadek 10 – 15 dni,
- Troponina I cTnI wzrost 3 – 6 h szczyt 14 – 20 h, spadek 5 – 7 dni.

Obecnie, zgodnie z czwartą definicją zawału, sercowe izoformy troponin uznane są za złoty standard diagnostyki zawału serca (ich występowanie jest zawężone głównie do komórek mięśnia sercowego). Dodatkowo, od kilku lat wprowadzono do praktyki klinicznej i laboratoryjnej testy troponinowe o wysokiej czułości. Umożliwia to wykrycie nawet niewielkiego uszkodzenia miokardium, ale również wychwycenie fizjologicznych wahań związanych z cyklem komórkowym. Z drugiej jednak strony ich stężenia, jako zmienna ciągła, wymagają bardzo ostrożnej interpretacji z uwzględnieniem obrazu klinicznego pacjenta.

Przyczynami wzrostu stężenia troponin sercowych, przy braku niedokrwienia mięśnia sercowego, mogą być: niewydolność serca, nadciśnienie, hipotensja, arytmia, zapalenie osierdzia i mięśnia sercowego, zatorowość płucna, przeszczep serca, kardiomiopatia przerostowa, rozwarstwienie aorty, wada zastawki aortalnej, sepsa, udar mózgu, SAH, gestoza, skrajna niewydolność nerek, stan krytyczny pacjenta, choroba Pompego, niedoczynność tarczycy, hemoglobinopatie z potransfuzyjną hemosyderozą, mechaniczny uraz mięśnia sercowego (stłuczenie, masaż serca, kardiowersja/defibrylacja, ablacja, cewnikowanie), duże zabiegi operacyjne, w tym w szczególności operacje kardiochirurgiczne.

Należy również uwzględnić wpływ krążenia pozaustrojowego, w którym wykonywane są procedury kardiochirurgiczne i towarzyszący temu zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej i odczyn zapalny mięśnia sercowego [101, 102]. Stężenia cytokin prozapalnych, takich jak: czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α), hs-CRP, mieloperoksydaza, IL-6 i IL-8 są proporcjonalne do intensywności uszkodzenia mięśnia sercowego i następującej po tym apoptozy [103, 104].

Podwyższone stężenia troponin sercowych stwierdzano u 100% pacjentów poddawanych CABG. Jednak badania wykonywane z zastosowaniem rezonansu

magnetycznego serca (CMR) wykazały, że obszary martwicy mięśnia sercowego widoczne są tylko u 28% pacjentów tej grupy. Wyniki tych badań mogą sugerować, że uwalnianie troponin może odzwierciedlać odwracalne uszkodzenie wynikające z innych procesów, takich jak aktywacja reakcji zapalnej lub uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne, a nie tylko zawał [105, 106, 107].

Dodatkowo dyskutowany jest problem określenia wiarygodnego odstępu czasowego od zabiegu operacyjnego, w którym należy oznaczać stężenie troponiny w diagnostyce zawału okołoperacyjnego. Wzrost stężenia troponiny jest zauważalny bowiem w krwi po 2–4 godzinach od uszkodzenia mięśnia sercowego [108], co może opóźnić rozpoznanie zawału związanego z zabiegiem operacyjnym. Z drugiej strony, szczyt stężeń troponin w zawałe mięśnia sercowego w wyniku CABG występuje z reguły po 72 godzinach, co wskazuje, że należy rozważyć ich monitorowanie powyżej 48 godzin po operacji [109]. Utrzymujące się wysokie stężenia troponiny I w 6 godzinie po operacji CABG może być związane z manipulacjami chirurgicznymi i nieswoistym uszkodzeniem mięśnia sercowego; ciągły jednak ich wzrost w pierwszych 24 godzinach wymaga szczególnej uwagi jako wskaźnik możliwego pooperacyjnego zawału mięśnia serca [110]. Opisane trudności w interpretacji uzyskiwanych wyników i ocenie kinetyki biomarkerów w okresie okołoperacyjnym, powodują, że również oznaczanie stężeń troponin nie spełnia w pełni oczekiwań. W związku z tym ciągle trwają poszukiwania nowych wiarygodnych i czułych biomarkerów. Identyfikacja istotnych klinicznie powikłań w postaci okołoperacyjnego uszkodzenia mięśnia sercowego i zawału może być trudna, ale jest bardzo istotna, ponieważ pozwala na ocenę ryzyka krótko-, średnio- i długoterminowej śmiertelności [111, 112, 113].

1.6 MIKRORNA (MIRNA)

Przełomem w badaniach nad miRNA i ich wpływem na regulację ekspresji genów okazało się odkrycie w 1993 roku genu lin 4 w nicieniu *Caenorhabditis elegans* kodującego pierwsze poznane miRNA [114]. miRNA są produktem genów jądrowych rozsianych po całym genomie człowieka. Odsetkowo jest ich zaledwie, około 5 %, ale szacuje się, że w organizmie człowieka aż około 50 – 60 % genów jest regulowanych właśnie za pośrednictwem miRNA [115]. Jako małe niekodujące cząsteczki RNA odgrywają one bardzo ważną rolę w ekspresji genów przez wpływ na proces translacji białek. Działanie ich polega na połączeniu się ze specyficznymi regionami w miRNA, co

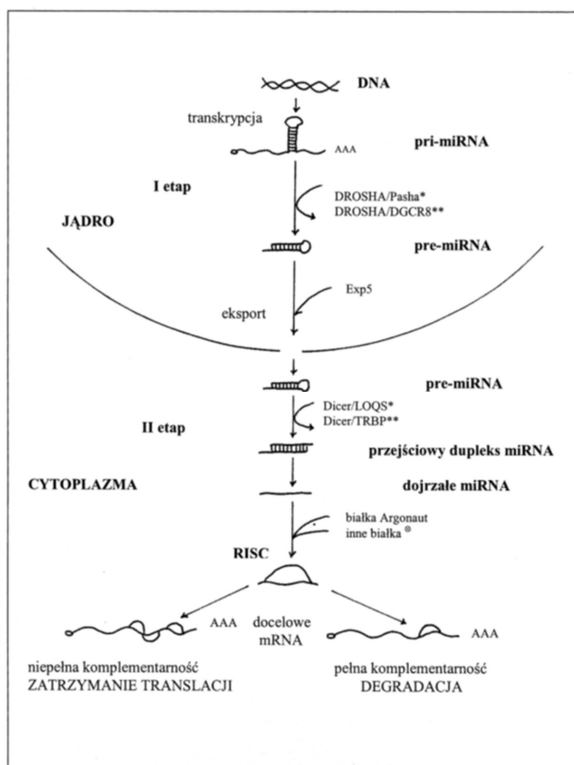
powoduje zahamowanie procesu translacji, a nawet degradację łańcucha RNA odpowiedzialnego za syntezę białek, ale też w pewnych sytuacjach są one odpowiedzialne za wzmocnienie jego ekspresji. Biorą udział w procesach proliferacji, rozmnażania, angiogenezy i apoptozy w organizmach żywych. Liczne doniesienia potwierdzają także ich rolę w fizjologii i patofizjologii mięśnia sercowego. Ich wczesne uwalnianie przez komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i związana z tym możliwość oznaczania w różnych płynach ustrojowych (między innymi we krwi, moczu i bioptatach tkankowych), a także stabilność w próbkach przechowywanych również w temperaturze pokojowej – otwiera nowe możliwości diagnostyczne w monitorowaniu uszkodzenia serca we wczesnym okresie pooperacyjnym [116].

1.6.1 BIOLOGIA MIKRORNA (miRNA)

MiRNA to grupa jednoniciowych, niekodujących RNA składających się z 20 – 22 nukleotydów, które biorą udział w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Istnieją dwa sposoby syntezy miRNA, każdy składający się z kilku etapów. Pierwszym jest powstanie transkryptu pri-miRNA przepisywanego z genomu (odpowiednich regionów dwuniciowego DNA) przez enzym polimerazę RNA II lub III. Ten pierwotny transkrypt składa się z kilku tysięcy par zasad [117, 118]. W kolejnym etapie dzięki białkowemu kompleksowi składającemu się z jądrowej rybonukleazy III zwanej enzymem Drosha oraz kofaktora DGCR8 dochodzi do hydrolizy pierwotnego transkryptu (pri-miRNA), w wyniku której powstaje pre-miRNA. Obydwa procesy zachodzą w jądrze komórkowym. Druga ścieżka powstawania miRNA polega na syntezie mirtronów, fragmentów pochodzących z intronów. Nie bierze w nim udziału jądrowa rybonukleaza Drosha. Mirtrony mają długość miRNA odpowiadającą pre-miRNA, ale niedoskonałą strukturę, która wymaga rozplecenia i ponownego zwinięcia w strukturę spinki do włosów, aby mogły dalej wejść w konwencjonalną ścieżkę dalszej syntezy. Pre-miRNA mają długość 60 – 80 nukleotydów mających w sobie strukturę szpilek do włosów. Następnie pre-miRNA są transportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy za pomocą kompleksu białka Ran-GTP i eksportyny-5, gdzie dochodzi do generowania dojrzałych cząsteczek miRNA przy pomocy kolejnego enzymu endonukleazy Dicer. Dojrzałe miRNA po rozpleceniu przez enzym Dicer tworzą z białkami kompleks RISC (Induced Silencing Complex), który poprzez specyficzne

wiązanie do komplementarnego regionu docelowej cząsteczki RNA wpływa na translację mRNA [119].

Rycina 2. Powstawanie i mechanizmy działania miRNA



Zmodyfikowany za [120].

Decydujący wpływ na to czy, i które miRNA zostanie zdegradowane ma dojrzała cząsteczka miRNA w RISC. Przyłącza się ona na zasadzie komplementarności do regionu 3'UTR informacyjnego RNA. Sekwencja miRNA może być niemal całkowicie lub tylko częściowo zgodna z odcinkami 3'UTR informacyjnego RNA. Ma to olbrzymie znaczenie przy wyborze mechanizmu regulacyjnego. Całkowita komplementarność jest odpowiedzialna za degradację informacyjnego RNA, natomiast częściowa powoduje tylko hamowanie procesu translacji. Końcowym efektem działania jest hamowanie syntezy białka [119, 120, 121]. W pewnych przypadkach istnieje możliwość

wzmocnienia przez miRNA ekspresji genu przez przyłączenie się do końca 5', jak np. wzmocnienie translacji wirusa HCV przez miRNA-122 opisywane przez Robertsa i wsp. [122, 123]. Jeden typ miRNA ma zdolność ekspresji wielu genów [124]. Jednocześnie jeden informacyjny RNA może być regulowany przez wiele typów miRNA, w zależności od liczby komplementarnych miejsc we fragmencie 3'UTR [119, 125].

Profil uwalniania miRNA świadczy, że nie tylko są uwalniane biernie z uszkodzonych lub nekrotycznych komórek, lecz także biorą w tym udział procesy czynne będące pod kontrolą komórkowych dróg sygnałowych. Wydzielane poza komórkę miRNA zachowują dużą stabilność mimo aktywności osoczowych RNaz. Decydują o tym mechanizmy ochronne, takie jak wydzielanie w postaci pęcherzyków, egzosomów, ciałek apoptycznych oraz tworzenie kompleksów z białkami (nukleofosfina 1, białko AGO2). Białka te pełnią funkcję transportową między jądrem komórkowym a cytoplazmą, ale są także obecne w przestrzeni pozakomórkowej [126, 127]. Alternatywną drogą transportu jest możliwość wchodzenia w skład kompleksów z frakcją HDL lipoprotein [128]. Przeprowadzone wcześniej obserwacje potwierdziły możliwość oznaczania różnych izoform miRNA w płynach ustrojowych, w tym we krwi oraz biopłatach tkankowych [116, 129, 130]. Znaczna część miRNA jest swoista tkankowo i komórkowo [129, 130].

W ostatnich latach postęp genetyki i poznanie molekularnych podstaw rozwoju chorób układu krążenia otworzył nowe możliwości diagnostyczne oznaczania ekspresji swoistych dla mięśnia sercowego miRNA w zależności od kondycji mięśnia sercowego [129, 130, 131, 132]. Z uwagi na rolę jaką odgrywają w procesach protekcji i remodelingu mięśnia sercowego, angiogenezy, włóknienia przedsionków, urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego, sepsy, ostrej niewydolności narządowej, patofizjologii bólu, dużym zainteresowaniem w kardiologii cieszą się miRNA: miRNA-1, miRNA-21, miRNA-29, miRNA-133a, miRNA-145, miRNA-208a i b, miRNA-223, miRNA-483-5p, miRNA-126, miRNA-499, jako potencjalne predyktory ryzyka oraz biomarkery powikłań po zabiegach na otwartym sercu, a w szczególności zawału okołoperacyjnego lub migotania przedsionków. Spośród tej grupy miRNA interesującymi ze względu na największą swoistość dla mięśnia sercowego i zróżnicowaną rolę jaką pełnią w odpowiedzi na uraz operacyjny i związane z nim procesy niedotlenienia, urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego, uogólnionej odpowiedzi zapalnej wydają się być

miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1, miRNA-21. Opisywany w doniesieniach naukowych profil uwalniania, swoistość i czułość pozwalają także na poddanie ich próbie wykorzystania jako biomarkerów monitorowania skuteczności zapobiegania skutkom urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego poprzez farmakologiczne hartowanie mięśnia sercowego za pomocą środków anestetycznych wykorzystywanych w trakcie znieczuleń do zabiegów kardiologicznych [129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138].

1.6.2 MiRNA-499

MiRNA-499 występuje głównie kardiomiocytach, ale także w niewielkim stopniu w mięśniach szkieletowych. Wraz z miRNA-208a i miRN-208b należy do grupy tzw. myomiRS kodowanych w intronach: Myh 6 (ciężki łańcuch alfa - miozyny), Myh 7 (ciężki łańcuch beta-miozyny) oraz Myh 7b. Grupa „myomiRS” odpowiada za ekspresję łańcuchów ciężkich miozyny w sercu. Ten typ regulacji odpowiedzialny jest za przebudowę serca, czynność skurczowo-rozkurczową mięśnia serca. Ponadto miRNA-499, mając wpływ na ekspresję białek biorących udział w różnych szlakach sygnałowych, odgrywa bardzo ważną i zróżnicowaną rolę w rozwoju i patofizjologii układu sercowo-naczyniowego. Jego wzmożona ekspresja indukuje różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku do kardiomiocytów przez szlak sygnałowy Wnt/B-*katenina*. Z kolei, wpływając na szlak sygnałowy, *kalcyneuryna/Wnt* stymuluje rozwój angiogenezy, pobudza ekspresję izoformy podjednostki katalitycznej *kalcyneuryny alfa*, a ta z kolei działa na czynnik jądrowy aktywowanych komórek T (NFAT). Czynnik ten (NFAT) reguluje aktywację czynnika indukowanego niedotlenieniem 1- α (HIF 1 α), co pobudza wydzielanie czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VFGF). MiRNA-499 zapobiega apoptozie przez szlak *kalcyneuryny* i białka związanego z dynaminą 1 (Drp 1), które biorą udział w procesie rozszczepienia mitochondrialnego.

Zgodnie z doniesieniami naukowymi wzrost ekspresji miRNA-499 zmniejsza apoptozę kardiomiocytów i rozmiar zawału, podczas gdy blokowanie działania miRNA-499 powoduje przeciwne zmiany [139]. Istnieje szereg doniesień wskazujących, że nadekspresja miRNA-499 w sercu może prowadzić do przerostu kardiomiocytów i rozwoju kardiomiopatii. Ten pozornie sprzeczny efekt ekspresji miRNA-499 może zależeć od czasu trwania jego modulacji, na przykład, czy mamy do czynienia z jej fazą ostrą lub przewlekłą [139].

MiRNA-499 odgrywa potencjalną rolę w patofizjologii zaburzeń rytmu serca, w tym migotania przedsionków. Nadekspresja miRNA-499 wpływa hamująco na gen kodujący aktywowany wapnem kanał potasowy 3 o małym przewodnictwie (SK3), powodując przebudowę elektryczną w trakcie migotania przedsionków [140]. Liczne doniesienia naukowe wykazywały przydatność miRNA-499 jako biomarkera w diagnostyce oraz ocenie stopnia zaawansowania choroby wieńcowej [141], wirusowego zapalenia mięśnia serca, czy też niewydolności krążenia [142]. Wykazano również, że miRNA-499 może być bardziej czułym i swoistym markerem w diagnozowaniu zawału okołoperacyjnego niż troponina I [136].

1.6.3 MiRNA-133

MiRNA-133 jest transkrybowany z tych samych loci chromosomów co miRNA-1, kontrolując ekspresję substratów różnych szlaków sygnałowych wpływa na wiele procesów zachodzących w organizmie człowieka. Przez wpływ na substrat DLL1 (delta like protein 1) – mediator komórki w hematopoezie reguluje różnicowanie się komórek macierzystych serca. Korzystając z innego szlaku sygnałowego przez substrat RhoA – białko wymiany GDP/GTP i cdc42 – kinazę transdukcji sygnału hamuje przerost mięśnia serca. Z kolei przez substrat KLF (Krüpper-like factor) kontroluje procesy metaboliczne, a przez substrat CTGF (Connective tissue growth factor) odpowiada za procesy włóknienia. Odgrywa przeciwstawną rolę w stosunku do miRNA-1 w regulacji przeżycia miocytów w odpowiedzi na niedokrwienie. Poprzez hamowanie ekspresji genu kodującego kaspazę 9, głównego efektoru procesu apoptozy hamuje ten proces. W badaniach dotyczących jego przydatności w ocenie urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego miRNA-133 wykazał się większą czułością i swoistością w porównaniu z troponiną I przede wszystkim w diagnozowaniu zawału [143, 144], także okołoperacyjnego [136]. Zmiany jego ekspresji w procesie adoptowania się i remodelingu mięśnia serca w odpowiedzi na niedokrwienie okazały się pomocne w monitorowaniu niewydolności serca po zabiegach operacyjnych [145].

1.6.4 MiRNA-1

MiRNA-1 i miRNA-133 są dwoma ściśle kooperującymi ze sobą czynnikami regulującymi, mającymi znaczenie w różnicowaniu kardiomiocytów, przeprogramowaniu funkcji komórek, przerostie mięśnia serca, rozwoju arytmii. Podobnie jak miRNA-133, miRNA-1 charakteryzuje się dużą ekspresją zarówno w sercu jak i mięśniach

szkieletowych. Rodzina miRNA-1 obejmuje 3 podrodziny, do których zaliczmy miRNA-1-1, miRNA-1-2 i miRNA-206. Dwa z nich miRNA-1-1 i miRNA-1-2 mają identyczną budowę, natomiast miRNA-206 różni się od nich w strukturze 4 nukleotydami. MiRNA-206 ulega ekspresji tylko w mięśniach szkieletowych, zaś miRNA-1 w obu postaciach 1-1 i 1-2 występuje zarówno w mięśniach szkieletowych jak i w mięśniu serca [146].

W początkowych etapach rozwoju serca miRNA-1 działa synergistycznie z miRNA-133. Wspólnie odpowiadają za powstawanie mezodermy w embrionalnych komórkach macierzystych [147]. W kolejnych etapach rozwoju serca ich role zmieniają się na przeciwstawne. MiRNA-1 indukuje różnicowanie kardiomiocytów, zaś miRNA-133 hamuje je [148]. MiRNA-1 reguluje ekspresję czynników transkrypcyjnych *Irx5* i *Hand 2* [149]. Białko *Hand 2* bierze udział w rozwoju dróg odpływowych oraz prawej komory. Białko *Irx5* (iroquois-class homeodomain protein) reguluje ekspresję genów kanału potasowego. W odpowiedzi na niedokrwienne uszkodzenie serca, np. w przebiegu zawału mięśnia serca, poprzez szlak sygnałowy β -adrenoreceptora (β AR)/cyklicznego adenylozynomonofosforanu (cAMP)/kinazy białkowej A (PKA), miRNA-1 (głównie w postaci egzosomów) jak i miRNA-133 (zarówno w postaci egzosomów jak i wolnej) są uwalniane do krwiobiegu i pośredniczą w mobilizacji komórek progenitorowych (swoiste tkankowo komórki macierzyste) ze szpiku kostnego do krążenia obwodowego. Komórki te biorą udział w procesach naprawczych przywracających sprawność uszkodzonego mięśnia serca [150, 151, 152]. Wykazano, że dostarczenie miRNA-1, a także miRNA-133, miRNA-499 do strefy granicznej zawału, np. za pośrednictwem lentiwirusa, pobudza przeprogramowanie fibroblastów do kardiomiocytów *in situ*. Te stworzone w wyniku przeprogramowania kardiomiocyty wykazują budowę sarkomerową oraz właściwości elektrofizjologiczne odpowiadające dojrzałym miocytom serca [153, 154, 155]. Wzrost ekspresji miRNA-1 za pośrednictwem szlaków kalcyneuryny/czynnik jądrowy aktywowanych szlaków komórek T (NFAT) oraz zależnej od białka kalmoduliny wiążącej wapń wpływa hamująco na czynnik wzmacniający miocyty 2a (MEF 2a) i białko GATA4 zapobiegając wzrostowi kardiomiocytów. Przy spadku ekspresji miRNA-1 dochodzi do wzrostu poziomów białka cytoszkieletu *twinstin 1*, które z kolei jest odpowiedzialne za przerost mięśnia serca [156]. Niedokrwienne stres oksydacyjny wpływając na miRNA-1 stymuluje jego wpływ na proliferację kardiomiocytów poprzez czynnik transkrypcyjny *Hand 2*, ale jednocześnie uwidacznia jego działanie proapoptyczne przez hamowanie ekspresji genu białek szoku cieplnego HSP 60 i HSP 70

oraz potranskrypcyjnej supresji białek przeciwdziałających apoptozie Bcl-2 (protoonkogen kodujący białko regulujące proces apoptozy – B-cell lymphoma 2) i IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu – insulin-like growth factor) [157].

Nadekspresja miRNA-1 sprzyja wzrostowi częstości arytmii serca. Poprzez represję genu KCNJ2 (potassium channel, Inwardly Rectifying Subfamily J Member 2) kodującego główną podjednostkę kanału potasowego (Kir 2.1.) oraz genu GJA1 (gap junction alpha-1 protein) kodującego białko koneksynę 43 wchodzącego w skład złącza szczelinowego odpowiedzialnego za przewodnictwo między komórkami wpływa na spoczynkowy potencjał błonowy zakłócając przepływ prądu potasowego podczas repolaryzacji [158]. Wykazano na zwierzęcych modelach niedokrwienych serca, że wzrost ekspresji miRNA-1 i 133, wydłużając czas depolaryzacji i repolaryzacji, stwarza większe ryzyko komorowych zaburzeń rytmu serca [159]. Wzrost ekspresji miRNA-1 może także zwiększać pobudliwość skurczową mięśnia serca prowadząc do nadkomorowych zaburzeń rytmu serca, w tym migotania przedsionków. Główną rolę w tym wypadku przypisuje się wzrostowi fosforylacji kanałów wapniowych typu L i receptorów rianodyny (RyR2), co uniemożliwia przyłączenie białek fosfatazy PP2A do tych kanałów zaburzając ich funkcjonowanie [160, 161]. Liczne doniesienia naukowe potwierdzają użyteczność miRNA-1 w diagnostyce choroby niedokrwiennej i zawału mięśnia serca [162, 163, 164, 165].

1.6.5 MiRNA-21

MiRNA-21 odpowiedzialny jest za przebudowę mięśnia serca (remodeling strukturalny i elektryczny) w odpowiedzi na uraz niedokrwienno-reperfuzyjny oraz w późniejszych etapach niewydolności serca. Przez szlak sygnałowy kinazy ERK-MAP w fibroblastach wpływa hamująco na czynnik wzrostu blokując proliferację fibroblastów – regulując stopień zwłóknienia i przerostu mięśnia serca [166]. Działa antyapoptycznie hamując ekspresję proapoptycznych białek PTEN, PDCD4 oraz liganda Fas. Głównym aktywatorem syntezy miRNA-21 jest szlak sygnałowy AKT. Negatywnym regulatorem tego szlaku jest białko PTEN, którego poziom wzrasta w warunkach hipoksji wskutek obniżenia poziomu miRNA-21. Ponadto zaobserwowano dodatni związek między stopniem zwłóknienia a poziomem ekspresji miRNA-21 w tkance przedsionkowej. Przeciwnie, w przypadku wzmożonych procesów zwłóknienia, poziomy miRNA-21 w osoczu były zmniejszone w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami. Wykryto odwrotną

zależność między poziomem miRNA-21 w tkance przedsionkowej a poziomem w osoczu. Nadmierna ekspresja miRNA-21 w ludzkiej tkance przedsionkowej jest powiązana z włóknieniem przedsionków (przebudowa strukturalna), ale także wpływa hamująco na ekspresję kanałów wapniowych typu L i może być przyczyną zwolnienia przewodnictwa przez nie, a w konsekwencji wzrostu odkomórkowego prądu potasowego (przebudowa elektryczna). Końcowym efektem tych zmian może być tworzenie się patologicznych pętli krążenia nawrotnego i sprzyjanie występowaniu zaburzeń rytmu serca, w tym nawrotu migotania przedsionków [135, 167, 168].

2 CELE BADANIA

Opisywana w doniesieniach naukowych charakterystyka uwzględniająca profil uwalniania, swoistość i czułość wybranych miRNA uzasadnia próbę wykorzystania ich jako biomarkerów monitorowania skuteczności zapobiegania efektom urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego w operacjach chirurgicznego pomostowania naczyń wieńcowych przeprowadzanych z zastosowaniem dwóch różnych metod znieczulenia. Celem badania była:

1. Ocena kinetyki i profilu okołoperacyjnego wybranych miRNA: miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1, miRNA-21 monitorowanych we krwi obwodowej u pacjentów poddawanych chirurgicznej rewaskularyzacji wieńcowej dwoma metodami znieczulenia, jednego na bazie inhalacyjnego zastosowania sewofluranu przez cały okres zabiegu lub dożylniej podaży propofolu zastosowanego metodą TCI.
2. Ocena profilu wybranych miRNA: miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1, miRNA-21, w śródoperacyjnie pobieranych bioptatach mięśnia prawego przedsionka serca u pacjentów poddawanych rewaskularyzacji wieńcowej wymienionymi metodami znieczulenia.
3. Ocena przydatności wybranych miRNA jako biomarkerów urazu mięśnia sercowego w relacji do standardowo oznaczanych markerów CKMB i troponiny I we wczesnym okresie pooperacyjnym.

3 MATERIAŁ I METODYKA BADANIA

Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w dniu 2.06.2016 (opinia Nr. KB – 280/2016). Zostało ono przeprowadzone zgodnie z wymogami Deklaracji Helsińskiej (2000) Światowego Stowarzyszenia Medyków.

3.1 GRUPA BADANA I KRYTERIA KWALIFIKACJI DO BADANIA

Prospektywne, obserwacyjne, randomizowane badanie kliniczne obejmowało 40 chorych hospitalizowanych w okresie od grudnia 2016 do kwietnia 2019 w Klinice Chirurgii Serca i Klinice Anestezjologii i Intensywnej Terapii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.

3.1.1 KRYTERIA WŁĄCZENIA

Badanie przeprowadzono u chorych poddawanych pierwszorazowym planowym operacjom pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), przeprowadzanych w krążeniu pozaustrojowym, w normotermii, przy użyciu krwistej kardioplegii dowieńcowej.

3.1.2 KRYTERIA WYŁĄCZENIA

Z badania wykluczono pacjentów, którzy nie wyrazili na nie zgody. Kryteriami klinicznymi wykluczenia były: cukrzyca, świeży udar mózgu lub TIA w wywiadzie, zaawansowana wada zastawkowa serca, kardiomiopatia przerostowa, zatorowość płucna, podwyższone stężenia troponin i CKMB w kontrolnych badaniach przed operacją, poważne zaburzenia kurczliwości mięśnia sercowego w przedoperacyjnej ocenie echokardiograficznej (frakcja wyrzutowa poniżej 40%), niewydolność nerek i wątroby, krytyczne zwężenie tętnic dogłowych. Wykluczono także pacjentów reoperowanych lub z obecnością wszczepionych stentów do naczyń wieńcowych.

3.1.3 POSTĘPOWANIE PRZEDOPERACYJNE

W przeddzień planowanej operacji, po przeanalizowaniu historii choroby pacjenta i wyników badań (laboratoryjnych, obrazowych) oraz po potwierdzeniu spełnienia kryteriów włączenia do badania, przeprowadzano z pacjentem rozmowę kwalifikacyjną.

Pacjenci po zapoznaniu się z zasadami i celami badania oraz wyjaśnieniu wszystkich wątpliwości z nim związanych pisemnie wyrażali dobrowolną i świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniu na formularzu wchodzącym w skład protokołu badawczego zatwierdzonego przez Komisję Bioetyki przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Dodatkowo w obecności anestezjologa wypełniana była anestezjologiczna ankieta przedoperacyjna wraz z pisemnym potwierdzeniem zgody na znieczulenie i leczenie w ramach OIT.

Dotychczas stosowane leki nasercowe podawane były do dnia poprzedzającego zabieg operacyjny. W premedykacji, wszyscy pacjenci, niezależnie od badanej grupy, otrzymali doustnie midazolam (Dormicum Roche) w dawce 7,5 mg oraz w domięśniowej iniekcji 0,1 mg/kg siarczanu morfiny (Morphini sulfas Polfa Warszawa) podawane na godzinę przed planowanym znieczuleniem.

3.1.4 POSTĘPOWANIE ANESTEZJOLOGICZNE

Wszystkie znieczulenia przeprowadzono przy pomocy aparatu GE Datex Ohmeda AISIS wyposażonego w parownik do podawania anestetyku wziewnego typu Aladin i systemu monitorowania GE Datex Ohmeda S/5. Głębokość znieczulenia oceniano analizą bispektralną zapisu EEG (BIS) przez czujniki BIS podłączone do modułu wchodzącego w skład systemu monitorowania GE Datex Ohmeda S/5.

Na sali operacyjnej, przed indukcją znieczulenia, u pacjentów stosowano tlenoterapię bierną przez maskę tlenową. Podłączano standardowe monitorowanie, które obejmowało: saturację krwi tętniczej (SpO₂) – pulsoksymetria, zapis EKG z odprowadzeń II i V5 z analizą odcinka ST, monitorowanie BIS. Ponadto zakładano dwa dostępne naczyniowe do żył obwodowych oraz w znieczuleniu miejscowym kaniulę (BD Arterial Cannula 20 G) do tętnicy promieniowej dla bezpośredniego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi.

Jako profilaktykę zakażeń pacjenci otrzymywali dożylnie cefuroksym (Biofuroksym, Polpharma, Polska) w dawce 1,5 g na 30 min. przed indukcją znieczulenia, a następnie drugą dawkę po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.

W profilaktyce wzrostu fibrynolitycznej aktywności plazminy, jako możliwej przyczyny krwawienia pooperacyjnego, pacjentom podawano dożylnie kwas traneksamowy (Exacyl, Polfa Warszawa S.A., Polska) w dawce 1 g. Dawkę leku powtarzano po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.

3.1.5 RANDOMIZACJA I METODY ZNIECZULENIA

Randomizację do grup badanych przeprowadzano w sposób losowy wykorzystując Randomizer badawczy pobrany w dniu 17.10.2016 (Research Randomizer w wersji 40 – oprogramowanie komputerowe) [169]. Pacjenci zostali losowo przydzieleni do jednej z dwóch 20 osobowych grup różniących się zastosowaną metodą znieczulenia:

Grupa 1 – Sewofluran: znieczulenie złożone z użyciem anestetycznego środka wziewnego sewofluranu przez cały okres trwania operacji.

Grupa 2 – Propofol: znieczulenie całkowicie dożylnie z użyciem propofolu metodą TCI przez cały okres trwania operacji.

Grupa 1 – **Sewofluran**: w indukcji znieczulenia stosowano wprowadzenie dożylnie propofolem (Propofol 1 % MCT/LCT, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Niemcy) w dawce 1 mg/kg m.c., Sufentanylem (Sufentanil Chiesi, Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Wiedeń, Austria) w dawce 0,5µg/kg m.c. oraz rokuronium (Rokuronium Kabi, Fresenius Kabi, Warszawa, Polska) w dawce 0,5 mg/kg m.c. Znieczulenie podtrzymywano wlewami dożylnymi sufentanylu (Sufentanil Chiesi, Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Wiedeń, Austria) w dawce 0,001 µg/kg/min. i rokuronium (Rokuronium Kabi, Fresenius Kabi, Warszawa, Polska) w dawce 0,6 mg/kg m.c./h oraz sewofluranem (Sevoflurane Baxter, Polska) podawanym inhalacyjnie z parownika Aladin ze stężeniem w mieszaninie gazów wdychanych 0,5 – 2 vol%, a w trakcie CPB z parownika Dräger Vapor 2000 zainstalowanego na aparacie płuco-serce. Po zakończeniu krążenia pozaustrojowego znieczulenie inhalacyjne wraz z wlewem ciągłym sufentanylu i rokuronium kontynuowano do końca operacji.

Grupa 2 – **Propofol**: w indukcji znieczulenia stosowano wprowadzenie dożylnie propofolem (Propofol 1 % MCT/LCT, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Niemcy) metodą TCI (Target Controlled Infusions) z wykorzystaniem pompy infuzyjnej (B BRAUN Perfusor Space, B. Braun Melsungen AG, Niemcy), z docelowym stężeniem propofolu w surowicy krwi: 1,5 – 4 µg/ml, sufentanylem (Sufentanil Chiesi, Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Wiedeń, Austria) w dawce 0,5µg/ kg m.c. oraz rokuronium (Rokuronium Kabi, Fresenius Kabi, Warszawa, Polska) w dawce 0,5 mg/kg m.c. Znieczulenie podtrzymywano wlewem dożylnym propofolu (Propofol 1 % MCT/LCT, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Niemcy) TCI z docelowym stężeniem surowicy krwi 2 – 4 µg/ml w suplementacji z dożylnymi wlewami sufentanilu (Sufentanil Chiesi, Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Wiedeń, Austria) w dawce 0,001 µg/kg/min. i rokuronium (Rokuronium Kabi, Fresenius Kabi, Warszawa, Polska) w dawce 0,6 mg/kg m.c./h, do końca operacji.

Głębokość znieczulenia oceniano za pomocą indeksu bispektralnego BIS, tak aby jego wartości utrzymywały się w granicach 40 – 50.

3.1.6 DALSZE POSTĘPOWANIE ANESTEZJOLOGICZNE

W obu badanych grupach, po indukcji znieczulenia, pacjentów intubowano przez usta, a następnie podłączano do układu oddechowego półzamkniętego aparatu do znieczulenia. Monitorowanie układu oddechowego obejmowało: wentylację minutową, objętość pojedynczego wdechu i wydechu, przeciek w układzie oddechowym, ciśnienie w drogach oddechowych (szczytowe, średnie, końcowo-wydechowe), wdechowe i końcowo-wydechowe stężenie dwutlenku węgla oraz tlenu, a w przypadku stosowania inhalacyjnego anestetyku jego MAC wdechowy i wydechowy. Pacjentów wentylowano mechanicznie (tryb VCV–objętościowo zmienny, alternatywnie tryb PCV – ciśnieniowo zmienny) mieszaniną tlenu z powietrzem (ze tężeniem tlenu w gazach wdechowych 60 %), przy przepływie gazów 1 litr, tak, aby stężenie CO₂ w powietrzu wydychanym utrzymywało się w granicach 4,7 – 6 kPa (35 – 45 mmHg), a saturacja krwi tętniczej (SpO₂) w zakresie 94 – 99 %.

Prawidłowość ustawień parametrów wentylacji i wymiany gazowej w trakcie krążenia pozaustrojowego potwierdzano przez wykonywanie kontrolnych badań gazometrycznych krwi tętniczej (aparat do gazometrii RAPIDLAB 1265 firmy Siemens).

Po indukcji znieczulenia pacjentom zakładano dwa dostępy naczyniowe przez prawą żyłę szyjną wewnętrzną: cewnik centralny 3-światłowy (Three-Lumen CVC, 7 F, ARROW) oraz służę naczyniową (Exacta™, 8 F, Merit Medical™), przez którą wprowadzano pod kontrolą zapisów krzywych ciśnień z monitora pacjenta cewnik do tętnicy płucnej (Criticath™, 7 F, Merit Medical™). Ciśnienia rejestrowane były za pomocą przetworników (Meritrans DTXPlus, Merit Medical™, Singapur) umieszczonych i wyzerowanych na wysokości prawego przedsionka.

Monitorowanie hemodynamiczne, prowadzone zarówno podczas zabiegu operacyjnego jak w okresie pooperacyjnym, obejmowało 5 punktów czasowych zbieżnych z czasem pobierania krwi na oznaczenia ekspresji miRNA. Monitorowane wskaźniki hemodynamiczne obejmowały: częstość akcji serca (HR), ciśnienie tętnicze (SAP, MAP, DAP), centralne ciśnienie żyłne (CVP), ciśnienia w tętnicy płucnej (PASP, MPAP, PADP), ciśnienie zaklinowania tętnicy płucnej (PCWP), rzut serca mierzony metodą termodylucji oraz saturację krwi żyłnej mieszanej (SevO2). Na podstawie dokonywanych pomiarów wyliczano: wskaźnik sercowy (CI), wskaźnik naczyniowego oporu obwodowego (SVRI), wskaźnik naczyniowego oporu płucnego (PVRI), wskaźnik objętości wyrzutowej (SVI), wskaźnik pracy wyrzutowej lewej komory serca (LVSWI), wskaźnik pracy wyrzutowej prawej komory serca (RVSWI). Na podstawie dokonywanych pomiarów wyliczano: wskaźnik sercowy (CI), wskaźnik naczyniowego oporu obwodowego (SVRI), wskaźnik naczyniowego oporu płucnego (PVRI), wskaźnik objętości wyrzutowej (SVI), wskaźnik pracy wyrzutowej lewej komory serca (LVSWI), wskaźnik pracy wyrzutowej prawej komory serca (RVSWI).

Ciśnienie perfuzyjne w czasie operacji utrzymywano na poziomie MAP 60 – 90 mmHg i korygowano, w oparciu o monitorowane wskaźniki hemodynamiczne, a w razie potrzeby zmianą głębokości znieczulenia oraz płynoterapią lub farmakologicznie:

- przy spadku MAP - podażą dożylną efedryny i/lub fenylefryny, a przy braku skutecznego działania wlewem ciągłym noradrenaliny,
- przy wzroście MAP dożylnym wlewem nitrogliceryny.

W przypadku stwierdzenia zaburzeń kurczliwości mięśnia sercowego po odłączeniu CPB wyrażonego spadkiem CI poniżej 2,4 l/min./m² stosowano wlew milirynonu, a przy braku skuteczności dołączano adrenalinę.

Zaburzenia rytmu serca: tachyarytmie komorowe i nadkomorowe z niestabilnym ciśnieniem tętniczym leczono kardiowersją elektryczną lub farmakologiczną (amiodaron, lignocaina, jony magnezu i potasu). Bradykardię, bloki przewodzenia przedsionkowo-komorowego po zwolnieniu klemy aortalnej i w okresie reperfuzji, a także w razie potrzeby we wczesnym okresie pooperacyjnym korygowano stymulacją w trybie AAI lub DDD za pomocą zewnętrznego stymulatora serca i naszytych śródoperacyjnie elektrod nasierdziowych przedsionkowych i/lub komorowych.

Diurezę godzinową monitorowano za pomocą cewnika Foleya wprowadzonego do pęcherza moczowego po indukcji znieczulenia. Za wystarczającą definiowano objętość moczu równą lub wyższą od 0,5 ml/kg m.c./h. Niewystarczającą diurezę godzinową korygowano płynoterapią, utrzymywaniem odpowiednich ciśnień perfuzji, a w ostateczności bolusami furosemidu.

Temperaturę pacjenta oceniano za pomocą czujnika umiejscowionego w nosogardzieli.

3.1.7 TECHNIKI OPERACYJNE

Zabieg CABG przeprowadzano z dostępu przez sternotomię pośrodkową, w normotermii z zastosowaniem tej samej techniki operacyjnej u wszystkich badanych, z użyciem standardowej protekcji mięśnia sercowego za pomocą kardioplegii krwistej w krążeniu pozaustrojowym. Przed podłączeniem CPB podawano heparynę niefrakcjonowaną (Heparinum, WZF Polfa S.A., Warszawa) w dawce 3 mg/kg dożylnie pod kontrolą skuteczności działania pomiarem ACT (aktywowany czas krzepnięcia), przy pomocy aparatu Hemochron Response (ITC, Edison, New Jersey, USA). Docelowy czas ACT powyżej 480 sekund utrzymywano podczas całego krążenia pozaustrojowego, w razie konieczności powtarzając kolejne dawki heparyny. Działanie heparyny po zakończonym krążeniu pozaustrojowym odwracano siarczanem protaminy (Siarczan Protaminy 1 %, BIOMED®Sp. z o.o., Warszawa) w dawce 1mg na 100 jednostek heparyny. Potwierdzeniem skutecznego działania protaminy była wartość ACT w granicach 120 sekund.

Krążenie pozaustrojowe podłączano z użyciem kaniuli aortalnej (Medtronic) i dwustopniowej kaniuli żyłnej (Medtronic), wprowadzanej przez prawy przedsionek.

Standardowo w aorcie umieszczano kaniulę do podaży kardioplegii i w razie potrzeby wentowania oraz odpowietrzania opuszki aorty.

Krążenie pozaustrojowe prowadzono z zastosowaniem aparatu płuco-serce STÖCKET S 5 z układem do CPB i oksygenatorem Medtronic ANFINITY (przepuszczalnym dla anestetyków wziewnych) oraz pompy rolkowej z pulsacyjnym przepływem krwi 2,2 – 2,4 l/m²/min. Podaż sewofluranu w trakcie krążenia pozaustrojowego u pacjentów z grupy I prowadzono przy użyciu parownika (Dräger Vapor 2000 SEVO sewofluran) dołączonego do układu maszyny płuco-serce.

Podczas krążenia pozaustrojowego ciśnienie perfuzyjne utrzymywano na poziomie około 60 – 90 mmHg i korygowano w razie potrzeby zmianą głębokości znieczulenia, wypełnieniem łożyska naczyniowego, regulacją przepływu w aparacie do krążenia pozaustrojowego (do 20 % wartości wyjściowych), podażą dożylną fenylefryny, a przy braku efektu, wlewem ciągłym noradrenaliny. Wzrosty ciśnienie tętniczego stabilizowano pogłębieniem znieczulenia lub dożylnym wlewem nitrogliceryny.

Wartości hematokrytu Podczas krążenia pozaustrojowego korygowano od wartości poniżej 27%.

Po zaklemowaniu aorty podawano do jej opuszki krwistą kardioplegię, w temperaturze perfuzatu, przy pomocy zestawu EUROSETS procedurę powtarzano po wykonaniu każdego zespolenia, ale nie rzadziej niż co 15-20 minut.

Dystalne zespolenia tętnicze i żyłne wykonywane były na zatrzymanym sercu, zaś zespolenia centralne na aorcie wykonywano po przywróceniu czynności serca z zastosowaniem bocznego zakleszczenia aorty. Po odklemowaniu aorty stosowana była standardowa procedura reperfuzji mięśnia sercowego w trakcie CPB trwająca minimum 30 % czasu trwania zaklemowaniu aorty.

3.1.8 POSTĘPOWANIE POOPERACYJNE

Po zakończonym zabiegu operacyjnym pacjenci przekazywani byli z utrzymanym lub włączonym zależnie od grupy, znieczulenia wlewem propofolu w dawce 0,5 – 1 mg/kg/h do Oddziału Intensywnej Terapii. Sedację oraz wentylację mechaniczną kontynuowano do czasu stabilizacji stanu klinicznego pacjenta i spełnienia kryteriów ekstubacji. Wczesny przebieg pooperacyjny monitorowano zgodnie z obowiązującym

protokołem postępowania na OIT. W okresie pooperacyjnym kontynuowano antybiotykoterapię okołoperacyjną (cefuroksym do 2 doby, alternatywnie i w razie potrzeby zamieniano na piperacylinę z tazobaktamem). W terapii przeciwbólowej stosowano: paracetamol, metamizol, oxycodon. Standardowo wprowadzano profilaktykę krwawienia z przewodu pokarmowego (pantoprazol) oraz profilaktykę przeciwzakrzepową (kwas acetylosalicylowy, heparyny niskocząsteczkowe, a w razie wskazań klopidogrel). Płynoterapię prowadzono w oparciu o wskaźniki hemodynamiczne, pomiary diurezy godzinowej, badania gazometryczne, utratę z drenażu pooperacyjnego.

3.2 METODYKA BADAŃ LABORATORYJNYCH

3.2.1 POBIERANY MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Próbki krwi dla oznaczenia ekspresji miRNA (miRNA-133a-5p, miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p), aktywności CKMB i stężenia troponiny I (hs-TnI) pobierano z cewnika centralnego wprowadzonego do żyły szyjnej wewnętrznej prawej w 5 punktach czasowych:

T0 – po indukcji znieczulenia, ale 30 min. przed rozpoczęciem zabiegu,

T3 – w 3 godzinie reperfuzji po przywróceniu krążenia wieńcowego,

T6 – w 6 godzinie reperfuzji po przywróceniu krążenia wieńcowego,

T12 – w 12 godzinie reperfuzji po przywróceniu krążenia wieńcowego,

T24 – w 24 godzinie reperfuzji po przywróceniu krążenia wieńcowego.

Dodatkowo celem oznaczenia ekspresji miRNA (miRNA-133a-5p, miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p) w tkance mięśniowej pobierano dwukrotnie biopaty 5 x 5 mm z mięśnia prawego przedsionka:

- przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, w trakcie zakładania kaniuli żyłnej do prawego przedsionka,
- po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, w trakcie usuwania kaniuli żyłnej do CPB z prawego przedsionka.

3.2.2 KODOWANIE I ZABEZPIECZANIE PRÓBEK KRWI ORAZ BIOPTATÓW TKANKOWYCH

Próbki krwi o objętości 2,5 ml pobierano do probówki Pax Gene RNA tube ze stabilizatorem RNA, inkubowano je przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie zamrażano i przechowywano w temperaturze -20°C. do czasu ekstrakcji i oznaczenia ekspresji miRNA.

Bioptat tkankowy pobierano bezpośrednio do probówki ze stabilizatorem RNA-Later, następnie po wstępnej inkubacji w temperaturze pokojowej, zamrażano i przechowywano w temperaturze -20°C. do czasu ekstrakcji i oznaczenia ekspresji badanych miRNA.

Po zebraniu całości planowanego materiału, zamrożone i zakodowane próbki krwi i bioptaty tkankowe przesłane zostały do laboratorium Katedry i Zakładu Histopatologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu celem izolacji i selektywnego oznaczenia ekspresji poszczególnych miRNA.

3.2.3 BADANIE EKSPRESJI MIRNA

W laboratorium Katedry i Zakładu Histopatologii i Embriologii UMED we Wrocławiu przesłany materiał biologiczny (krew w probówkach Pax Gene RNA tube ze stabilizatorem RNA oraz bioptaty tkankowe mięśnia prawego przedsionka serca w probówkach ze stabilizatorem RNA-Later) rozmrażano i inkubowano w temperaturze pokojowej według zaleceń producenta. Następnie przeprowadzano proces izolowania miRNA, w przypadku próbek z krwią przy pomocy PAXgene Blood miRNA Kit, firmy Qiagen, a w przypadku bioptatów tkankowych całość materiału wyizolowana została z użyciem kitu RNeasy Micro Kit firmy Qiagen (74004). W obu przypadkach według protokołów producentów. Dalsza obróbka zarówno materiału biologicznego uzyskanego z krwi jak i z bioptatów przedsionków przebiegała tak samo. Ekspresję poszczególnych miRNA analizowano za pomocą metody RT – qPCR). W pierwszej kolejności RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji zestawem High Capacity Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. W kolejnym etapie uzyskane cDNA amplifikowano z użyciem starterów (TaqMan primerów firmy Applied Biosystem), swoistych dla badanych markerów (miRNA TaqMan Probe 133a hsa-miR-133a-5p 464986, miRNA TaqMan Probe 1 hsa-miR-1-3p 002222, miRNA

TaqMan Probe 499 hsa-miR-499-5p 001352, miRNA TaqMan Probe 21 hsa-miR-21-5p 467291). Reakcję powtarzano trzykrotnie w kolejno postępujących po sobie etapach: aktywacji polimerazy w 50 °C przez 2 minuty, inicjującej denaturacji w temp. 94 °C przez 10 minut, 40 cykli denaturacji w 94 °C przez 15 sekund, a następnie przyłączania i wydłużania w temp. 60 °C przez 1 minutę. Ekspresję poszczególnych miRNA mierzono metodą względnie ilościową, porównawczą Ct ($\Delta \Delta Ct$).

3.2.4 BADANIE TROPONINY I I CKMB_{AKT}.

Próbki krwi do oznaczeń biochemicznych dla oznaczeń troponiny I (hs-TnI) i CKMB_{akt} pobierane były w tych samych przedziałach czasowych i analizowane według ustalonych procedur i standardów postępowania anesteziologicznego w opiece okołoperacyjnej chorych poddawanych procedurom chirurgicznej rewaskularyzacji wieńcowej, obowiązujących w Klinice Anestezjologii i Intensywnej Terapii oraz procedur i standardów obowiązujących w laboratorium Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego. Aktywność izoenzymu MB kinazy kreatynowej w pobranych próbkach oznaczano za pomocą analizatora Beckman Coulter enzymatyczną metodą immunoinhibicyjną (wartość referencyjna: 0 – 25 U/l), zaś stężenie troponiny I za pomocą Analizatora Alinity testem immunochemicznym z użyciem mikrocząstek oraz znacznika chemiluminescencyjnego (wartość referencyjna: 0 – 34,2 pg/ml).

4 ANALIZA STATYSTYCZNA

Otrzymane w wyniku przeprowadzonych badań dane zostały zebrane i usystematyzowane przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Excel 2016. Dane jakościowe przedstawiono jako liczebność (N) i odsetki (%). Dla analizowanych zmiennych wyliczono podstawowe statystyki opisowe (średnia arytmetyczna, mediana, odchylenie standardowe i kwartylowe). Do przedstawienia zmiennych o rozkładzie normalnym zastosowano średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Zmienne o rozkładzie odbiegającym od normalnego przedstawiono jako medianę oraz dolny i górny kwartył. W związku z brakiem normalności rozkładu zastosowano testy nieparametryczne. I tak, dla prób powiązanych i niepowiązanych wykorzystano test Wilcoxon. Dla zmiennych niezależnych użyto testu Mann-Whitneya wykorzystując program komputerowy Statistica. Celem normalizacji rozkładów analizowane zmienne poddano transformacji Boxa-Coxa. Uzyskane zmienne transformowane analizowano stosując test ANOVA dla układów z powtarzanymi pomiarami oraz test post hoc – test Bonferroni. Korelacje mierzono testem porządku rang Spearmana. Za istotne statystycznie uznawano wartości na poziomie $p < 0,05$. Dla parametrów jakościowych wyliczono częstość występowania poszczególnych wariantów z wykorzystaniem tabel wieloznacznych (kontyngencji). W ocenie istotności różnic w rozkładach pomiędzy grupami stosowano test χ^2 Pearsona Największej Wiarygodności i test χ^2 z poprawką Yatesa. Do oceny siły zależności zmiennych dychotomicznych od poszczególnych parametrów zastosowano analizę krzywej ROC. Ocenę wartości prognostycznej wykonano za pomocą pola powierzchni pod krzywą ROC (AUROC).

5 WYNIKI

5.1 CHARAKTERYSTYKA BADANEJ GRUPY

Do badania zakwalifikowano 40 pacjentów, których losowo podzielono na 2 grupy po 20 pacjentów w każdej: Grupa 1 – Sewofluran - pacjenci operowani w znieczuleniu ogólnym z zastosowaniem sewofluranu przez cały okres operacji. Grupa 2 – Propofol - pacjenci operowani w znieczuleniu całkowicie dożylnym (TCI) z użyciem propofolu. W związku z utratą wyników badań, jedna osoba z grupy 2 została wyłączona z protokołu badawczego w toku dalszego postępowania.

Przeprowadzona charakterystyka badanych grup (dane demograficzne, wywiad chorobowy, stopień wydolności mięśnia serca, farmakoterapia przedoperacyjna, leki w trakcie zabiegu i w okresie pooperacyjnym) nie wykazała różnic istotnych statystycznie między badanymi grupami.

Tabela 1. Dane demograficzne badanych grup.

Zmienna	Gr.1 (n=20)	Gr. 2 (n=19)	Wartość p
Płeć męska	16 (80 %)	13 (68,42 %)	0,407
Wiek [lata]	63,55 [± 5,58]	63,42 [± 9,67]	0,603
Wzrost [cm]	170,7 [± 9,81]	168,52 [± 7,32]	0,298
Waga [kg]	79,33 [± 16,03]	75,47 [± 14,80]	0,305
BSA [m ²]	1,90 [± 0,23]	1,84 [± 0,20]	0,298

Przedstawiono jako średnia i odchylenie standardowe (±SD), gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol, BSA index – (Body Surface Area) wskaźnik powierzchni ciała pacjenta. Porównanie obu grup – różnice nieistotne statystycznie grup $p > 0,05$

Tabela 2. Wywiad chorobowy – schorzenia towarzyszące.

Schorzenia [n (%)]	Gr. 1 (N = 20)	Gr. 2 (N = 19)	Wartość p
NYHA II	20 (100%)	19 (100%)	1,000
CAD/CCS II	13 (65%)	15 (78,95%)	0,333
CAD/CCS II/III	4 (20%)	3 (15,79%)	0,731
CAD/CCS III	3 (15%)	0 (0,00%)	0,078
CAD/CCS IV	0 (0,00%)	1 (5,26%)	0,299
Zawał mięśnia serca	5 (25%)	3 (15,79%)	0,476
FAP	1 (5%)	0 (0,0%)	0,323
Nadciśnienie tętnicze	17 (85%)	13 (68,42%)	0,219
Udar mózgu	1 (5%)	0 (0,00%)	0,323
Hipercholesterolemia	14 (70%)	12 (63,16%)	0,648
POCHP	1 (5%)	2 (10,53%)	0,517
Nikotynizm	5 (25%)	6 (31,58%)	0,648
Frakcja wyrzutowa lewej komory (%)	61,75 [±4,37]	59,73 [±4,24]	0,126
Regionalne zaburzenia kurczliwości mięśnia serca	3 (15%)	2 (10,53%)	0,677

Przedstawiono jako liczba (N) i udział procentowy (%) w każdej z badanych grup, gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol, NYHA – (New York Heart Association Functional Classification) – skala niewydolności serca zaproponowana przez Nowojorskie Stowarzyszenie Kardiologów, CCS klasyfikacja dławicy piersiowej na podstawie jej nasilenia wg. (Canadian Cardiovascular Society) Kanadyjskiego Stowarzyszenia Kardiologów, FAP – (paroxysmal atrial fibrillation- napadowe migotanie przedsionków; POCHP – przewlekła obturacyjna choroba płuc. Porównanie obu grup – różnice nieistotne statystycznie (p > 0,05).

Dane operacyjne, takie jak: ocena pacjentów w skali ryzyka znieczulenia (ASA), ocena pacjentów w skali ryzyka operacyjnego (EuroScore II), czas trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czas trwania zaklemowania aorty (ACC), ilość wykonywanych zespołów naczyniowych, ilość podanego roztworu kardioplegii, ilość przetoczeń krwi i preparatów krwio pochodnych oraz czas wentylacji zastępczej do momentu ekstubacji,

powikłania pooperacyjne, czas leczenia w ramach oddziału intensywnej terapii, czas hospitalizacji także nie wykazały różnic istotnie statystycznie między grupami.

Tabela 3 Farmakoterapia przedoperacyjna u pacjentów badanych grup

Stosowane leki [N (%)]	Gr.1 (N = 20)	Gr.2 (N = 19)	Wartość p
β - blokery	19 (95%)	17 (89,47%)	0,517
Blokery kanału wapniowego	1 (5%)	3 (15,79%)	0,267
ACE - inhibitory	12 (60%)	8 (42,11%)	0,263
Nitraty	1 (5%)	2 (10,53%)	0,517
Statyny	17 (85%)	17 (89,47%)	0,676
Diuretyki	4 (20%)	6 (31,58%)	0,408
Inhibitory płytek krwi	20 (100%)	19 (100%)	1,00

Przedstawiono jako liczba pacjentów (N) oraz udział procentowy (%) w badanej grupie, gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol, ACE inhibitory – (inhibitors angiotensin-converting enzyme) – inhibitory konwertazy angiotensyny. Porównanie obu grup – różnice nieistotne statystycznie ($p > 0,05$)

W okresie reperfuzji na CPB, jeden pacjent z grupy 1 – Sewofluran i trzech pacjentów z grupy 2 – Propofol wymagało zastosowania defibrylacji elektrycznej z powodu zaburzeń rytmu serca w postaci migotania komór.

Tabela 4 Dane operacyjne badanych grup.

Zmienna	Gr. 1 (N= 20)	Gr. (N = 19)	Wartość p
ASA	3 [±0]	3 [±0]	1,000
EuroScore II	1,11 [±0,54]	1,22 [±0,48]	0,267
Czas CBP [min.]	79,85 [±20,82]	77,68 [±17,73]	0,899
Czas zaklemania aorty [min.]	41,05 [±10,18]	38,36 [±10,16]	0,368
Spontaniczny powrót rytmu zatokowego podczas reperfuzji	18 (90%)	16 (84,21%)	0,588
Liczba zespoleń x 2	12 (60%)	11 (57,89%)	0,489

Liczba zespołń x 3	8 (40%)	7 (36,84%)	0,581
Liczba zespołń x 4	0 (0,00%)	1 (5,26%)	0,298
Czas znieczulenia [min.]	4,19 [±38]	4,24 [±36]	0,613
Czas do ekstubacji [min.]	5,36 [±2:46]	5,57 [±2:33]	0,332
Czas leczenia OIT [dni]	2,90 [±0,85]	2,73 [±1,32]	0,757
Czas hospitalizacji [dni]	9,15 [±2,68]	9,57 [±1,83]	0,109

Przedstawiono jako średnia i odchylenie standardowe (±SD), ASA - skala oceny ryzyka wystąpienia powikłań lub zgonu podczas znieczulenia opracowana przez Amerykańskie Stowarzyszenie Anestezjologów, Euroscore II – (The European System for Operative Risk Evaluation) skala oceny ryzyka operacyjnego chorych poddanych zabiegom kardiochirurgicznym, liczba wykonanych zespołń naczyniowych i odsetek procentowy (%) w grupie, CBP – (Cardiopulmonary Bypass) krążenie pozaustrojowe, gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol. Porównanie obu grup – różnice nieistotne statystycznie ($p > 0,05$).

Wskaźniki hemodynamiczne rejestrowano w badanych punktach czasowych. Profil hemodynamiczny badanych grup był zbliżony w odniesieniu do mierzonych i wyliczalnych wskaźników hemodynamicznych. Jedynie wartości wskaźnika sercowego (CI) i centralnego ciśnienia żylnego (CVP) wykazywały istotną statystycznie różnicę między badanymi grupami w punkcie czasowym T0.

Tabela 5. Inwazyjny profil hemodynamiczny

Parametr	Grupa	T0	T3	T6	T12	T24
HR [1/min]	Gr. 1 N 20	62,25 (±11,91)	83,25 (±10,77)	91,05 (±17,29)	85,25 (±7,94)	85,15 (±16,38)
	Gr. 2 N 19	62,31 (±14,40)	81,05 (±4,92)	83,73 (±10,97)	80,63 (±16,60)	83,21 (±12,39)
MAP [mmHg]	Gr. 1 N 20	84,85 (±17,83)	82,10 (±10,27)	80,75 (±10,28)	81,85 (±10,85)	76,05 (±9,24)
	Gr. 2 N 19	81,52 (±20,14)	83,68 (±12,53)	83,05 (±13,51)	81,94 (±6,06)	81,00 (±8,06)
MPAP [mmHg]	Gr. 1 N 20	17,50 (±6,03)	16,05 (±4,66)	16,50 (±5,49)	16,50 (±4,53)	16,65 (±4,61)
	Gr. 2 N 19	14,84 (±5,05)	17,10 (±5,62)	14,84 (±4,48)	15,57 (±4,32)	16,63 (±4,16)
CVP [mmHg]	Gr. 1 N 20	10,15 (±4,25)	7,65 (±2,83)	7,05 (±2,62)	6,55 (±3,06)	7,70 (±2,65)
	Gr. 2 N 19	7,21* (±3,59)	5,94 (±3,06)	5,89 (±2,88)	9,36 (±15,12)	10,94 (±16,14)
PCWP [mmHg]	Gr. 1 N 20	12,10 (±5,50)	8,05 (±3,25)	7,95 (±4,19)	8,70 (±4,00)	8,70 (±3,40)

	Gr. 2	9,0	9,68	7,21	7,57	8,68
	N 19	(±3,59)	(±4,65)	(±3,53)	(±3,50)	(±2,62)
CI [l/min/m ²]	Gr. 1	2,13	2,32	2,72	2,60	2,66
	N 20	(±0,45)	(±0,50)	(±0,65)	(±0,47)	(±0,42)
	Gr. 2	1,80*	2,17	2,52	2,66	2,81
	N 19	(±0,40)	(±0,61)	(±0,54)	(±0,50)	(±0,61)
SVRI [dyna x s/cm ⁵ /m ²]	Gr. 1	2856,1	2661,9	2235,5	2319,2	2102,8
	N 20	(±613,79)	(±605,02)	(±440,63)	(±487,52)	(±440,70)
	Gr. 2	3442,7	3074,3	2496,46	2344,91	2165,97
	N 19	(±1233,12)	(±950,25)	(±585,71)	(±452,56)	(±415,61)
PVRI [dyna xs/cm ⁵ /m ²]	Gr. 1	205,95	288,3	228,8	274,45	262,80
	N 20	(±98,59)	(±106,79)	(±97,25)	(±212,62)	(±150,39)
	Gr. 2	264,2	277,72	246,77	247,47	227,18
	N 19	(±131,89)	(±187,12)	(±127,82)	(±92,70)	(±74,03)
SVI [ml/skurcz/m ²]	Gr. 1	34,33	29,07	31,52	30,99	32,10
	N 20	(±5,95)	(±7,94)	(±11,11)	(±6,56)	(±6,55)
	Gr. 2	29,67	26,84	30,4	32,24	34,44
	N 19	(±8,94)	(±6,8)	(±6,42)	(±7,32)	(±7,89)
LVSWI [g x m/m ²]	Gr. 1	35,38	28,93	32,23	31,21	30,17
	N 20	(±10,03)	(±8,10)	(±12,72)	(±7,8)	(±7,92)
	Gr. 2	30,16	27,22	31,58	32,93	33,87
	N 19	(±11,91)	(±8,84)	(±9,6)	(±8,55)	(±8,57)
RVSWI [g x m/m ²]	Gr. 1	3,68	3,85	3,95	4,49	4,13
	N 20	(±1,99)	(±1,81)	(±2,54)	(±1,82)	(±1,49)
	Gr. 2	3,67	4,42	3,85	4,53	4,90
	N 19	(±2,31)	(±2,20)	(±1,83)	(±2,46)	(±2,99)

Przedstawiono jako wartość średnią, odchylenie standardowe (±SD), T0 – punkt czasowy 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – punkty czasowe odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej, (N) – liczba badanych pacjentów, gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol. Porównanie grup – (*) różnice istotne statystycznie (p < 0,05).

Wspomagania wazopresyjnego wymagało 17 pacjentów z grupy 1 – Sewofluran i 15 pacjentów z grupy 2 – Propofol. Istotnie statystycznie częściej stosowano fenylefrynę w grupie 1 – Sewofluran (p < 0,05). Częstość stosowania pozostałych leków wazopresyjnych nie różniła się między grupami. Wspomagania farmakologicznego lekami inotropowymi w okresie odłączania od krążenia pozaustrojowego wymagało dwóch pacjentów z grupy 2 – Propofol. Zastosowania nitrogliceryny we wlewie dożylnym podczas znieczulenia do zabiegów wymagało dwóch pacjentów z grupy 1 – Sewofluran.

Tabela 6 Leki wazoaktywne i inotropowe stosowane w trakcie znieczulenia.

Lek	Gr. 1 (N = 20)	Gr. 2 (N = 19)	Wartość p
Leki wazopresyjne	17 (85%)	15 (78,95%)	0,622
Fenylefryna	17 (85%)*	9 (47,37%)	0,013
Noradrenalina	4 (20%)	8 (42,11%)	0,134
Efedryna	15 (75%)	12 (63,16%)	0,423
Leki inotropowe			
Milrynon	0 (0%)	1 (5,26%)	0,299
Adrenalina	0 (0%)	1 (5,26%)	0,298
Leki wazodylatacyjne			
Nitrogliceryna	2 (10 %)	0 (0%)	0,157

Przedstawiono jako liczba przypadków (N) i odsetek procentowy pacjentów (%) w badanej grupie, gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol. Porównanie grup – (*) różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).

W pierwszej dobie pobytu na oddziale pooperacyjnym u trzech pacjentów z każdej z badanych grup wystąpiły zaburzenia rytmu serca o charakterze napadowego migotania przedsionków. W czterech przypadkach leczono je skutecznie kardiowersją farmakologiczną, a w jednym przypadku konieczna była kardiowersja elektryczna.

U dwóch pacjentów z grupy 1 – Sewofluran, w analizowanym badaniem okresie, pojawiły się nowe regionalne zaburzenia kurczliwości mięśnia lewej komory z towarzyszącym wzrostem ekspresji markerów (hs-troponina I) spełniające kryteria definicji zawału typu 5. Z uwagi na zachowaną globalną kurczliwość mięśnia serca, stabilny stan układu krążenia oraz stopień zaawansowania zmian miażdżycowych w naczyniach dystalnych krążenia wieńcowego nie rokujący poprawy przy dalszym postępowaniu inwazyjnym pacjenci ci byli leczeni zachowawczo. W żadnej z grup nie zanotowano zgonu.

5.2 BIOMARKERY BIOCHEMICZNE – DYNAMIKA ICH ZMIAN W CZASIE WE KRWI.

Porównanie badanych grup: gr. 1 – Sewofluran i gr. 2 – Propofol w zakresie ekspresji biomarkerów oznaczanych zarówno standardowo (hsc -troponina I - stężenie, CKMB -aktywność) jak i ekspresji (Ct [$\Delta \Delta Ct$]) badanych miRNA nie wykazało pomiędzy nimi różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) w całym okresie obserwacji. W obu badanych grupach dynamika zmian badanych wskaźników w czasie przebiegała podobnie.

5.2.1 CKMB_{AKT}.

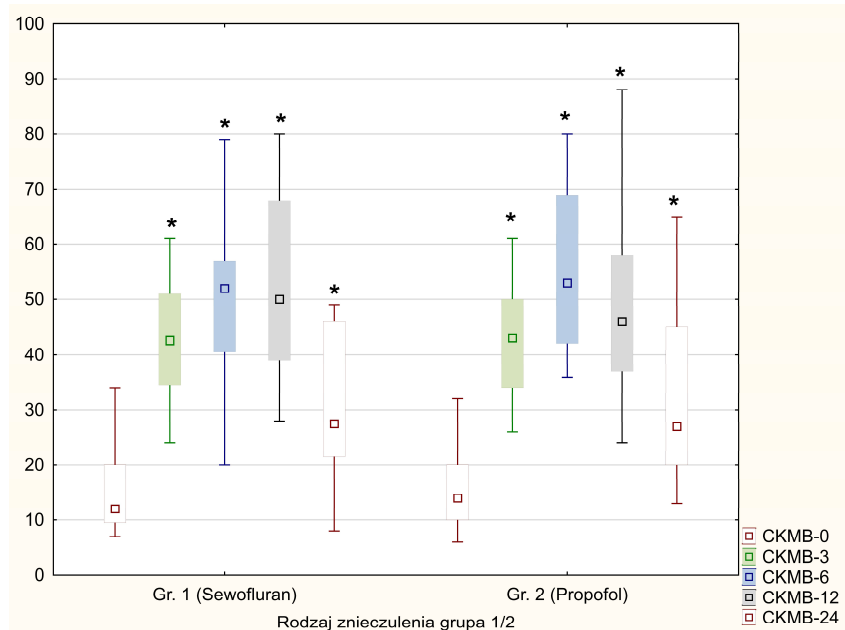
Obserwowano stopniowy, istotny statystycznie ($p < 0,05$) wzrost aktywności w stosunku do wartości wyjściowych (T0) od 3 godziny reperfuzji (T3), ze szczytem w 6 godzinie (T6) i utrzymującym się plateau w 12 godzinie (T12), a następnie spadkiem po 24 godzinach (T24) od początku reperfuzji.

Tabela 7. Dynamika zmian aktywności CKMB w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.

Punkt czasowy		T0	T3	T6	T12	T24
CKMB _{akt.} [U/l]	Gr. 1	12,0 (7,0-34,0) N = 20	42,5* (24,0-61,0) N = 19	52,0* (20,0-107,0) N = 20	50,0* (28,0-212,0) N = 20	27,5* (8,0-176,0) N = 20
	Gr. 2	14,0 (6,0-39,0) N = 19	43,0* (26,0-104,0) N = 19	53,0* (36,0-80,0) N = 19	46,0* (24,0-100,0) N = 19	27,0* (13,0-65,0) N = 19
Porównanie grup	p	0,583	0,798	0,565	0,4912	0,776

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartył – górny kwartył), punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej, gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol, N – liczba analizowanych przypadków. Porównanie grup – brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$). (*) – istotne statystycznie ($p < 0,05$) zmiany w czasie obserwacji w grupach w stosunku do wartości wyjściowych.

Rycina 3 Dynamika zmian aktywności CKMB w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.



Przedstawiono jako mediana (min. – max.), punkty czasowe obserwacji: CKMB – 0 przed zabiegiem, CKMB - 3, CKMB – 6, CKMB – 12, CKMB – 24 – wyniki uzyskane w 3-, 6-, 12-, 24 h od początku reperfuzji, porównanie badanych grup: gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol, (*) – istotne statystycznie ($p < 0,05$) zmiany w czasie obserwacji w grupach w stosunku do wartości wyjściowych

5.2.2 TROPONINA I (HS-Tn I)

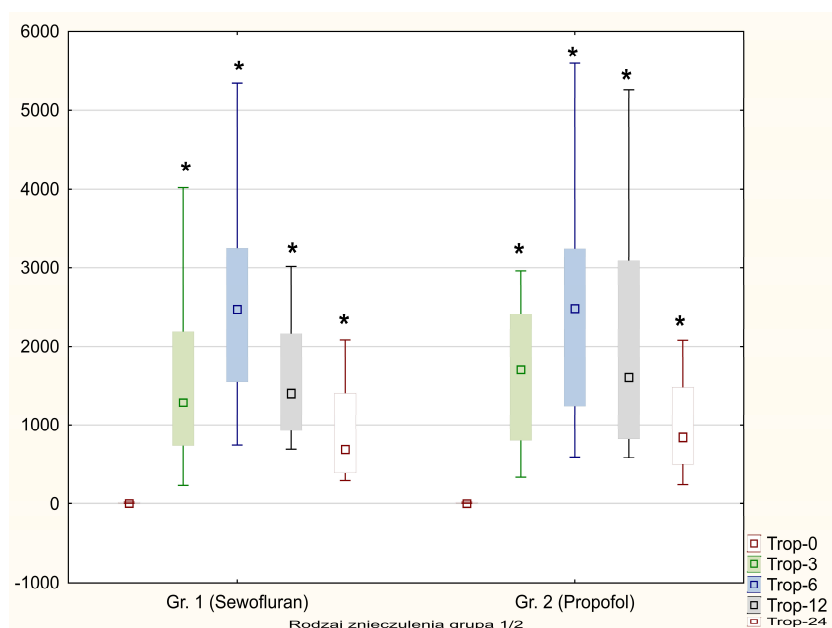
Wzrost stężeń troponiny I w stosunku do wartości wyjściowych (T0) występował już w 3 godzinie (T3) i osiągał szczyt w 6 godzinie (T6), a następnie obserwowano tendencję spadkową w 12 godzinie (T12) i 24 godzinie (T24) od początku reperfuzji. Zmiany stężeń były istotne statystycznie we wszystkich punktach czasowych w obu grupach. Nie zanotowano istotnie statystycznych różnic w stężeniach pomiędzy grupami w badanych punktach czasowych.

Tabela 8. Dynamika zmian stężenia troponiny I (hs-TnI) w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.

Punkt czasowy		T0	T3	T6	T12	T24
Troponina [pg/ml]	Gr. 1	4,5 (1,9-18,70) N 20	1293,45* (242,2-5905,6) N 20	2470,9* (745,1-5353,3) N 20	1404,35* (693,8-20906) N 20	691,6* (299,8-16425) N 20
	Gr. 2	3,4 (1,9-28,07) N 19	1704,8* (342,1-12865,6) N 19	2480,85* (596,2-19713,6) N 18	1607,5* (586,9-16000,7) N 19	846,1* (251,1-7353,1) N 19
Porównanie grup		p	0,683	0,465	0,895	0,944

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartył – górny kwartył), punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej, gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol, N – liczba analizowanych przypadków. Porównanie grup – brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$), (*) – istotne statystycznie ($p < 0,05$) zmiany stężeń w stosunku do wartości wyjściowych w czasie obserwacji w grupach.

Rycina 4 Dynamika zmian stężenia troponiny I (hs-TnI) w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.



Przedstawiono jako mediana (min. – max.) Punkty czasowe: Trop – 0 - 30 min. przed rozpoczęciem zabiegu, Trop – 3, Trop – 6, Trop – 12, Trop – 24 – wyniki uzyskane w 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od początku

reperfuzji, porównanie badanych grup: gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol. (*) – istotne statystycznie ($p < 0,05$) zmiany stężeń, w stosunku do wartości wyjściowych, w czasie obserwacji w grupach.

5.3 MIRNA

Przeanalizowano dynamikę zmian ekspresji we krwi wybranych miRNA w poszczególnych punktach czasowych. Nie zanotowano różnic istotnych statystycznie między badanymi grupami w ekspresji miRNA w poddanych analizie punktach czasowych.

Z uwagi na złożoną metodę utrwalania i przechowywania próbek do analiz ekspresji miRNA część z nich nie nadawała się do oceny i konieczne było zawężenie ilości próbek poddanych badaniu ekspresji miRNA.

Tabela 9. Ilość poddanych analizie próbek w każdej z grup: gr. 1 – Sewofluran ; gr. 2 – Propofol w poszczególnych punktach czasowych (T0, T3, T6, T12, T24). Badanie poziomu ekspresji miRNA we krwi.

Zmienna	Grupa 1 (N 20/ analizowane przypadki)					Grupa 2 (N 19/ analizowane przypadki)				
	T 0	T 3	T 6	T 12	T24	T0	T3	T6	T12	T24
miRNA-499-5p	20	19	20	19	19	17	19	17	19	19
miRNA-133a-5p	19	17	18	19	11	18	15	14	17	13
miRNA-21-5p	13	17	18	18	18	10	16	16	15	24
miRNA-1-3p	19	14	15	16	11	12	18	15	15	13

5.3.1 MiRNA-499-5p

W analizie całej badanej populacji pacjentów, bez podziału na grupy (brak różnic istotnych statystycznie, $p > 0,05$ między grupami), obserwowano niewielką dynamikę zmian ekspresji miRNA-499-5p w czasie obserwacji, z jej wzrostem w relacji do czasu T0 w punkcie czasowym T3, szczytem w T6 i niewielkim spadkiem w T12

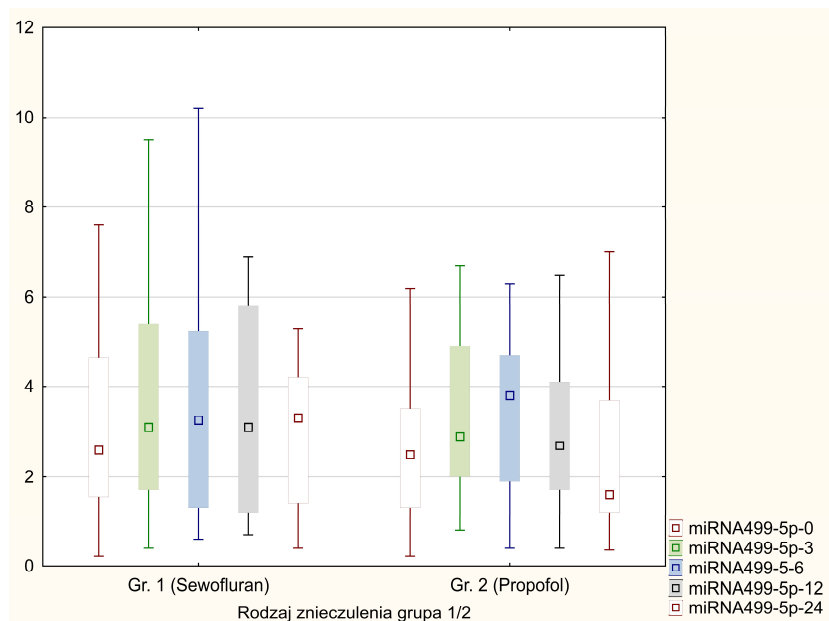
Obserwacje takie odnotowano w obu grupach badanych z trendem wyraźniejszego wzrostu ekspresji w grupie 2 – Propofol. Po 24 godzinach (T24) obserwowano spadek poniżej wartości wyjściowych w grupie 2 – Propofol, w przeciwieństwie do utrzymujących się na tym samym poziomie wartości w grupie 1 – Sewofluran. W każdym z badanych punktów czasowych nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie w poziomie ekspresji miRNA-499-5p ($p > 0,05$).

Tabela 10. Dynamika zmian ekspresji miRNA-499-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.

Punkt czasowy		T0	T3	T6	T12	T24
miRNA-499-5p [Ilość kopii/ μ l]	Gr. 1	2,6 (0,22-7,60) N = 20	3,10 (0,40-9,5) N = 19	3,25 (0,6-10,2) N = 20	3,1 (0,7-6,9) N = 19	3,3 (0,4-5,30) N = 19
	Gr. 2	2,5 (0,22-7,60) N = 17	2,9 (0,8-6,7) N = 19	3,8 (0,4-6,3) N = 17	2,7 (0,4-9,8) N = 19	1,6 (0,36-7,0) N = 19
Porównanie grup	p	0,652	0,705	0,782	0,823	0,233

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartył – górny kwartył), punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, N – liczba analizowanych przypadków. Porównanie grup – brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$). Brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) w ekspresji, w stosunku do wartości wyjściowych, w czasie obserwacji.

Rycina 5. Dynamika zmian ekspresji miRNA-499-5p we krwi, w czasie, porównanie badanych grup.



Przedstawiono jako mediana (min. – max.). Punkty czasowe: miRNA-499-5p – 0 przed zabiegiem, miRNA-499-5p – 3, miRNA-499-5p – 6, miRNA 499-5p – 12, miRNA-499-5p – 24 – wyniki uzyskane w 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od początku reperfuzji, porównanie badanych grup: gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol. Nieistotne statystycznie ($p > 0,05$) zmiany w czasie obserwacji w grupach.

5.3.2 MiRNA-1-3p

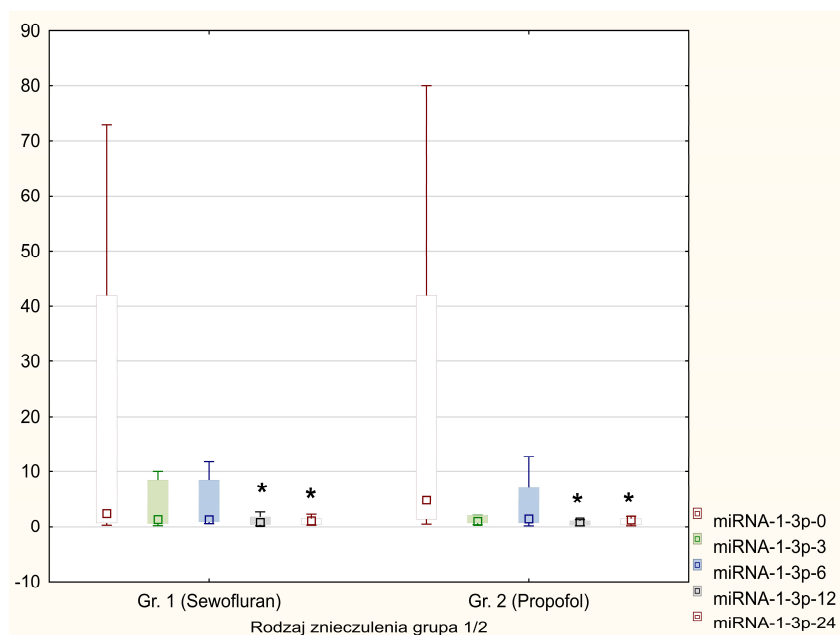
W analizie całej badanej populacji pacjentów, bez podziału na grupy (brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) między grupami) ekspresja miRNA-1-3p obniżyła się w stosunku do wartości wyjściowych (T0) w godzinie (T3) od puszczenia klemy aortalnej, a następnie nieznacznie wzrosła w 6 godzinie (T6), zmiany te jednak nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($p > 0,05$). Dopiero w kolejnych punktach czasowych T12 ($p = 0,004$) i T24 ($p = 0,032$) uległy istotnemu zmniejszeniu w stosunku do wartości wyjściowych (T0). Nie zanotowano różnic istotnie statystycznych w ekspresji miRNA pomiędzy badanymi grupami w odpowiadających sobie punktach czasowych ($p > 0,05$).

Tabela 11. Dynamika zmian ekspresji miRNA-1-3p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.

Punkt czasowy		T0	T3	T6	T12	T24
miRNA-1-3p	Gr. 1	2,4 (0,28-237) N 19	1,325 (0,21-211) N 14	1,3 (0,6-47,8) N 15	0,8* (0,2-15,2) N 16	1,1* (0,3-2,3) N 11
	Gr. 2	4,9 (0,5-80) N 17	1,005 (0,4-132) N 14	1,45 (0,17-12,7) N 16	0,9* (0,19-7,4) N 15	1,25* (0,2-1,9) N 12
Porównanie grup		p	0,779	0,251	0,529	0,812

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartyl – górny kwartyl), punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej, grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, N – liczba analizowanych przypadków. Porównanie grup – brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0.05$). (*) różnica istotna statystycznie w stosunku do wartości wyjściowych w czasie obserwacji w badanych grupach ($p < 0,05$).

Rycina 6 Dynamika zmian ekspresji miRNA-1-3p w czasie we krwi, porównanie badanych grup: gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol.



Przedstawiono jako mediana (min. – max.). Punkty czasowe: miRNA-1-3p – 0 przed zabiegiem, miRNA-1-3p – 3, miRNA-1-3p – 6, miRNA-1-3p – 12, miRNA-1-3p – 24 – wyniki uzyskane w 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od początku reperfuzji, porównanie badanych grup: grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, (*) –

różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w stosunku do wartości wyjściowych w czasie obserwacji w badanych grupach.

5.3.3 MIRNA-133A-5P

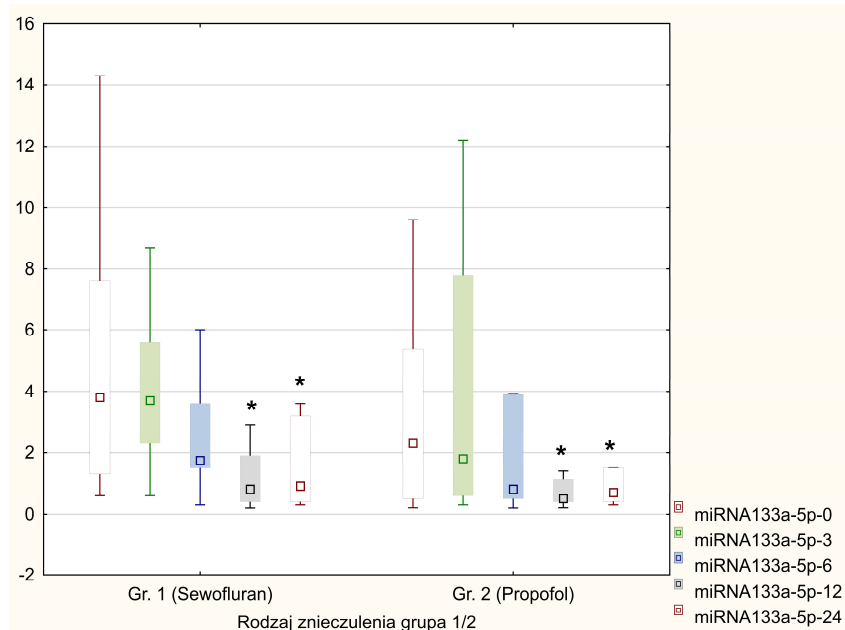
W analizie całej badanej populacji pacjentów, bez podziału na grupy (brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) między grupami), w przedziałach czasowych T0 i T3, miRNA-133a-5p wykazywał podwyższony poziom ekspresji ze spadkiem w T6, ale różnice w tych przedziałach czasowych nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$) w porównaniu z wartościami wyjściowymi T0. Dopiero istotny spadek ekspresji w stosunku do wartości wyjściowych występował w 12 i 24 godzinie reperfuzji (T12 – $p = 0,017$, T24 – $p = 0,005$). Także istotnie statystycznie różnice w ekspresji miRNA-133a-5p występowały pomiędzy pomiarami w punktach czasowych T3 i T12 ($p = 0,002$), T3 i T24 ($p = 0,0006$) oraz T6 i T24 ($p = 0,023$).

Tabela 12 Dynamika zmian ekspresji miRNA-133a-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.

Punkt czasowy		T0	T3	T6	T12	T24
miRNA-133a-5p [ilość kopii/ μ l]	Gr. 1	3,8 (0,6-14,3) N 19	3,7 (0,6-8,7) N 17	1,75 (0,3-15) N 18	0,8* (0,2-8,6) N 19	0,9* (0,3-11,90) N 11
	Gr. 2	2,3 (0,21-9,6) N 18	1,8 (0,3-12,20) N 15	0,8 (0,2-17,00) N 14	0,5* (0,21-15,0) N 17	0,7* (0,3-5,5) N 13
Porównanie grup	p	0,259	0,196	0,452	0,847	0,630

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartył – górny kwartył), punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej, gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol, N – liczba analizowanych przypadków. Porównanie grup – brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$). (*) różnica istotna statystycznie w stosunku do wartości wyjściowych ($p < 0,05$) w czasie obserwacji w grupach.

Rycina 7. Dynamika zmian ekspresji miRNA-133a-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.



Przedstawiono jako mediana (min. – max.) Punkty czasowe: miRNA-133a-5p – 0 przed zabiegiem, miRNA-133a-5p – 3, miRNA-133a-5p – 6, miRNA-133a-5p – 12, miRNA-133a-5p – 24 – wyniki uzyskane w 3-, 6-, 12-, 24 h od początku reperfuzji, porównanie badanych grup: gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol. (*) różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w porównaniu do wartości wyjściowych w czasie obserwacji w grupach.

5.3.4 MiRNA-21-5p

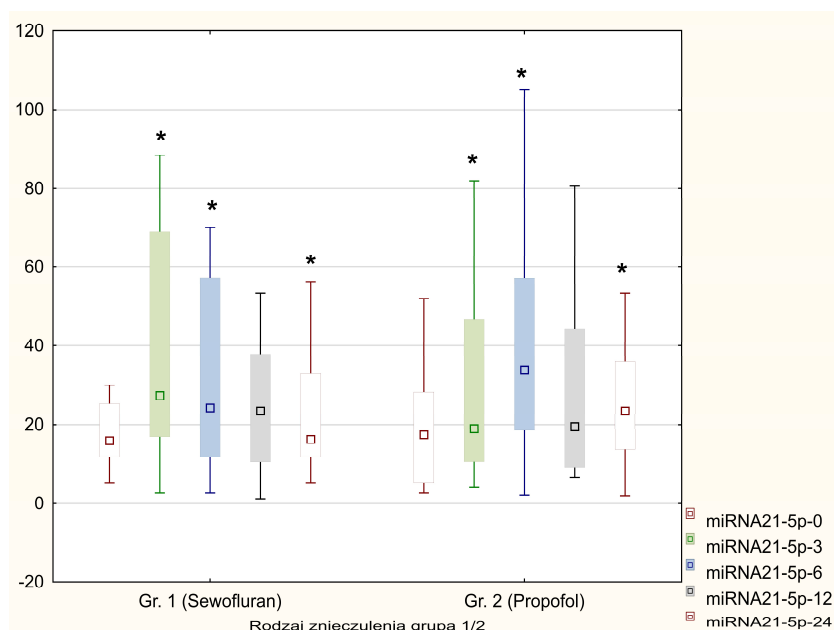
Także w przypadku miRNA-21-5p analizowano całą biorącą udział w badaniu populację pacjentów bez podziału na grupy. Odmienne od powyżej przedstawianych trendów ekspresji miRNA prezentują się zmiany ekspresji miRNA-21-5p w czasie, we krwi obwodowej. W tym przypadku obserwowano istotny statystycznie ($p < 0,05$) wzrost ekspresji już w 3 godzinie reperfuzji, ze szczytowym wzrostem w 6 godzinie ($p = 0,002$), a następnie istotnym spadkiem wartości między 6 a 12 godziną obserwacji ($p < 0,05$). W obserwacji trendu kinetyki miRNA-21-5p można zauważyć również pewną dwufazowość jego aktywności z ponownym istotnym wzrostem wartości, który obserwuje się po 24 godzinach ($p = 0,014$). Na żadnym etapie obserwacji nie odnotowano istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami.

Tabela 13 Dynamika zmian ekspresji miRNA-21-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.

Punkt czasowy		T0	T3	T6	T12	T24
miRNA-21-5p	Gr. 1	15,9 (5,2-101) N 13	27,3* (2,6-88,4) N 17	24,2* (2,6-70) N 18	23,4 (1,2-104,1) N 18	16,25* (5,2-56,20) N 18
	Gr. 2	17,45 (2,6-65,8) N 10	19* (3,9-81,9) N 16	33,8* (2,08-105) N 16	19,5 (6,5-80,6) N 15	23,4* (1,9-94,9) N 11
Porównanie grup	p	0,749	0,560	0,322	0,940	0,481

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartyl – górny kwartyl), punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia kłęba aortalnego, N – liczba analizowanych przypadków; grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, Porównanie grup – brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$). (*) różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w stosunku do wartości wyjściowych w czasie obserwacji w grupach.

Rycina 8. Dynamika zmian poziomu ekspresji miRNA-21-5p w czasie we krwi, porównanie badanych grup: gr. 1 – Sewofluran, gr. 2 – Propofol



Przedstawiono jako mediana (min. – max.) Punkty czasowe: miRNA-21-5p – 0 przed zabiegiem, miRNA-21-5p – 3, miRNA-21-5p – 6, miRNA-21-5p – 12, miRNA-21-5p – 24 – wyniki uzyskane w 3-, 6-, 12-, 24 h od początku reperfuzji, porównanie badanych grup: Gr. 1 – Sewofluran, Gr. 2 – Propofol, (*) różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w czasie obserwacji w grupach.

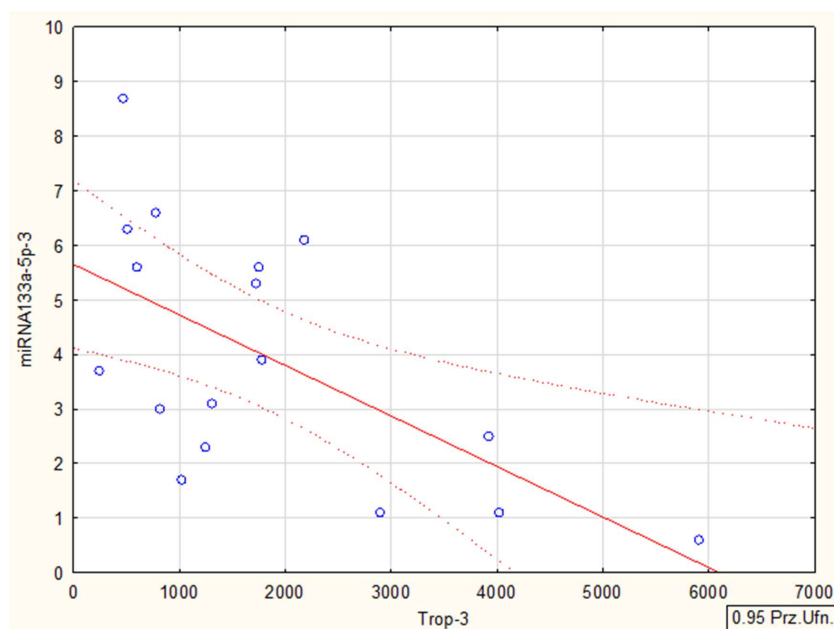
5.4 OCENA WZAJEMNYCH KORELACJI BIOMARKERÓW USZKODZENIA MIĘŚNIA SERCOWEGO I ANALIZOWANYCH MIRNA WE KRWI

Na dalszym etapie analizy uzyskanych wyników badano wzajemne korelacje wybranych miRNA i biomarkerów uszkodzenia mięśnia sercowego (troponina I, CKMB_{akt.}) w poszczególnych punktach czasowych. Uzyskane wyniki wykazały słabą korelację analizowanych wskaźników. Tylko w kilku punktach czasowych stężenia troponin i CKMB_{akt.} istotnie statystycznie korelowały z badanymi miRNA.

5.4.1 MIRNA-133A-5P / TROPONINA I

Stężenie hsc-troponiny I w 3 godzinie (T3) od przywrócenia krążenia wieńcowego korelowało ujemnie z poziomem ekspresji miRNA-133a-5p, ($r = -0,415$, $p = 0,017$), przy czym korelacja ta była silniejsza w grupie 1 – Sewofluran ($r = -0,602$, $p = 0,01$) w porównaniu z grupą 2 – Propofol.

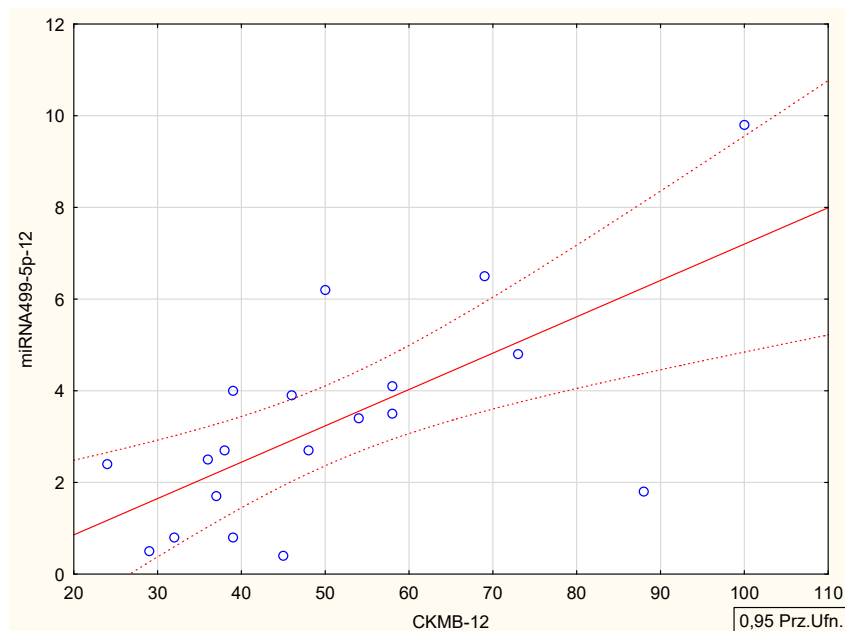
Rycina 9. Korelacja między ekspresją miRNA-133a-5p, a stężeniem hsc-troponiny I w punkcie czasowym T3, gr. 1 – Sewofluran.



5.4.2 MiRNA-499-5p / CKMB_{AKT}.

W całej grupie badanych pacjentów obserwowano słabą dodatnią korelację między CKMB_{akt} w surowicy a stopniem ekspresji miRNA-499-5p ($r = 0,343$, $p = 0,034$) w 12 godzinie (T12) od przywrócenia krążenia wieńcowego. Zaznaczyła się różnica w sile korelacji pomiędzy grupą 1 a grupą 2. W grupie 2 – Propofol była ona wyraźniej zaznaczona ($r = 0,663$, $p = 0,002$) w porównaniu z grupą 1 – Sewofluran.

Rycina 10. Korelacja między ekspresją miRNA-499-5p, a CKMB_{akt} w punkcie czasowym T12, gr. 2 Propofol



5.5 EKSPRESJA MIRNA W BIOPTATACH PRAWEGO PRZEDSIONKA SERCA

Ekspresję miRNA w mięśniu prawego przedsionka podczas zabiegu operacyjnego analizowano u wszystkich uczestniczących w badaniu pacjentów. Materiał do badań pobierano w dwóch punktach czasowych: przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego

(w trakcie kaniulacji) oraz ok. 30 minut po puszczeniu kłemy aortalnej w trakcie reperfuzji (w czasie dekaniulacji przedsionka). We wszystkich przypadkach nie stwierdzono wpływu rodzaju znieczulenia na poziom ekspresji badanych miRNA w mięśniu przedsionka ($p > 0.05$). Także stopień ekspresji każdego z analizowanych miRNA: miRNA-1-3p ($p = 0,66$), miRNA- 499-5p ($p = 0,50$) oraz miRNA-133a-5p ($p = 0,43$) w badanych punktach czasowych nie zmienił się istotnie statystycznie. Tylko w przypadku miRNA-21-5p wykazano istotny statystycznie spadek ekspresji w stosunku do wartości wyjściowych ($p = 0,00$).

Tabela 14 Dynamika zmian ekspresji miRNA-1-3p w czasie, w mięśniu prawego przedsionka, porównanie grup.

		Przed CBP	Po CBP
miRNA-1-3p	Gr. 1	49,50	51,50
	N = 20	19,35 - 91,50	21,75 - 148,50
[Ilość kopii/μl]	Gr. 2	50,00	67,00
	N = 19	27,20 - 184,00	16,60 - 184,00
Porównanie grup	p	0,622	0,593

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartył – górny kwartył), punkty czasowe: przed CBP – w trakcie kaniulacji przedsionków przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, po CBP – 30 min. po puszczeniu kłemy aortalnej, w trakcie reperfuzji w trakcie dekaniulacji przedsionków, N – liczba analizowanych przypadków, grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol. Brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) między grupami oraz w czasie obserwacji.

Tabela 15. Dynamika zmian ekspresji miRNA-499-5p w czasie, w mięśniu prawego przedsionka, porównanie grup.

		Przed CBP	Po CBP
miRNA-499-5p	Gr. 1	13,30	19,90
	N = 20	10,15 - 34,50	9,50 - 30,00
[Ilość kopii/μl]	Gr. 2	22,80	23,40
	N = 19	10,70 - 57,00	5,40 - 44,00
Porównanie grup	p	0,368	0,921

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartył – górny kwartył), punkty czasowe: przed CBP – w trakcie kaniulacji przedsionków przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, po CBP – 30 min. po puszczeniu kłemy aortalnej w trakcie reperfuzji, w trakcie dekaniulacji przedsionków, N – liczba analizowanych przypadków, grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) między grupami oraz w czasie obserwacji.

Tabela 16 Dynamika zmian ekspresji miRNA-133a-5p w czasie, w mięśniu prawego przedsionka, porównanie grup.

		Przed ECC	Po ECC
miRNA-133a-5p [Ilość kopii/ μ l]	Gr. 1 N = 20	2,75 1,75 – 6,25	3,95 1,35 - 7,75
	Gr. 2 N = 19	3,60 2,00 – 8,60	3,80 1,50 - 20,90
Porównanie grup	p	0,456	0,910

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartył – górny kwartył), punkty czasowe: przed CBP – w trakcie kaniulacji przedsionków przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, po CBP – 30 min. po puszczeniu klemy aortalnej w trakcie reperfuzji, w trakcie dekaniulacji przedsionków, N – liczba analizowanych przypadków, grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) między grupami oraz w czasie obserwacji.

Tabela 17. Dynamika zmian ekspresji miRNA-21-5p w czasie, w mięśniu prawego przedsionka, porównanie grup.

		Przed CBP	Po CBP
miRNA-21-5p [Ilość kopii/ μ l]	Gr. 1 N = 20	0,85 0,35 - 1,45	0,00* 0,00 - 0,30
	Gr. 2 N = 19	0,60 0,30 - 0,80	0,00* 0,00 - 0,30
Porównanie grup	p	0,140	0,855

Przedstawiono jako mediana (dolny kwartył – górny kwartył), punkty czasowe: przed CBP – w trakcie kaniulacji przedsionków przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, po CBP – 30 min. po puszczeniu klemy aortalnej w trakcie reperfuzji, w trakcie dekaniulacji przedsionków, N – liczba analizowanych przypadków, grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol. Porównanie grup - brak różnicy istotnej statystycznie ($p < 0,05$). (*) różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$) w porównaniu z ekspresją wyjściową przed CBP.

5.6 WPLYW STOPNIA EKSPRESJI MIRNA NA RYZYKO WYSTĄPIENIA MIGOTANIA PRZEDSIONKÓW

W przeprowadzonej analizie ROC żaden z badanych miRNA nie okazał się być istotnym predyktorem wystąpienia migotania przedsionków.

5.7 PROFIL KINETYKI MIRNA WE KRWI PEŁNEJ, W ZAWALE OKOŁOOPERACYJNYM

U dwóch pacjentów z grupy 1 – Sewofluran w analizowanym badaniem okresie pojawiły się nowe regionalne zaburzenia kurczliwości mięśnia lewej komory z towarzyszącym wzrostem ekspresji markerów (hs-troponina I, CKMB_{akt.}) spełniające kryteria definicji zawału typu 5. Zmiany stężeń troponiny I i CKMB_{akt.} w czasie nie odbiegały od profilu opisywanego w literaturze. Obserwowaliśmy w obu przypadkach tendencję wzrostową zaczynającą się w 3 godzinie (T3) od początku reperfuzji, z dalek narastającymi stężeniami badanych markerów w 6 godzinie (T6), z gwałtownym wzrostem – szczytem w 12 godzinie (T12) i niewielką tendencją spadkową w 24 godzinie (T24) reperfuzji.

Kinetyka zmian miRNA w czasie była zależna od zależała od rodzaju analizowanego miRNA. Dynamika zmian miRNA-499–5p i miRNA-133a–5p charakteryzowała się dwufazowym wzrostem ich aktywności. Zanotowano niewielkie zmiany ekspresji w czasie ze szczytem 3 godzinie (T3) od początku reperfuzji, tendencją spadkową w 6 godzinie (T6) i ponownym wzrostem w 12 godzinie (T12) reperfuzji oraz ponownym spadkiem ekspresji poniżej wartości wyjściowych w 24 godzinie od reperfuzji.

Natomiast kinetyka zmian w czasie miRNA-1–3p i miRNA-21–5p charakteryzowała się jednofazowym silnym wzrostem ekspresji ze szczytem w 3 godzinie (T3) i stopniowym spadkiem w kolejnych punktach czasowych T6, T12, T24

Pojawiający się w 3 godzinie reperfuzji szczyt ekspresji u wszystkich badanych miRNA wyprzedzał znacznie szczyt zmian tradycyjnych markerów (hs-troponina I i CKMB_{akt.}), który pojawiał się dopiero w 12 godzinie (T12) od początku reperfuzji z utrzymującą się tendencją spadkową w 24 godzinie (T24) reperfuzji.

5.8 WZAJEMNE KORELACJE BADANYCH MIRNA WE KRWI PEŁNEJ W POSZCZEGÓLNYCH PUNKTACH CZASOWYCH.

5.8.1 MIRNA-499–5P

We krwi pełnej, za wyjątkiem punktu czasowego T12, miRNA-499–5p wykazywał wzajemną istotną statystycznie ($p < 0,05$), dodatnią korelację z miRNA-21–

5p we wszystkich pozostałych punktach czasowych (T0, T3, T6, T24). Należy zaznaczyć, że notowano różnice w sile korelacji w zależności od badanej grupy: w grupie 1 - Sewofluran silna dodatnia korelacja występowała w punktach czasowych: T3 ($r = 0,699$, $p = 0,001$) i T24 ($r = 0,653$, $p = 0,004$), przy jednoczesnym jej braku ($p > 0.05$) w tych punktach czasowych w grupie 2 – Propofol. Z kolei w grupie 2 – Propofol obserwowano silne korelacje w punktach czasowych T0 ($r = 0,933$, $p = 0,0002$) i T6 ($r = 0,619$, $p = 0,018$). W przypadku zarówno miRNA-1-3p, jak i miRNA-133a-5p zaznaczała się słaba ujemna korelacja w punkcie czasowym T0 w analizie wszystkich przypadków bez podziału na grupy.

Tabela 18. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-499-5p a: miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p. Porównanie grup w zależności od metody znieczulenia.

	Punkt czasowy	miRNA-133a-5p		miRNA-1-3p		miRNA-21-5p	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA-499-5p	0	$r = -0,414$ $p = 0,077$ N = 19	$r = -0,262$ $p = 0,326$ N = 16	$r = -0,418$ $p = 0,074$ N = 19	$r = -0,296$ $p = 0,265$ N = 16	$r = 0,277$ $p = 0,359$ N = 13	$r = 0,933$ $p = 0,0002^*$ N = 9
	3	$r = 0,135$ $p = 0,617$ N = 16	$r = -0,046$ $p = 0,870$ N = 15	$r = 0,066$ $p = 0,829$ N = 13	$r = -0,284$ $p = 0,324$ N = 14	$r = 0,699$ $p = 0,001^*$ N = 17	$r = 0,259$ $p = 0,331$ N = 16
	6	$r = -0,053$ $p = 0,832$ N = 18	$r = 0,138$ $p = 0,651$ N = 13	$r = 0,188$ $p = 0,502$ N = 15	$r = -0,203$ $p = 0,485$ N = 14	$r = 0,325$ $p = 0,188$ N = 18	$r = 0,619$ $p = 0,018^*$ N = 14
	12	$r = 0,343$ $p = 0,149$ N = 19	$r = 0,086$ $p = 0,741$ N = 17	$r = -0,226$ $p = 0,416$ N = 15	$r = -0,026$ $p = 0,924$ N = 15	$r = 0,391$ $p = 0,107$ N = 18	$r = 0,042$ $p = 0,879$ N = 15
	24	$r = -0,438$ $p = 0,177$ N = 11	$r = 0,165$ $p = 0,589$ N = 13	$r = 0,289$ $p = 0,387$ N = 11	$r = 0,432$ $p = 0,160$ N = 12	$r = 0,653$ $p = 0,004^*$ N = 17	$r = 0,113$ $p = 0,738$ N = 11

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$).

Tabela 19. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-499-5p a: miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p. Przedstawione dla całej badanej populacji bez podziału na grupy w zależności od metody znieczulenia.

	Punkt czasowy	miRNA-133-5p	miRNA-1-3p	miRNA-21-5p
miRNA-499-5p	0	r = -0,335 p = 0,048* N = 35	r = -0,369 p = 0,028* N = 35	r = 0,563 p = 0,006* N = 22
	3	r = 0,009 p = 0,961 N = 31	r = -0,066 p = 0,741 N = 27	r = 0,518 p = 0,002* N = 33
	6	r = 0,031 p = 0,868 N = 31	r = -0,032 p = 0,866 N = 29	r = 0,389 p = 0,027* N = 32
	12	r = 0,221 p = 0,193 N = 36	r = -0,154 p = 0,416 N = 30	r = 0,277 p = 0,117 N = 33
	24	r = -0,056 p = 0,793 N = 24	r = 0,350 p = 0,101 N = 23	r = 0,377 p = 0,047* N = 28

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej, N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$).

5.8.2 MiRNA-133A-5P

W analizie całej badanej populacji, w punkcie czasowym T0, aktywność miRNA-133a-5p słabo dodatnio korelowała ($r = 0,391$, $p = 0,021$) z miRNA-1-3p. Korelacja ta zaznaczyła się wyraźniej w grupie 1 – Sewofluran ($r = 0,59$, $p = 0,009$), przy jej braku w grupie 2 – Propofol. W tym punkcie czasowym (T0), w podobnym zakresie, ale ujemnie ($r = -0,035$, $p = 0,048$), aktywność miRNA-133a-5p korelowała z miRNA-499-5p. W 6 godzinie reperfuzji (T6) występowała słaba ujemna korelacja między miRNA-133a-5p i miRNA-1-3p ($r = -0,382$, $p = 0,044$). Również w punkcie czasowym (T6) aktywność miRNA-133a-5p korelowała dodatnio z miRNA-21-5p ($r = 0,50$, $p = 0,005$), przy czym korelacja ta była istotna statystycznie wyłącznie w grupie 2 – Propofol ($r = 0,774$, $p = 0,005$).

Tabela 20. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-133a-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p: Porównanie grup w zależności od metody znieczulenia.

	Punkt czasowy	miRNA-499-5p		miRNA-1-3p		miRNA-21-5p	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA 133a-5p	0	r = -0,414 p = 0,077 N = 19	r = -0,262 p = 0,326 N = 16	r = 0,590 p = 0,009*	r = 0,160 p = 0,551 N = 16	r = 0,035 p = 0,907 N = 13	r = 0,225 p = 0,530 N = 10
	3	r = 0,135 p = 0,617 N = 16	r = -0,046 p = 0,870 N = 15	r = 0,272 p = 0,367 N = 13	r = 0,382 p = 0,219 N = 12	r = -0,118 p = 0,675 N = 15	r = 0,268 p = 0,374 N = 13
	6	r = -0,053 p = 0,832 N = 18	r = 0,138 p = 0,651 N = 13	r = 0,005 p = 0,985 N = 14	r = -0,640 p = 0,013*	r = 0,235 p = 0,362 N = 17	r = 0,774 p = 0,005*
	12	r = 0,343 p = 0,149 N = 19	r = 0,086 p = 0,741 N = 17	r = -0,147 p = 0,598 N = 15	r = 0,230 p = 0,428 N = 14	r = -0,014 p = 0,954 N = 18	r = 0,176 p = 0,546 N = 14
	24	r = -0,438 p = 0,177 N = 11	r = 0,165 p = 0,589 N = 13	r = -0,468 p = 0,288 N = 7	r = 0,594 p = 0,091 N = 9	r = 0,184 p = 0,586 N = 11	r = -0,406 p = 0,244 N = 10

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05).

Tabela 21. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-133a-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p. Przedstawione dla całej badanej populacji bez podziału na grupy znieczulenia.

	Punkt czasowy	miRNA-499-5p	miRNA-1-3p	miRNA-21-5p
miRNA 133a-5p	0	r = -0,335 p = 0,048* N = 35	r = 0,391 p = 0,021* N = 34	r = 0,115 p = 0,598 N = 23
	3	r = 0,009 p = 0,961 N = 31	r = 0,296 p = 0,150 N = 25	r = 0,038 p = 0,845 N = 28
	6	r = 0,031 p = 0,868 N = 31	r = -0,382 p = 0,044* N = 28	r = 0,509 p = 0,005* N = 28

12	r = 0,221 p = 0,193 N = 36	r = -0,025 p = 0,897 N = 29	r = 0,074 p = 0,684 N = 32
24	r = -0,056 p = 0,793 N = 24	r = 0,180 p = 0,502 N = 16	r = -0,089 p = 0,698 N = 21

Grupa. 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$).

5.8.3 MIRNA-1-3P

Tabela 22. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-1-3p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-21-5p. Porównanie grup w zależności od metody znieczulenia.

	Punkt czasowy	miRNA-499-5p		miRNA-133a-5p		miRNA-21-5p	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA-1-3p	0	r = -0,418 p = 0,074 N = 19	r = -0,296 p = 0,265 N = 16	r = 0,590 p = 0,009*	r = 0,160 p = 0,551 N = 16	r = -0,231 p = 0,446 N = 13	r = -0,018 p = 0,96 N = 10
	3	r = 0,066 p = 0,829 N = 13	r = -0,284 p = 0,324 N = 14	r = 0,272 p = 0,367 N = 13	r = 0,382 p = 0,219 N = 12	r = -0,203 p = 0,505 N = 13	r = -0,184 p = 0,545 N = 13
	6	r = 0,188 p = 0,502 N = 15	r = -0,203 p = 0,485 N = 14	r = 0,005 p = 0,985 N = 14	r = -0,640 p = 0,013*	r = -0,136 p = 0,641 N = 14	r = -0,448 p = 0,124 N = 13
	12	r = -0,226 p = 0,416 N = 15	r = -0,026 p = 0,924 N = 15	r = -0,147 p = 0,598 N = 15	r = 0,230 p = 0,428 N = 14	r = -0,158 p = 0,588 N = 14	r = -0,547 p = 0,052 N = 13
	24	r = 0,289 p = 0,387 N = 11	r = 0,432 p = 0,160 N = 12	r = -0,468 p = 0,288 N = 7	r = 0,594 p = 0,091 N = 9	r = 0,077 p = 0,820 N = 11	r = -0,437 p = 0,205 N = 10

Grupa. 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$)

Tabela 23 Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-1-3p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-21-5p. Przedstawione dla całej badanej populacji bez podziału na grupy znieczulenia.

Punkt czasowy		miRNA-499-5p	miRNA-133a-5p	miRNA-21-5p
miRNA 1-3p	0	r = -0,369 p = 0,028* N = 35	r = 0,391 p = 0,021* N = 34	r = -0,179 p = 0,412 N = 23
	3	r = -0,066 p = 0,741 N = 27	r = 0,296 p = 0,15 N = 25	r = -0,229 p = 0,259 N = 26
	6	r = -0,032 p = 0,866 N = 29	r = -0,382 p = 0,044* N = 28	r = -0,353 p = 0,070 N = 27
	12	r = -0,154 p = 0,416 N = 30	r = -0,025 p = 0,897 N = 29	r = -0,265 p = 0,179 N = 27
	24	r = 0,350 p = 0,101 N = 23	r = 0,180 p = 0,502 N = 16	r = -0,106 p = 0,646 N = 21

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05).

Analiza wzajemnej korelacji w miRNA-1-3p z miRNA-499-5p oraz miRNA-133a-5p zostały opisane powyżej (5.8.1 i 5.8.2). Nie wykazano żadnych korelacji miRNA-1-3p z miRNA-21 w całym czasie obserwacji.

5.8.4 MiRNA-21-5p

Tabela 24 Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-21-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p. Porównanie grup w zależności od metody znieczulenia.

Punkt czasowy	miRNA-499-5p		miRNA-133a-5p		miRNA-1-3p		
	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	
miRNA 21-5p	0	r = 0,277 p = 0,359 N = 13	r = 0,933 p = 0,000* N = 9	r = 0,035 p = 0,907 N = 13	r = 0,225 p = 0,530 N = 10	r = -0,231 p = 0,446 N = 13	r = -0,018 p = 0,960 N = 10

3	r = 0,699 p = 0,001* N = 17	r = 0,259 p = 0,331 N = 16	r = -0,118 p = 0,675 N = 15	r = 0,268 p = 0,374 N = 13	r = -0,203 p = 0,505 N = 13	r = -0,184 p = 0,545 N = 13
6	r = 0,325 p = 0,188 N = 18	r = 0,619 p = 0,018* N = 14	r = 0,235 p = 0,362 N = 17	r = 0,268 p = 0,374 N = 13	r = -0,136 p = 0,641 N = 14	r = -0,448 p = 0,124 N = 13
12	r = 0,391 p = 0,107 N = 18	r = 0,042 p = 0,879 N = 15	r = -0,014 p = 0,954 N = 18	r = 0,176 p = 0,546 N = 14	r = -0,158 p = 0,588 N = 14	r = -0,547 p = 0,052 N = 13
24	r = 0,653 p = 0,004* N = 17	r = 0,113 p = 0,738 N = 11	r = 0,184 p = 0,586 N = 11	r = -0,406 p = 0,244 N = 10	r = 0,077 p = 0,820 N = 11	r = -0,437 p = 0,205 N = 10

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05)

Tabela 25. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-21-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p. Przedstawione dla całej badanej populacji bez podziału na grupy znieczulenia.

	Punkt czasowy	miRNA-499-5p	miRNA-133a-5p	miRNA-1-3p
miRNA-21-5p	0	r = 0,563 p = 0,006* N = 22	r = 0,115 p = 0,598 N = 23	r = -0,179 p = 0,412 N = 23
	3	r = 0,518 p = 0,002* N = 33	r = 0,038 p = 0,845 N = 28	r = -0,229 p = 0,259 N = 26
	6	r = 0,389 p = 0,027* N = 32	r = 0,509 p = 0,005* N = 28	r = -0,353 p = 0,070 N = 27
	12	r = 0,277 p = 0,117 N = 33	r = 0,074 p = 0,684 N = 32	r = -0,265 p = 0,179 N = 27
	24	r = 0,377 p = 0,047* N = 28	r = -0,089 p = 0,698 N = 21	r = -0,106 p = 0,646 N = 21

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T0 - 30' przed rozpoczęciem zabiegu, T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05)

Analiza, poziomu ekspresji miRNA-21 we krwi pełnej, w relacji do pozostałych miRNA, została opisana powyżej (5.8.1, 5.8.2, 5.8.3).

5.9 WZAJEMNE KORELACJE BADANYCH MIRNA W BIOPTATACH MIĘŚNIA PRAWEGO PRZEDSIONKA PRZED I PO ZAKOŃCZENIU KRĄŻENIA POZAUSTROJOWEGO

5.9.1 MIRNA-499-5P

Tabela 26 Korelacja między ekspresją miRNA-499-5p a: miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedSIONKA przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.

Punkt czasowy	miRNA-133a-5p		miRNA-1-3p		miRNA-21-5p		
	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	
miRNA-499-5p	Przed CBP	r = 0,802 p = 0,000* N = 20	r = 0,458 p = 0,048* N = 19	r = 0,894 p = 0,000* N = 20	r = 0,599 p = 0,006* N = 19	r = 0,174 p = 0,460 N = 20	r = 0,161 p = 0,507 N = 19
	Po CBP	r = 0,795 p = 0,000* N = 20	r = 0,701 p = 0,000* N = 19	r = 0,897 p = 0,000* N = 20	r = 0,515 p = 0,023* N = 19	r = 0,746 p = 0,000* N = 20	r = 0,117 p = 0,632 N = 19

Grupa 1 – Sevofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: przed CBP - przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, w trakcie kaniulacji przedSIONKA; po CBP - po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, w trakcie dekaniulacji przedSIONKA; N – liczba analizowanych przypadków, (*) różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$).

Aktywność miRNA-499-5p wykazywała silną dodatnią korelację ($p < 0,05$) z miRNA-133a-5p oraz miRNA-1-3p zarówno przed, jak i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, niezależnie od metody znieczulenia. Nie odnotowano istotnych korelacji z miRNA-21-5p przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, natomiast po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, istotna statystycznie dodatnia korelacja z miRNA-21-5p występowała tylko w grupie 1 – Sevofluran.

5.9.2 MiRNA-133A-5P

Tabela 27. Korelacja między ekspresją miRNA-133a-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p w biopsjach mięśnia prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.

	Punkt czasowy	miRNA 499-5p		miRNA-1-3p		miRNA-21-5p	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA 133a-5p	Przed CBP	r = 0,802 p = 0,000* N = 20	r = 0,458 p = 0,048* N = 19	r = 0,751 p = 0,000* N = 20	r = 0,349 p = 0,143 N = 19	r = 0,226 p = 0,336 N = 20	r = -0,172 p = 0,481 N = 19
	Po CBP	r = 0,795 p = 0,000* N = 20	r = 0,701 p = 0,000* N = 19	r = 0,867 p = 0,000* N = 20	r = 0,697 p = 0,000* N = 19	r = 0,510 p = 0,021* N = 20	r = 0,315 p = 0,188 N = 19

Grupa 1 – Sevofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: przed CBP - przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, w trakcie kaniulacji przedsionka; po CBP - po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, w trakcie dekaniulacji przedsionka; N – liczba analizowanych przypadków, (*) różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$).

MiRNA-133a-5p przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego wykazywał dodatnią, istotną statystycznie korelację z miRNA-499-5p a z miRNA-1-3p tylko w grupie 1 – Sewofluran. Nie stwierdzono istotnych korelacji z miRNA-21-5p. Po odłączeniu krążenia pozaustrojowego miRNA-133a-5p istotnie korelował dodatnio z pozostałymi badanymi miRNA, z tym że w relacji do miRNA-21-5p obserwowano to tylko w grupie 1 – Sewofluran.

5.9.3 MiRNA-1-3P

Wzajemne korelacje MiRNA-1-3p z miRNA-499-5p i miRNA-133a-5p opisano powyżej (5.9.1, 5.9.2) Nie odnotowano korelacji MiRNA-1-3p z miRNA-21-5p przed podłączeniem CPB. Po zakończeniu krążenia pozaustrojowego miRNA-1-3p istotnie dodatnio korelował z miRNA-21-5p w grupie 1 – Sewofluran.

Tabela 28. Korelacja między ekspresją miRNA-1-3p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-21-5p w biopsjach mięśnia prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.

	Punkt czasowy	miRNA-499-5p		miRNA-133a-5p		miRNA-21-5p	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA-1-5p	Przed CBP	r = 0,894 p = 0,000* N = 20	r = 0,599 p = 0,006* N = 19	r = 0,751 p = 0,000* N = 20	r = 0,349 p = 0,143 N = 19	r = 0,222 p = 0,346 N = 20	r = 0,274 p = 0,255 N = 19
	Po CBP	r = 0,897 p = 0,000* N = 20	r = 0,515 p = 0,023* N = 19	r = 0,867 p = 0,000* N = 20	r = 0,697 p = 0,000* N = 19	r = 0,578 p = 0,007* N = 20	r = 0,380 p = 0,108 N = 19

Grupa. 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: przed CBP - przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, w trakcie kaniulacji przedsionka; po CBP - po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, w trakcie dekaniulacji przedsionka; N – liczba analizowanych przypadków, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05).

5.9.4 miRNA-21-5p

Tabela 29. Korelacja między ekspresją miRNA-21-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p w biopsjach mięśnia prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.

	Punkt czasowy	miRNA 499-5p		miRNA-133a-5p		miRNA-1-3p	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA-21-5p	Przed CBP	r = 0,174 p = 0,460 N = 20	r = 0,161 p = 0,507 N = 19	r = 0,227 p = 0,336 N = 20	r = -0,172 p = 0,481 N = 19	r = 0,222 p = 0,346 N = 20	r = 0,274 p = 0,255 N = 19
	Po CBP	r = 0,746 p = 0,000* N = 20	r = 0,117 p = 0,632 N = 19	r = 0,510 p = 0,021* N = 20	r = 0,315 p = 0,188 N = 19	r = 0,578 p = 0,007* N = 20	r = 0,380 p = 0,108 N = 19

Grupa. 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: przed CBP - przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, w trakcie kaniulacji przedsionka; po CBP - po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, w trakcie dekaniulacji przedsionka; N – liczba analizowanych przypadków, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05).

Analiza korelacji ekspresji miRNA-21 w biopatach prawego przedsionka serca, w relacji do pozostałych miRNA, została opisana powyżej (5.9.1, 5.9.2, 5.9.3).

5.10 WPŁYW CZASU TRWANIA KRAŻENIA POZAUSTROJOWEGO (CBP), CZASU TRWANIA ZAKLEMOWANIA AORTY (ACC), CZASU REPERFUZJI NA POZIOM EKSPRESJI BADANYCH MIRNA ORAZ STĘŻENIA TROPONINY I WE KRWI.

5.10.1 TROPONINA I

Tabela 30. Korelacja między stężeniami troponiny I we krwi a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji.

	Punkt czasowy	Czas CBP		Czas ACC		Czas reperfuzji	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
hs-TnI	3	r = 0,719 p = 0,0003* N = 20	r = 0,561 p = 0,012* N = 19	r = 0,542 p = 0,013* N = 20	r = 0,549 p = 0,014* N = 19	r = 0,654 p = 0,001* N = 20	r = 0,376 p = 0,112 N = 19
	6	r = 0,458 p = 0,042* N = 20	r = 0,489 p = 0,039* N = 18	r = 0,235 p = 0,317 N = 20	r = 0,383 p = 0,116 N = 18	r = 0,527 p = 0,016* N = 20	r = 0,390 p = 0,109 N = 18
	12	r = 0,538 p = 0,014* N = 20	r = 0,565 p = 0,011* N = 19	r = 0,350 p = 0,129 N = 20	r = 0,506 p = 0,026* N = 19	r = 0,552 p = 0,011* N = 20	r = 0,363 p = 0,126 N = 19
	24	r = 0,488 p = 0,028* N = 20	r = 0,439 p = 0,059 N = 19	r = 0,388 p = 0,090 N = 20	r = 0,344 p = 0,148 N = 19	r = 0,548 p = 0,012* N = 20	r = 0,312 p = 0,193 N = 19

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05).

Stężenia troponiny I istotnie statystycznie dodatnio korelowały z czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP) prawie we wszystkich badanych przedziałach czasowych, niezależnie od badanej grupy. Tylko w punkcie czasowym T24 w grupie 2 – Propofol ta korelacja nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej (p > 0,05). W ocenie wpływu czasu zaklemowania aorty (ACC) na stężenia troponin I istotna statystycznie

korelacja występowała w obu grupach w 3 godzinie (T3) reperfuzji. W 12 godzinie (T12) od rozpoczęcia reperfuzji istotna statystycznie korelacja z czasem zaklemowania aorty występowała tylko w grupie 2 – Propofol.

Czas trwania reperfuzji istotnie statystycznie, korelował dodatnio ze stężeniami troponin we wszystkich badanych przedziałach czasowych, ale tylko w grupie 1 – Sewofluran.

5.10.2 MiRNA-499-5p

Tabela 31. Korelacja między ekspresją miRNA-499-5p we krwi, a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji.

	Punkt czasowy	Czas CBP		Czas ACC		Czas reperfuzji	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA-499-5p	3	r = 0,014 p = 0,951 N = 19	r = 0,075 p = 0,759 N = 19	r = -0,112 p = 0,647 N = 19	r = 0,038 p = 0,876 N = 19	r = -0,114 p = 0,640 N = 19	r = 0,018 p = 0,938 N = 19
	6	r = 0,483 p = 0,030* N = 20	r = 0,230 p = 0,373 N = 17	r = 0,225 p = 0,338 N = 20	r = 0,439 p = 0,077 N = 17	r = 0,188 p = 0,425 N = 20	r = -0,167 p = 0,520 N = 17
	12	r = 0,047 p = 0,845 N = 19	r = 0,215 p = 0,374 N = 19	r = 0,163 p = 0,502 N = 19	r = 0,379 p = 0,108 N = 19	r = -0,174 p = 0,475 N = 19	r = 0,106 p = 0,662 N = 19
	24	r = 0,334 p = 0,161 N = 19	r = -0,055 p = 0,822 N = 19	r = 0,246 p = 0,309 N = 19	r = 0,067 p = 0,782 N = 19	r = 0,091 p = 0,709 N = 19	r = -0,040 p = 0,870 N = 19

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05)

MiRNA-499-5p korelował dodatnio (p < 0,05) z czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP) tylko w 6 godzinie (T6) od początku reperfuzji w grupie 1 – Sewofluran. Czasy trwania zaklemowania aorty (ACC) i czas trwania reperfuzji nie miały wpływu na poziom ekspresji miRNA-499-5p.

5.10.3 MiRNA-133A-5P

Tabela 32. Korelacja między ekspresją miRNA-133a-5p we krwi, a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemania aorty (ACC), czasem reperfuzji.

	Punkt czasowy	Czas CBP		Czas ACC		Czas reperfuzji	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA-133a-5p	3	r = -0,430 p = 0,084 N = 17	r = 0,076 p = 0,787 N = 15	r = 0,054 p = 0,834 N = 17	r = 0,076 p = 0,787 N = 15	r = -0,514 p = 0,034*	r = -0,348 p = 0,143 N = 15
	6	r = -0,387 p = 0,112 N = 18	r = -0,310 p = 0,279 N = 14	r = -0,313 p = 0,205 N = 18	r = -0,310 p = 0,279 N = 14	r = -0,476 p = 0,045*	r = -0,194 p = 0,426 N = 14
	12	r = 0,037 p = 0,877 N = 19	r = -0,012 p = 0,962 N = 17	r = -0,019 p = 0,938 N = 19	r = -0,012 p = 0,962 N = 17	r = 0,076 p = 0,754 N = 19	r = -0,182 p = 0,454 N = 17
	24	r = -0,756 p = 0,007* N = 11	r = -0,408 p = 0,166 N = 13	r = -0,336 p = 0,311 N = 11	r = -0,408 p = 0,166 N = 13	r = -0,478 p = 0,136 N = 11	r = -0,421 p = 0,072 N = 13

grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T3, T6, T12, T24 – odpowiednio 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie ($p < 0,05$)

MiRNA-133a-5p silnie ujemnie korelował ($p < 0,05$) z czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP) w 24 godzinie reperfuzji, ale wyłącznie w grupie 1 – Sewofluran. Czas zaklemania aorty (ACC) nie miał istotnego wpływu ($p > 0,05$) na poziomy ekspresji miRNA-133a-5p w obu badanych grupach. Ekspresja miRNA-133a-5p istotnie statystycznie ujemnie korelowała z czasem reperfuzji tylko w grupie 1 – Sewofluran w 3 godzinie (T3) i 6 godzinie (T6) od jej początku. Czas trwania reperfuzji nie miał istotnego wpływu ($p > 0,05$) na poziomy ekspresji miRNA-133a-5p w grupie 2 – Propofol.

5.10.4 MiRNA-1-3p

Tabela 33 Korelacja między ekspresją miRNA-1-3p we krwi a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji.

	Punkt czasowy	Czas CBP		Czas ACC		Czas reperfuzji	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA-1-3p	3	r = -0,037 p = 0,898 N = 14	r = -0,374 p = 0,186 N = 14	r = -0,039 p = 0,892 N = 14	r = -0,266 p = 0,356 N = 14	r = -0,088 p = 0,763 N = 14	r = -0,303 p = 0,292 N = 14
	6	r = -0,111 p = 0,691 N = 15	r = -0,206 p = 0,442 N = 16	r = -0,070 p = 0,802 N = 15	r = -0,072 p = 0,788 N = 16	r = -0,270 p = 0,329 N = 15	r = 0,051 p = 0,849 N = 16
	12	r = -0,081 p = 0,765 N = 16	r = 0,206 p = 0,459 N = 15	r = -0,296 p = 0,265 N = 16	r = 0,051 p = 0,856 N = 15	r = -0,230 p = 0,390 N = 16	r = 0,200 p = 0,474 N = 15
	24	r = -0,236 p = 0,483 N = 11	r = 0,312 p = 0,322 N = 12	r = -0,236 p = 0,483 N = 11	r = 0,465 p = 0,126 N = 12	r = -0,363 p = 0,272 N = 11	r = -0,077 p = 0,811 N = 12

Grupa 1 – Sevofluranowa, grupa 2 – Propofolowa, punkty czasowe: T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, brak różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$).

MiRNA-1-3p zarówno w grupie 1 – Sevofluran jak i grupie 2–Propofol nie wykazywał istotnych statystycznie korelacji ($p > 0,05$) z analizowanymi parametrami czasu trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasu zaklemowania aorty (ACC), czasu reperfuzji w badanych przedziałach czasowych.

5.10.5 MiRNA-21-5p

MiRNA-21-5p nie korelował istotnie statystycznie ($p > 0,05$) z czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP) i czasem reperfuzji w badanych przedziałach czasowych zarówno w grupie 1 – Sevofluran jak grupie 2 – Propofol. Z czasem trwania zaklemowania aorty miRNA-21-5p istotnie statystycznie korelował dodatnio tylko w grupie 1 – Sevofluran w 6 godzinie reperfuzji. Czas trwania zaklemowania aorty (ACC) nie korelował istotnie z ekspresją miRNA-21-5p u populacji chorych z grupy 2 – Propofol.

Tabela 34 Korelacja między ekspresją miRNA-21-5p we krwi a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji.

	Punkt czasowy	Czas CBP		Czas ACC		Czas reperfuzji	
		Gr1	Gr2	Gr1	Gr2	Gr1	Gr2
miRNA-21-5p	3	r = 0,077 p = 0,768 N = 17	r = 0,350 p = 0,183 N = 16	r = 0,030 p = 0,906 N = 17	r = 0,336 p = 0,202 N = 16	r = 0,022 p = 0,932 N = 17	r = 0,032 p = 0,905 N = 16
	6	r = 0,394 p = 0,105 N = 18	r = 0,132 p = 0,623 N = 16	r = 0,490 p = 0,038*	r = 0,164 p = 0,543 N = 16	r = 0,118 p = 0,640 N = 18	r = 0,036 p = 0,892 N = 16
	12	r = 0,048 p = 0,849 N = 18	r = 0,464 p = 0,080 N = 15	r = 0,338 p = 0,170 N = 18	r = 0,290 p = 0,292 N = 15	r = -0,196 p = 0,433 N = 18	r = 0,413 p = 0,125 N = 15
	24	r = 0,020 p = 0,935 N = 18	r = 0,132 p = 0,698 N = 11	r = 0,095 p = 0,706 N = 18	r = 0,086 p = 0,800 N = 11	r = -0,006 p = 0,980 N = 18	r = -0,004 p = 0,989 N = 11

Grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol, punkty czasowe: T3, T6, T12, T24 – odpowiednio: 3 h, 6 h, 12 h, 24 h od puszczenia klemy aortalnej; N – liczba analizowanych przypadków, r - współczynnik korelacji, (*) różnica istotna statystycznie (p < 0,05)

5.11 KORELACJA CZASU TRWANIA ZAKLEMOWANIA AORTY (ACC) Z EKSPRESJĄ MIRNA W BIOPTATACH MIĘŚNIA PRAWEGO PRZEDSIONKA PO ZAKOŃCZENIU KRĄŻENIA POZAUSTROJOWEGO (CBP)

Ekspresja miRNA-499-5p zawartego w biopsjach pobranych z mięśnia prawego przedsionka w 30'po zakończeniu krążenia pozaustrojowego wykazywała dodatnią korelację z czasem ACC w całej badanej populacji pacjentów (r = 0,35, p = 0,027). Przy analizie porównawczej zarysowała się wyraźna różnica między grupami. W grupie 2 – Propofol zanotowano silną dodatnią korelację (r = 0,637, p = 0,003) przy braku istotnej statystycznie korelacji w grupie 1 – Sewofluran (p > 0,05). W ocenie miRNA-1-3p w mięśniu prawego przedsionka odnotowano podobne zależności. Dość silna istotna korelacja z czasem zaklemowania aorty występowała w grupie 2 – Propofol (r = 0,50, p = 0,029) przy braku istotnej statystycznie zależności w grupie 1 – Sewofluran (p > 0,05). Brak istotności statystycznej (r = 0,306, p = 0,058) występował także przy analizie wszystkich badanych bez podziału na grupy.

Ekspresje miRNA-133a-5p i miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedsionka w 30' po zakończeniu krążenia pozaustrojowego nie korelowały istotnie statystycznie ($p > 0,05$) z czasem zaklepowania aorty (ACC) w obu badanych grupach.

6 DYSKUSJA

W prezentowanym badaniu poddano analizie okołooperacyjną kinetykę wybranych miRNA: miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-133a-5p, miRNA-21-5p uwzględniając ich dużą swoistość dla mięśnia sercowego opisywaną w doniesieniach naukowych. Podjęto próbę oceny zmian w profilu ich ekspresji we krwi pełnej i biopsatach mięśnia prawego przedsionka podczas znieczulenia do operacji na otwartym sercu, przy użyciu krążenia pozaustrojowego, w zależności od zastosowanych dwóch różnych metod znieczulenia ogólnego.

Badania na zwierzętach wykazały, że ekspresja miRNA-1, miRNA-133a, miRNA-499 w mięśniu sercowym zmniejsza się po AMI w obszarze zawału i jego strefie granicznej, co sugeruje, że wzrost ekspresji miRNA-1 i miRNA-133a w ludzkiej surowicy wynika z uwalniania miRNA z komórek, które uległy martwicy [170, 171]. Uzyskiwane dane analizowano w relacji do standardowych markerów uszkodzenia mięśnia serca troponiny I i CKMB_{akt.}. Obecnie, zgodnie z wytycznymi, sercowe izoformy troponin nadal uznawane są za złoty standard diagnostyki zawału serca. Dodatkowo wprowadzone do praktyki klinicznej i laboratoryjnej testy troponinowe o wysokiej czułości dały możliwość zdiagnozowania nawet niewielkiego uszkodzenia miokardium, jak również wychwycenia fizjologicznych wahań związanych z obrotem komórkowym. Należy jednak zauważyć, że ich stężenia, jako zmienna ciągła, wymagają bardzo ostrożnej interpretacji z uwzględnieniem obrazu klinicznego i badań obrazowych oraz zmian w zapisach elektrokardiograficznych pacjenta, szczególnie w przypadku procedur wykonywanych na sercu. Innym problemem jest wybranie optymalnego momentu oznaczania stężeń troponin i właściwej interpretacji uzyskiwanych wyników. Wzrost troponin możemy obserwować już od 2 do 4 godziny po zadziałaniu czynnika uszkadzającego mięsień serca. Szczyt który obserwujemy między 6 a 12 godziną przy monitorowaniu pacjentów po zabiegach kardiochirurgicznych, z reguły związany jest z urazem chirurgicznym. Przedłużające się wysokie wartości, a szczególnie ciągły ich wzrost po 24 godzinach powinien kierować uwagę na możliwość wystąpienia zawału typu 5 [172].

Biorąc pod uwagę opisywane okna czasowe w których dochodzi do zmian stężeń troponin i CKMB, pozwalających na potwierdzenie lub wykluczenie powikłań okresu pooperacyjnego, w przedstawionym badaniu przeanalizowano kinetykę zmian ekspresji miRNA w tych właśnie przedziałach czasowych, a więc: przed rozpoczęciem krążenia pozaustrojowego (T0) – wartość wyjściowa oraz w godzinach: 3 (T3), 6 (T6), 12 (T12), 24 (T24) od początku reperfuzji. Taki wybór przedziałów czasowych pozwalał na porównanie czułości badanych miRNA (wcześniejszy wzrost ekspresji w odpowiedzi na uraz niedokrwienny i szybszy powrót do wartości wyjściowych przy uzyskaniu skutecznej reperfuzji) w odniesieniu do standardowych markerów uszkodzenia mięśnia serca.

6.1 MIRNA-499-5P

W badaniu obserwowano niewielką dynamikę zmian ekspresji miRNA-499-5p w całym okresie obserwacji. Charakteryzowała się ona początkowym wzrostem ekspresji w 3 godzinie reperfuzji, ze szczytem w godzinie 6, a następnie tendencją spadkową w 12 godzinie, wyraźnie potwierdzoną w 24 godzinie w grupie 2 – Propofol, w przeciwieństwie do utrzymujących się na zbliżonym poziomie wartości w grupie 1 – Sewofluran (Tabela 10). W każdym z badanych punktów czasowych zmiany te jednak nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej w poziomie ekspresji miRNA-499-5p, zarówno w grupach badanych, jak i między grupami (Tabela 10). Nie obserwowano również istotnej wzajemnej korelacji ze stężeniami troponin I w żadnym z badanych punktów czasowych. Stwierdzono natomiast słabą dodatnią korelację ($r = 0,343$, $p = 0,034$) z CKMB w 12 godzinie od początku reperfuzji, uwzględniając całą badaną populację chorych bez podziału na grupy. Należy jednak zwrócić uwagę na różnice w istotności statystycznej jakie wystąpiły między grupami. Grupa 2 – Propofol wykazywała silny poziom korelacji ($r = 0,663$, $p = 0,002$) w przeciwieństwie do grupy 1 – Sewofluran, w której nie zanotowano istotności statystycznej w korelacjach z CKMB. Zbliżony profil zmian ekspresji miRNA-499 z tendencją spadkową pod koniec obserwacji, opisywali Yang i wsp. w operacjach wymiany zastawek aortalnej i mitralnej [137]. W badaniu tym najwyższy poziom miRNA-499 był stwierdzany przed zabiegiem, nie zmieniał się istotnie statystycznie podczas okresu niedokrwienia związanego z klemowaniem aorty, a następnie wykazywał opisywaną wcześniej tendencję spadkową do poziomów poniżej wartości wyjściowej w 24 godzinie po zabiegu. Autorzy sugerowali, że zmiany ekspresji

miRNA-499 są związane bardziej z reperfuzją niż z samym urazem niedokrwiennym. Podobnie jak w naszym badaniu nie odnotowano korelacji miRNA-499 ze stężeniami troponin w badanych punktach czasowych. W badaniu Zi Wanga i wsp. [173], podobnie jak w naszych obserwacjach, poziom ekspresji miRNA-499 u pacjentów poddanych CABG nie ulegał istotnym zmianom, z tą różnicą, że te niewielkie zmiany korelowały istotnie ze zmianami stężeń badanej troponiny T. W ocenie autorów mogło to być związane z bardziej zaawansowanym stadium choroby niedokrwiennej serca u poddanych badaniu pacjentów, a więc ze zmianami odzwierciedlającymi gorszą kondycję mięśnia w postaci podwyższenia wyjściowego poziomu miRNA-499 u pacjentów przed operacją. Zbliżone obserwacje kinetyki zmian miRNA-499 opisali Pourrajab i wsp. oraz Khanaghaei i wsp. potwierdzając niższą ekspresję miRNA-499 w porównaniu z wartościami wyjściowymi w 4 dobie po zbiegach OPCAB, co interpretowano jako wynik skutecznej reperfuzji [174, 175]. Pomimo braku istotności statystycznej w naszym badaniu podobne trendy w postaci niższego poziomu ekspresji miRNA-499-5p w stosunku do wartości wyjściowych obserwowaliśmy w przypadku analizy ekspresji w grupie 2 – Propofol znacznie wcześniej bo już po 24 godzinach (Tabela 10). W cytowanych badaniach stężenia miRNA-499 korelowały ze zmianami stężeń troponiny I przed i po zabiegu.

Z kolei odmienne rezultaty analizy ekspresji miRNA-499 u pacjentów poddanych zabiegom CABG zarówno z użyciem jak i bez krążenia pozaustrojowego przedstawili Yao i wsp. Zwrócili oni uwagę na możliwość wykorzystania miRNA-499 jako wczesnego wskaźnika prognozującego zawał okołoperacyjny [136]. MiRNA-499 okazał się w tych badaniach czulszym i bardziej swoistym markerem od troponiny I, a zmiany ekspresji miRNA-499 wyprzedzały wzrost stężenia troponin. Gwałtowny wzrost ekspresji miRNA-499 obserwowano między pierwszą a trzecią godziną reperfuzji (w analizie stężeń troponiny I szczyt ten występował w 6 godzinie), z gwałtownym spadkiem w 6 godzinie i powrotem do wartości wyjściowych po 48 godzinach. Ponadto zaobserwowano silną korelację między wartościami szczytowymi miRNA-499 i troponiny I. Zmiany ekspresji miRNA-499 w czasie pozwalały na niezależne rozpoznanie pooperacyjnego zawału mięśnia serca z czułością 85,7% i swoistością 93,3%. Dla porównania troponina I, dla wartości odcięcia 2,98 ng/ml, miała czułość identyfikacji PMI tylko 64,3%, a swoistość 86,5%. Wyniki te wskazują, że we wczesnym okresie pooperacyjnym miRNA-499 może być potencjalnie bardziej czułym biomarkerem niż

troponina I w przewidywaniu wystąpienia PMI. Wartości miRNA-499 przed operacją w opisywanym badaniu istotnie dodatnio korelowały z frakcją wyrzutową serca badanych chorych. W badaniu tym zanotowano również istotnie mniejszą ekspresję miRNA-499 u pacjentów poddanych zabiegom OPCAB w porównaniu z grupą operowaną z użyciem CPB. Ten odmienny profil ekspresji miRNA-499, opisywany przez Yao i wsp. u pacjentów z rozpoznaniem PMI, odpowiadał obserwacjom zmian ekspresji u dwóch naszych pacjentów po zabiegach CABG wkląanych zawałem typu 5 [136].

Badając wzajemne zależności opisywanych miRNA we krwi zanotowaliśmy istotną wzajemną dodatnią korelację poziomów ekspresji miRNA-499-5p oraz miRNA-21-5p w większości analizowanych punktów czasowych (T0, T3, T6, T24), przy czym zwracały uwagę różnice w sile korelacji pomiędzy badanymi grupami pacjentów w poszczególnych punktach czasowych (Tabela 18, Tabela 19). W Grupie 1 – Sewofluran silna dodatnia korelacja występowała w punktach czasowych: T3 i T24, przy jednoczesnym jej braku w tych punktach czasowych w grupie 2 – Propofol (Tabela 18).

Odmienne prezentują się wzajemne korelacje w mięśniu prawego przedsionka. Poziomy ekspresji miRNA-499-5p przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego nie różnią się istotnie statystycznie (Tabela 15). W biopłatach prawego przedsionka pobranych przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego miRNA-499-5p nie wykazuje korelacji z miRNA-21-5p, ale za to silną dodatnią korelację z miRNA-1-3p i nieco słabszą z miRNA-133a-5p (Tabela 26). Po zakończeniu krążenia pozaustrojowego w trzeciej godzinie od początku reperfuzji miRNA-499-5p wykazuje dodatnią korelację z miRNA-1-3p i miRNA-133a-5p oraz pojawia się słaba wzajemna korelacja z miRNA-21-5p (Tabela 26).

Krążenie pozaustrojowe może wywoływać apoptozę kardiomiocytów w czasie operacji kardiochirurgicznych poprzez szereg mechanizmów, takich jak niedokrwienie, stres oksydacyjny po reperfuzji, kontakt krwi ze sztucznym materiałem kaniul i oksygenatora obwodu krążenia pozaustrojowego oraz związana z tym aktywacja cytokin prozapalnych [176].

MiRNA-499 kodowany przez gen łańcucha ciężkiego β -miozyny (*Myh7b*) należy do bardzo swoistych miRNA występujących w kardiomiocytach [177, 178]. Odgrywa on jedną z kluczowych ról w hamowaniu apoptozy kardiomiocytów. Liczne doniesienia wskazują raczej na jego związek z uszkodzeniem reperfuzyjnym mięśnia sercowego, a

nie z uszkodzeniem niedokrwiennym. MiRNA-499 hamuje apoptozę kardiomiocytów poprzez tłumienie defosforylacji białka związanego z dynaminą-1 (Drp1) za pośrednictwem kalcyneuryny, zmniejszając w ten sposób akumulację Drp1 w mitochondriach i aktywację programu rozszczepienia mitochondriów za pośrednictwem Drp1 [179,180]. Brak zmian ekspresji miRNA-499 w kardiomiocytach, przy jednocześnie wzmożonej ekspresji we krwi, może sugerować raczej jego czynne wydzielanie w formie egzosomów lub frakcji wolnej, niż bierne uwalnianie z martwych miocytów (jak to ma miejsce w zawale mięśnia serca) [180]. Należy również uwzględnić pozasercowe źródła uwalniania miRNA-499, np. mięśnie szkieletowe. Dotychczasowe doniesienia naukowe w tym zakresie nie są jednoznaczne. Nadal nie jest jasne, czy obniżony poziom ekspresji miRNA-499 po reperfuzji jest przyczyną czy konsekwencją uszkodzenia mięśnia sercowego.

6.2 MIRNA-133A-5P

Wyniki obserwacji kinetyki zmian ekspresji miRNA-133a-5p nie w pełni pokrywają się z wcześniejszymi doniesieniami naukowymi z uwagi na mniej wyrażone zmiany w profilu jego ekspresji. Wyraźne i istotne spadki ekspresji w stosunku do wartości wyjściowych odnotowano w 12 i 24 godzinie obserwacji (Tabela 12). Kinetyka zmian ekspresji w czasie w obu badanych grupach (grupa 1 – Sewofluran, grupa 2 – Propofol) była bardzo zbliżona (Tabela 12). W poszczególnych punktach czasowych nie występowały różnice istotne statystycznie w nasileniu ich ekspresji. W poddanych analizie wszystkich przypadkach (bez podziału na grupy) w przedziałach czasowych T0 i T3, miRNA-133a-5p wykazywał stały poziom ekspresji ze spadkiem w T6, ale różnice w tych przedziałach czasowych nie były istotne statystycznie ($p > 0.05$) w porównaniu z wartościami wyjściowymi (T0). Istotny spadek ekspresji w stosunku do wartości wyjściowych notowaliśmy w 12 i 24 godzinie reperfuzji (T12 – $p = 0,017$, T24 – $p = 0,005$). Także istotne statystycznie różnice w spadku ekspresji występowały pomiędzy pomiarami w punktach czasowych T3 a T12 ($p = 0,002$) oraz T3 a T24 ($p = 0,000$) oraz T6 a T24 ($p = 0,023$). Analizując zależność między zmianami ekspresji miRNA-133a-5p, a stężeniem troponin w 3 godzinie (T3) od przywrócenia krążenia zanotowaliśmy ich wzajemną ujemną korelację w ocenie całej badanej populacji ($r = -0,415$, $p = 0,018$). Korelacja ta jest wyraźniej zaznaczona w grupie 1 – Sewofluran ($r = -0,602$, $p = 0,01$) w odróżnieniu od grupy 2 – Propofol, w której istotności

statystycznej nie obserwowano. Ta ujemna korelacja, zgodnie z doniesieniami części ośrodków badawczych, może być wynikiem wcześniejszego uwalniania miRNA-133 z osiągnięciem maksymalnych wartości ekspresji we wczesnym okresie reperfuzy i rozpoczynającym się spadkiem w 3 godzinie i jeszcze wyraźniej obserwowanym w kolejnych godzinach jej trwania. W przypadku troponiny I w tym punkcie czasowym obserwujemy narastanie stężeń ze szczytem osiąganym dopiero w 6 godzinie reperfuzy. Potwierdza to po części badanie przeprowadzone przez Yao ze wsp. [136]. U pacjentów poddanych zabiegom CABG i OPCAB wzrost miRNA-133a następował już w 1 godzinie od początku reperfuzy ze szczytem w 3 godzinie (wyprzedzający szczyt wzrostu poziomu troponiny I), z gwałtowną tendencją spadkową w 6 godzinie, co jest po części zgodne z naszymi obserwacjami. Ekspresja miRNA-133a była podwyższona w mniejszym stopniu niż miRNA-499. Ponadto stwierdzono, że miRNA-133a wykazywał 89,3% czułość i 67,4% swoistość w identyfikacji PMI, w porównaniu z cTnI, które miało czułość 64,3% i swoistość 86,5% dla wartości odcięcia 2,98 ng./ml. Obydwa markery wykazywały także pozytywną wzajemną korelację w badanych punktach czasowych. Mogłoby to sugerować, że miRNA-133a potencjalnie lepiej odzwierciedla rozległość uszkodzenia mięśnia sercowego w porównaniu z troponiną I. Autorzy wykazali, podobnie jak w przypadku miRNA-499, dodatnią korelację między poziomem ekspresji miRNA-133a przed zabiegiem a frakcją wyrzutową lewej komory. W innym badaniu Zi Wanga i wsp. również wykazano, że po operacji CABG u 27 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym poziom miRNA-133a istotnie wzrósł i był związany ze zmianami stężeń cTnT, dodatkowo pozytywnie korelował ze stężeniem IL 6. Badane miRNA nie wykazało jednak związku z LVEF, będącym czynnikiem prognostycznym ewentualnej niewydolności serca [173].

Interesujące wnioski, na podstawie oceny potencjału krążących egzosomów i krążącego wolnego miRNA-133 jako biomarkerów uszkodzenia serca u pacjentów poddawanych operacji CABG, wyciągnęli Emanuelli i wsp. [181]. Krążące egzosomy i zawarty w nich ładunek miRNA oraz wolne miRNA krążące w całym osoczu zostały porównane ze złotym standardem, jakim jest troponina I. Wyniki pracy wykazały wzrost miRNA-133a w 24 godziny po operacji CABG. Stężenie egzosomalnego miRNA-133a wzrastało zarówno w 24 jak i 48 godzinie po operacji CABG. W badaniu tym wolny miRNA-133a w pełnej krwi nie korelował jednak istotnie ze stężeniami cTnI. Natomiast dodatnią korelację odnotowano z poziomami egzosomów w osoczu i zawartych w nich

egzosomalnych miRNA-133a. Wolne miRNA, podobnie jak w naszym badaniu, po 24 godzinach od początku reperfuzji nie korelowało ze stężeniami troponiny I. Wspomniani autorzy podkreślają, że właśnie krążące egzosomy i zawarte w nich miRNA, a nie wolne miRNA krążące w osoczu, mogą być przydatne jako biomarkery kliniczne u pacjentów poddawanych procedurze CABG [181]. Obserwacje ekspresji miRNA-133a u pacjentów po przeszczepie serca przeprowadzili Wang i wsp. W czternastodniowej obserwacji siedmiu pacjentów po HTX oceniali oni wydolność wszczepionych graftów, między innymi poprzez analizę ekspresji miRNA-133a. Potwierdzono jego istotną korelację z troponiną I oraz z klinicznymi wskaźnikami oceny hemodynamicznej (CVP, PCWP, CO), koniecznością wspomagania inotropowego i wazopresyjnego, potrzebą przedłużonej wentylacji i hospitalizacji w OIT. W badaniu tym wszystkie oceniane miRNA, w tym miRNA-133a okazały się użyteczne jako wskaźniki o wysokiej czułości i swoistości w prognozowaniu zaburzeń w funkcjonowaniu wszczepionych graftów, będących wynikiem zarówno urazów zimno-niedokrwiennego i niedokrwienno-reperfuzyjnego towarzyszących procedurom HTX [182].

Istnieje również szereg doniesień wskazujących na możliwość wykorzystania miRNA-133a w monitorowaniu nasilenia reakcji zapalnej. Wyniki tych badań wykazywały dodatnią korelację miRNA-133 przede wszystkim z IL-6, ale także innymi markerami zapalenia, takimi jak IL-8, CRP i TNF- α [173, 183].

W naszym badaniu podjęliśmy próbę oceny zależności badanych miRNA od jednego z markerów stanu zapalnego – prokalcytoniny. Z analizowanych przez nas miRNA tylko miRNA-133a wykazywał ujemną istotną statystycznie korelację ze stężeniami prokalcytoniny po 24 godzinach od początku reperfuzji. ($r = -0,499$, $p = 0,003$) w całej poddanej badaniu populacji bez podziału na grupy.

Analiza wzajemnych korelacji miRNA-133a-5p z pozostałymi badanymi miRNA wykazała słabą ujemną korelację w krwi pełnej w punkcie czasowym T0 z miRNA-499-5p (w analizie całej badanej populacji pacjentów) oraz słabą dodatnią korelację z miRNA-1-3p (Tabela 21). W szóstej godzinie reperfuzji nastąpiło odwrócenie tego trendu – wystąpiła ujemna korelacja z miRNA-1-3p (Tabela 20, Tabela 21) oraz pojawiła się dodatnia korelacja z miRNA-21-5p (Tabela 20, Tabela 21) z zaznaczoną różnicą między badanymi grupami znieczulenia – silna w grupie 2 – Propofol, przy braku istotności statystycznej w grupie 1 – Sewofluran (Tabela 20). W mięśniu prawego

przedsionka poziomu ekspresji przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego nie wykazywały różnic istotnych statystycznie (Tabela 16). MiRNA-133a-5p przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego wykazywał dodatnią istotną statystycznie korelację z miRNA-499-5p i miRNA-1-3p (ograniczoną do grupy 1 – Sewofluran) oraz nie korelował istotnie statystycznie z miRNA-21-5p. Po odłączeniu krążenia pozaustrojowego miRNA-133a-5p korelował dodatnio z pozostałymi badanymi miRNA, z tym że korelacja z miRNA-21-5p także ograniczała się do grupy 1 – Sewofluran (Tabela 27).

6.3 MIRNA-1-3P

Profil i dynamika zmian ekspresji miRNA-1-3p nie odbiegała od opisywanych w literaturze. Ekspresja miRNA-1-3p obniżyła się w stosunku do wartości wyjściowych (T0) w 3 godzinie (T3), a następnie nieznacznie wzrosła w 6 godzinie (T6) od początku reperfuzji. Zmiany te jednak nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). Dopiero w kolejnych punktach czasowych T12 ($p = 0,004$) i T24 ($p = 0,032$) ulegała ona obniżeniu istotnemu statystycznie w stosunku do wartości wyjściowych (T0). Nie zanotowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji miRNA pomiędzy badanymi grupami w porównywanych punktach czasowych (Tabela 11). Nie stwierdzono korelacji ze stężeniami troponiny I i CKMB w żadnym punkcie czasowym. MiRNA-1-3p wykazywał słabą dodatnią korelację z miRNA-133a-5p przed zabiegiem operacyjnym (Tabela 22, Tabela 23).

Ekspresja miRNA-1-3p nie różniła się istotnie statystycznie przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego w ocenie aktywacji w mięśniach przedsionków (Tabela 14). W mięśniu prawego przedsionka ekspresja miRNA-1-3p przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego dodatnio korelowała z miRNA-499-5p i miRNA-133a-5p oraz nie korelowała istotnie statystycznie z aktywnością miRNA-21-5p. Po zakończeniu krążenia pozaustrojowego miRNA-1-3p dodatnio korelował ze wszystkimi badanymi miRNA (Tabela 28).

Obserwowany profil kinetyki miRNA-1 jest zbieżny z doniesieniem Yanga i wsp. [137]. W grupie 15 pacjentów poddanych operacjom zastawkowym obserwowano wczesny wzrost miRNA-1 już po 45 min od zaklemowania aorty, a więc jeszcze w okresie niedokrwienia, a następnie szczyt ekspresji po godzinie reperfuzji i spadek w ciągu 24

godzin. W badaniu naszym kolejna analiza dokonywana była w 3 godzinie reperfuzji, a więc teoretycznie już po zakładanym szczycie ekspresji opisywanym przez Yanga i wsp. W badaniu tym poziomy ekspresji miRNA-1-3p pozytywnie korelowały ze stężeniami CKMB i troponiny I we wszystkich przedziałach czasowych. Zi Wang i wsp. także potwierdzili wzrost miRNA-1 u pacjentów z ACS po zabiegu CABG, nie korelował on jednak z stężeniami troponin, podobnie jak w naszym badaniu [173]. Emanuela i wsp. wykazali wzrost miRNA-1 po operacji, i to zarówno całkowitego jak i egzosomalnego. Jednak tylko ten ostatni korelował pozytywnie ze stężeniami troponiny I [183]. Przedstawione doniesienia, podobnie jak wyniki naszych badań, mogą sugerować, że kinetyka zmian ekspresji miRNA-1 i jego wczesne uwalnianie ma raczej związek z urazem niedokrwiennym niż procesami zachodzącymi w trakcie reperfuzji.

6.4 MIRNA-21-5P

Badania przydatności miRNA-21-5p w ocenie urazu niedokrwiennie-reperfuzyjnego po zabiegach na otwartym sercu podjęło się niewiele ośrodków. Pojawiające się dane wskazują na potencjalną rolę miRNA-21-5p w procesie przebudowy mięśnia serca (remodeling elektryczny i strukturalny) w przebiegu niewydolności serca o etiologii niedokrwiennie-reperfuzyjnej oraz na możliwość wykorzystania miRNA-21-5p jako predyktora wystąpienia pooperacyjnego migotania przedsionków. Pooperacyjne migotanie przedsionków jest bardzo częstym rodzajem arytmii dotyczącym pacjentów poddawanych zabiegom na sercu. Wiąże się ono często z koniecznością przedłużonej hospitalizacji pacjentów, podwyższonym wskaźnikiem zachorowalności i śmiertelności w okresie obserwacji dziesięcioletniej [184, 185, 186].

Remodeling strukturalny mogący sprzyjać wystąpieniu migotania przedsionków, (w którym jedną z ważniejszych ról odgrywa między innymi miRNA-21) polega na niekorzystnej regulacji genów, które kodują białka odpowiedzialne za tworzenie i strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej (szlak kinaz białkowych aktywowanych mitogenami), co sprzyja procesowi zwłóknienia przedsionków. Dodatkowo w skutek hamującego wpływu miRNA-21 na ekspresję kanałów wapniowych typu L dochodzi do zwolnienia w nich przewodnictwa i wzrostu odkomórkowego prądu potasowego. Wtórnie prowadzi to do zmniejszenia prędkości przewodzenia w przedsionkach oraz utrwalenia utworzonych patologicznych pętli krążenia nawrotnego [167, 168].

Badając całą populację biorącą udział w badaniu nie wykazaliśmy istotnych statystycznie różnic między grupami w ekspresji miRNA-21-5p w poszczególnych punktach czasowych (Tabela 13). Istotny statystycznie wzrost ekspresji miRNA-21-5p ($p = 0,000$), dla obu badanych grup, wyprzedzający wzrost stężenia troponin I obserwowaliśmy już w 3 godzinie (T0 – T3) reperfuzji, ze szczytem w godzinie szóstej ($p = 0,002$), a następnie istotną statystycznie tendencją spadkową między 6 a 12 godziną (T6 – T12, $p = 0,000$) i znacznie słabiej wyrażoną między 12 a 24 godziną ($p > 0,05$) od przywrócenia przepływu wieńcowego. W punkcie czasowym T24 ponownie uwidacznia się tendencja wzrostowa poziomu ekspresji w stosunku do wartości wyjściowych ($p = 0,014$). Tylko w badanej grupie 2 – Propofol ekspresja miRNA-21-5p w 12 godzinie od początku reperfuzji istotnie dodatnio korelowała ze stężeniem troponiny I ($r = 0,524$, $p = 0,045$).

Analiza, we krwi pełnej poziomu ekspresji miRNA-21-5p, w stosunku do pozostałych miRNA, wykazała jego istotną statystycznie dodatnią wzajemną korelację z miRNA-499-5p w punktach czasowych odpowiednio T0, T3, T6, T24 W 3 i 24 godzinie reperfuzji obserwowana korelacja była silna w grupie 1 – Sewofluran przy braku istotnej statystycznie korelacji w tych punktach czasowych w grupie 2 – Propofol. MiRNA-21-5p wykazywał także dodatnią korelację z miRNA-133a-5p w 6 godzinie reperfuzji. W żadnym z punktów czasowych nie korelował istotnie statystycznie z miRNA-1-3p (Tabela 24, Tabela 25).

W materiale pobranym z biopsji mięśnia przedsionków nie stwierdzono żadnej korelacji miRNA-21-5p przed rozpoczęciem krążenia pozaustrojowego z pozostałymi badanymi miRNA. Wzajemną dodatnią korelację ze wszystkimi pozostałymi miRNA (miRNA-1-3p, miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p) stwierdzono natomiast po zakończeniu krążenia pozaustrojowego (Tabela 29). Uwagę zwracają różnice występujące w grupach znieczulenia. Istotne statystycznie dodatnie korelacje, z miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p, po odłączeniu krążenia pozaustrojowego, występowały tylko w grupie 1 – Sewofluran (Tabela 29).

W analizie biopsji mięśnia prawego przedsionka zanotowano istotny statystycznie spadek ekspresji miRNA-21-5p po zakończeniu krążenia pozaustrojowego w stosunku do wartości wyjściowych (Tabela 17). Obserwowany spadek ekspresji w mięśniu przedsionka z jednoczesnym wzrostem ekspresji we krwi w krótkim okresie po rozpoczęciu reperfuzji można wiązać raczej z urazem mięśnia w wyniku manipulacji

chirurgicznych, niż z samym wpływem urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego. Odmienne od naszych obserwacji prezentowały się wyniki badań wspomnianej grupy badawczej pod kierownictwem Yanga. Nie zanotowali oni żadnych zmian ekspresji miRNA-21–5p istotnych statystycznie w badanych przedziałach czasowych [137]. Nishi i wsp. przedstawili badanie, w którym oceniano stopień ekspresji miRNA-21 w biopatach przedsionków u pacjentów z migotaniem przedsionków poddawanych operacjom na otwartym sercu. Najbardziej zaawansowany proces zwłóknienia pojawiał się u pacjentów z przetrwałym migotaniem przedsionków. Najwyższa była również w tej grupie ekspresja tkankowego miRNA-21. Natomiast osoczowa ekspresja miRNA-21 w tej grupie pacjentów była znacząco niższa niż u osób zdrowych w grupie kontrolnej [165]. Badania aktywacji miRNA u pacjentów z migotaniem przedsionków obejmowały nie tylko miRNA-21. Tsoporsis i in. przeprowadzili małe prospektywne badanie obejmujące 42 pacjentów i oceniające poziom ekspresji miRNA-1 i miRNA-133 w biopatach tkankowych z uszka prawego przedsionka oraz ich ekspresję we krwi żyłnej przed i po CABG [187]. W biopatach prawego przedsionka pacjentów, u których wystąpiło pooperacyjne migotanie przedsionków po CABG, w odróżnieniu od tych, którzy utrzymywali rytm zatokowy po operacji, tkankowa ekspresja miRNA-1 zwiększyła się istotnie, podczas gdy ekspresja miRNA-133a uległa istotnemu wyhamowaniu i negatywnie korelowała ze wskaźnikami apoptozy w mięśniu prawego przedsionka. W badaniu tym nie obserwowano natomiast żadnych statystycznie istotnych różnic w ekspresji obu miRNA w próbkach osocza pobranych przed i po CABG w żadnej z grup badanych (POAF vs. bez POAF).

U 6 pacjentów badanej przez nas grupy wystąpiło, w pierwszej dobie po zabiegu operacyjnym, napadowe migotanie przedsionków (po 3 przypadki w każdej z badanych grup). Przeprowadzono subanalizę ekspresji wszystkich badanych miRNA zarówno w pełnej krwi we wszystkich punktach czasowych, jak i w biopatach mięśnia prawego przedsionka pobranych przed i po zakończeniu CBP w grupie pacjentów z migotaniem przedsionków (6 przypadków) oraz bez tego powikłania (33 przypadki). W przeprowadzonych analizach statystycznych ROC, żaden jednak z analizowanych miRNA nie okazał się być istotnym predyktorem wystąpienia pooperacyjnego migotania przedsionków.

6.5 METODA ZNIECZULENIA A PROCES OCHRONY MIĘŚNIA SERCA PODCZAS OPERACJI REWASKULARYZACJI WIEŃCOWEJ

Analiza wyników nie wykazała różnic istotnych statycznie między grupami w poziomie ekspresji miRNA, jak również tradycyjnych markerów uszkodzenia mięśnia sercowego we wszystkich mierzonych przedziałach czasowych. Pytanie, czy wybór środka znieczulającego jest czynnikiem decydującym o wyniku operacji kardiologicznej intrygowało kilka pokoleń anestezjologów. Obie metody znieczulenia są powszechnie akceptowane w chirurgii serca, ponieważ zarówno sewofluran jak i propofol w wyniku aktywacji różnych, opisywanych na wstępie mechanizmów ochronnych, wykazują działanie kardioprotekcyjne, potwierdzone zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i klinicznych [188, 189]. Szereg jednak badań klinicznych oceniających wpływ metody znieczulenia na stężenia biomarkerów sercowych wskazywało na korzystniejszy wpływ anestetyków wziewnych w porównaniu z całkowitym znieczuleniem dożylnym [7, 190, 191, 192]. Sugerowano również zmniejszenie śmiertelności w grupie anestetyków wziewnych [193, 194, 195, 196]. Największe jednak ostatnio opublikowane badanie MYRIAD nie było w stanie wykazać różnicy w śmiertelności, ani w stężeniach biomarkerów sercowych dla anestetyków wziewnych w porównaniu z TIVA [196, 197]. Badania tego typu są trudne metodologicznie i napotykają na wiele problemów, które muszą uwzględniać różne uwarunkowania techniczne i farmakokinetyczne podczas krążenia pozaustrojowego, zarówno przy użyciu anestetyków wziewnych lub TIVA [7, 192, 198, 199].

Podobnie niejednoznaczne są wyniki badań uwzględniających analizę ekspresji różnych miRNA w dwóch opisywanych metodach znieczulenia. Wyniki badań Liu i wsp. u 36 pacjentów poddanych zabiegom OPCAB podzielonych na 2 grupy, w zależności od rodzaju znieczulenia (grupa TIVA z propofolem oraz znieczulenie wziewne z użyciem sewofluranu) w analizie standardowych markerów troponin I, CKMB, LDH oraz miRNA-499 i miRNA-208b wykazały ochronny efekt sewofluranu, który manifestował się niższymi poziomami ekspresji badanych miRNA. Tradycyjnie natomiast oznaczane markery uszkodzenia nie wykazały różnic między grupami [200].

6.6 WPŁYWU CZYNNIKÓW OPERACYJNYCH NA KINETYKĘ STĘŻEŃ TROPONINY I ORAZ EKSPRESJĘ BADANYCH MIRNA

Analiza zależności stężeń troponiny I od czasu trwania krążenia pozaustrojowego (CPB) wykazały ich wzajemną dodatnią korelację prawie we wszystkich badanych przedziałach czasowych niezależnie od badanej grupy (Tabela 30). W ocenie wpływu czasu zaklemowania aorty (ACC) na stężenia troponin I istotna statystycznie korelacja występowała w 3 godzinie (T3) i 12 godzinie (T12) reperfuzji. W 12 godzinie (T12) reperfuzji istotna statystycznie korelacja z czasem zaklemowania aorty występowała tylko w grupie 2 – Propofol (Tabela 30). Czas trwania reperfuzji istotnie statystycznie dodatnio korelował ze stężeniami troponin we wszystkich badanych przedziałach czasowych, ale tylko w badanej grupie 1 – Sewofluran (Tabela 30).

W analizie porównawczej wpływu czynników operacyjnych na kinetykę miRNA uzyskiwane wyniki wykazywały istotne różnice między grupami. Ekspresja miRNA-499–5p zawartego w biopatach pobranych z mięśnia prawego przedsionka po zakończeniu krążenia pozaustrojowego wykazywała silną dodatnią korelację z czasem zaklemowania aorty (ACC) w grupie 2 – Propofol ($r = 0,637$, $p = 0,003$), przy braku istotnej statystycznie korelacji w grupie 1 – Sewofluran ($p > 0,05$). Podobne zależności stwierdzono w ocenie miRNA-1–3p w mięśniu prawego przedsionka. Dość silna istotna korelacja z czasem zaklemowania aorty występowała w grupie 2 – Propofol ($r = 0,50$, $p = 0,029$), przy braku istotnej statystycznie zależności w grupie 1 – Sewofluran ($p > 0,05$). Te opisane, zarysowujące się korelacje w grupie 2 – Propofol i ich brak w grupie 1 – Sewofluran mogłyby wskazywać na skuteczniejszy ochronny efekt działania sewofluranu, manifestujący się brakiem istotnego wpływu czynnika uszkodzającego jakim jest wydłużenie czasu niedokrwienia, wyrażone poziomem ekspresji miRNA w mięśniu prawego przedsionka u pacjentów z grupy 1 – Sewofluran, bezpośrednio po zakończeniu krążenia pozaustrojowego. W grupie 2 – Propofol wpływ czasu niedokrwienia na poziomy ekspresji miRNA-499–5p i miRNA-1–3p wykazują wyraźną dodatnią korelację z czasem zaklemowania aorty, co może sugerować brak tak skutecznego mechanizmu ochronnego. Nie stwierdzono natomiast istotnych wzajemnych korelacji ekspresji miRNA-133a–5p i miRNA-21–5p z czasem zaklemowania aorty (ACC) w mięśniu prawego przedsionka.

Analiza wzajemnych korelacji miRNA we krwi pełnej z czasem niedokrwienia (ACC) w kolejnych punktach czasowych po odklepowaniu aorty przyniosła niejednoznaczne rezultaty. Ze wszystkich poddanych obserwacji miRNA tylko w przypadku miRNA-21-5p stwierdzono słabą dodatnią korelację z czasem zaklepowania aorty (ACC) w 6 godzinie od początku reperfuzji, ale wyłącznie w grupie 1 – Sewofluran (Tabela 34). Dodatkowo, w przypadku opisywanej kinetyki ekspresji miRNA-21-5p, interesujący jest fakt braku istotnego wpływu czasu niedokrwienia (ACC) na ekspresję tego miRNA w mięśniu prawego przedsionka bezpośrednio po incydencie niedokrwienia. Opisywany wcześniej spadek ekspresji w mięśniu prawego przedsionka pomimo incydentu niedokrwienia w postaci zaklepowania aorty (ACC), a jednocześnie wzrost ekspresji we krwi w kolejnych godzinach w okresie reperfuzji, może dodatkowo potwierdzać wysuniętą hipotezę wpływu manipulacji chirurgicznych (kaniulacja, dekaniulacja prawego przedsionka) na opisywaną kinetykę ekspresji miRNA-21-5p w naszym badaniu.

Analiza wpływu czasu reperfuzji na ekspresję badanych miRNA, w kolejnych punktach czasowych po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, także wykazała niejednoznaczne wyniki. Tylko w przypadku miRNA-133a-5p i to tylko w grupie 1 – Sewofluran czas reperfuzji istotnie statystycznie korelował ujemnie z miRNA-133a-5p w punktach czasowych T3 i T6. W przypadku pozostałych miRNA czas reperfuzji nie miał istotnego wpływu na ich ekspresję w okresie pooperacyjnym (Tabela 31, Tabela 32, Tabela 33, Tabela 34).

Analiza zależności wpływu czasu trwania krążenia pozaustrojowego (CBP) na ekspresję badanych miRNA we krwi pełnej, potwierdziła jego istotną statystycznie dodatnią korelację z miRNA-499-5p w 6 godzinie od początku reperfuzji, ale wyrażoną tylko w grupie 1 – Sewofluran (Tabela 31) oraz istotną statystycznie ujemną korelację miRNA-133a-5p w 24 godzinie reperfuzji, także występującą wyłącznie w grupie 1 – Sewofluran (Tabela 32). Czas trwania krążenia pozaustrojowego nie wpływał istotnie ($p > 0,05$) na poziom ekspresji pozostałych obserwowanych miRNA (miRNA-1-3p, miRNA-21-5p), niezależnie od badanej grupy i punktu czasowego (Tabela 33, Tabela 34).

Zmiany ekspresji miRNA występujące zarówno w okresie niedokrwienia jak i reperfuzji wydają się być związane z ich czynnym uwalnianiem przez komórki struktur

mięśnia sercowego. W przypadku niepowikłanych zabiegów na otwartym sercu, jakie poddaliśmy analizie w naszym badaniu zmiany te nie były mocno nasilone, o czym świadczyć mogą niewielkie zmiany ekspresji wybranych miRNA w mięśniu prawego przedsionka przy niewielkich, jednak zauważalnych zmianach profilu ekspresji we krwi pełnej. Brak wyraźnej, silnie zaznaczonych zmian w kinetyce ekspresji we krwi pełnej, jak również w biopsjach mięśnia prawego przedsionka może być wynikiem zarówno dość stabilnego w większości przypadków przebiegu okołoperacyjnego oraz uzyskaniem skutecznej reperfuzji mięśnia serca. Istotny wpływ na wynik operacji mają też standardowo podejmowane działania prewencyjne w trakcie CABG z użyciem CPB, takie jak zastosowanie regularnych, powtarzalnych dawek roztworów kardiopleginy, utrzymywanie odpowiedniego ciśnienia perfuzji w trakcie całego zabiegu, odpowiednia technika operacyjna, czy też stosowanie kontrolowanej reperfuzji. Uraz niedokrwiennie-reperfuzyjny w kardiologii jest zbyt złożony, aby można było go leczyć za pomocą jednej interwencji, takiej jak wybór schematu znieczulenia.

Wyniki postępowania okołoperacyjnego u pacjentów po operacjach kardiologicznych zależą bardziej od tego, jak anestezjolog wykorzystuje dostępne narzędzia, środki znieczulające, leki adiuwantowe i wazoaktywne do kontrolowania homeostazy tych pacjentów. Na ostateczny wynik mogą wpływać także inne czynniki, takie jak właściwa kontrola temperatury, hemostazy, zmian sercowo-naczyniowych, wentylacji mechanicznej znieczulanych pacjentów. Wybór schematu znieczulenia powinien również uwzględniać wyzwania techniczne i farmakokinetyczne ukierunkowane na profil pacjenta. Umiejętności anestezjologa są prawdopodobnie o wiele ważniejsze niż stosowane leki.

6.7 OGRANICZENIA PRACY

Badanie i oznaczenie miRNA jest trudne technicznie. Należy uwzględnić szereg czynników wpływających na jakość uzyskiwanych analiz i możliwości diagnostyczne miRNA. Nie tylko bierne uwalnianie wolnego miRNA z martwych lub uszkodzonych komórek, ale przede wszystkim ich czynne uwalnianie w postaci związanej z białkami, lipoproteinami oraz w egzosomach czy też ciałkach apoptycznych, może utrudniać wiarygodną ocenę ich ekspresji w układzie krążenia. Szczególnie może mieć to miejsce gdy analizie podlegają tylko wolne miRNA oznaczane w pełnej krwi. Pomimo, że krążące

miRNA wydają się być stabilne, to ich powtarzalna izolacja do materiału genetycznego o wysokiej czystości jest trudnym przedsięwzięciem technicznym z wielu powodów.

Głównym problemem jest bardzo mała ilość RNA znajdująca się w osoczu lub surowicy. Wydajność RNA z małej objętości osocza lub surowicy (zwykle poniżej 1 ml) spada poniżej granicy dokładnej kontroli jakości zwykłymi metodami. Po drugie, wysokie stężenie białek w osoczu lub surowicy może potencjalnie zakłócać przygotowanie próbki i przeprowadzenie testów wykrywających. Po trzecie, wpływ na uzyskiwane wyniki ma zjawisko hemolizy, które często ma miejsce w trakcie zabiegów z użyciem krążenia pozaustrojowego, a wynika z kontaktu krwinek ze sztucznymi materiałami drenów, oksygenatora, filtrów układu do krążenia pozaustrojowego, pracy pomp rolkowych, stosowania podciśnienia w układzie i odzyskiwania wyciekniętej krwi z pola operacyjnego. W przypadku tak wrażliwego materiału jakim są cząsteczki miRNA istotne znaczenie może mieć także nieodpowiednie pobieranie krwi do badania, co podkreślają producenci próbek ze stabilizatorami służących do przechowywania pobranego materiału genetycznego. W ten sposób uwolnione z rozpadających się krwinek miRNA mogą fałszować wyniki badania. W związku z tym konieczna jest ocena nasilenia hemolizy celem wykluczenia z badań zanieczyszczonych próbek [201, 202]. Unikanie zanieczyszczenia białkami i produktami lizy krwinek czerwonych w próbkach surowicy lub osocza jest bardzo ważnym elementem w realizacji badania. Ponadto, niektóre z rodzajów RNA często używanych jako geny referencyjne do normalizacji danych qPCR są także obecne w bardzo niskich stężeniach w badanej surowicy lub osoczu, co może wpływać na wyniki oznaczeń. Dlatego należy zachować dużą ostrożność przy ich wyborze do kontroli normalizacji [203]. Heparynizacja układu krążenia wymagana podczas krążenia pozaustrojowego także znacznie utrudnia badanie kinetyki miRNA. Hamujący wpływ heparyny na odwrotną transkrypcję i reakcję łańcuchową polimerazy przypisuje się bezpośredniej interakcji heparyny i polimeraz. Konieczne bywa ograniczenie pobierania badań do okresu pełnego odwrócenia działania heparyny, co i tak nie gwarantuje zadawalającego efektu [204, 205, 206, 207, 208].

Wymienione trudności oznaczania miRNA pojawiły się również w trakcie prezentowanego badania. Spowodowało to, że nie wszystkie pobrane próbki krwi nadawały się do obróbki i wiarygodnej analizy. Dokładne liczby próbek poddanych

analizie ekspresji miRNA w poszczególnych grupach i w określonych przedziałach czasowych przedstawiono szczegółowo w kolejnych tabelach (Tabela 9).

Kinetyka uwalniania miRNA do układu krążenia może mieć ważne implikacje kliniczne. W założeniach przedstawionych doniesień naukowych miRNA pełnią rolę wskaźników, umożliwiają ocenę stopnia nasilenia urazu niedokrwienno–reperfuzyjnego i związanego z tym zespołu ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej. Mogą odgrywać one kluczową rolę w diagnostyce okołoperacyjnego zawału mięśnia serca, w stratyfikacji ryzyka pooperacyjnych zaburzeń rytmu (nieme AF) oraz niewydolności serca we wczesnym okresie pooperacyjnym. Nasze badanie nie potwierdziło wcześniejszych doniesień o przewadze badanych miRNA w porównaniu z dotychczas stosowanymi markerami uszkodzenia serca w diagnostyce urazu niedokrwienno–reperfuzyjnego. Wykazana dynamika zmian ekspresji badanych miRNA w poszczególnych punktach czasowych we wczesnym okresie pooperacyjnym, potwierdza możliwość ich zastosowania jako markera. Należy jednak podkreślić, że zmiany w kinetyce uwalniania miRNA często nie osiągały wartości istotnych statystycznie oraz nie korelowały jednoznacznie z tradycyjnie stosowanymi markerami, a przede wszystkim charakterystyka kinetyki ich uwalniania nie różniła się w zasadniczy sposób od kinetyki troponin i CKMB. Brak różnic w ekspresji miRNA pomiędzy dwoma badanymi grupami pacjentów (przy założeniu, że mechanizm hartowania farmakologicznego w przypadku grupy 1 – Sewofluran powinien zmniejszyć nasilenie urazu niedokrwienno–reperfuzyjnego, a co za tym idzie, poziom markerów) może przemawiać za tym, że także w aspekcie czułości nie mają przewagi nad troponinami.

Oczywiście należy także podkreślić ograniczenia związane z naszym badaniem, takie jak liczba pacjentów, zbyt jednolita grupa chorych niskiego ryzyka. Ponadto należy zaznaczyć olbrzymi wpływ jaki mogą mieć na wiarygodność otrzymanych wyników opisywane trudności techniczne związane z izolacją i oznaczaniem ekspresji badanych miRNA, sposób pobierania, przechowywania i analizowania pobranych próbek krwi.

Badanie uzmysławia również, jak bardzo złożona jest odpowiedź organizmu na uraz chirurgiczny i CPB, co powoduje, że analiza i interpretacja obserwowanych wzajemnych zależności w tym doskonałym, lecz bardzo skomplikowanym systemie immunologicznym jest trudna i uświadamia nam jak bardzo wiele jest jeszcze do zrobienia. Zarówno przedstawione wyniki badań, jak i analiza doniesień ośrodków

naukowych dają pewną podstawę do kontynuowania prac nad zastosowaniem miRNA w diagnostyce powikłań okołoperacyjnych po zabiegach kardiochirurgicznych. Niestety skomplikowana i czasochłonna procedura izolacji i badania ekspresji miRNA, a przede wszystkim wysokie koszty takiego sposobu monitorowania pooperacyjnego wymagają dalszych analiz.

7 WNIOSKI

Przedstawiona ocena ekspresji wybranych cząsteczek mikro-RNA w operacjach chirurgicznej rewaskularyzacji naczyń wieńcowych z zastosowaniem różnych metod znieczulenia wykazała, że:

1. Dynamika zmian ekspresji badanych miRNA we krwi obwodowej przebiegała podobnie w całym czasie obserwacji, niezależnie od metody znieczulenia.
2. Dynamika zmian ekspresji miRNA-1-3p i miRNA-133a-5p monitorowana we krwi obwodowej u pacjentów badanej grupy ulegała istotnemu wyhamowaniu w późnym okresie reperfuzji, niezależnie od zastosowanej metody znieczulenia.
3. Krążenie pozaustrojowe powoduje wzrost ekspresji miRNA-21-5p monitorowanej we krwi obwodowej u pacjentów badanej grupy, z jej wczesnym wzrostem od 3 godziny reperfuzji.
4. Poziom ekspresji miRNA-499-5p monitorowany we krwi obwodowej nie zmienia się pod wpływem krążenia pozaustrojowego.
5. Profil ekspresji miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p i miRNA-21-5p w śródoperacyjnie pobieranych bioptatach mięśnia prawego przedsionka serca u pacjentów poddawanych rewaskularyzacji wieńcowej przebiegał podobnie, niezależnie od metody znieczulenia.
6. Krążenie pozaustrojowe powoduje istotny spadek ekspresji miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedsionka serca, u pacjentów poddawanych rewaskularyzacji wieńcowej, niezależnie od metody znieczulenia.
7. Okołooperacyjne zmiany stężeń markerów uszkodzenia mięśnia sercowego TnI i CKMB w surowicy korelowały w różnym czasie i z różnym nasileniem ze zmianami ekspresji miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p i miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedsionka serca oraz ich stężeniami we krwi obwodowej.
8. Uszkodzenie mięśnia sercowego monitorowane ekspresją wybranych miRNA, w badanej grupie operowanych chorych, nie wykazało przewagi nad standardowo oznaczonymi stężeniami Tn I i CKMB w surowicy.

8 PIŚMIENNICTWO

- 1) Zembala. M. Rejestr głównych operacji kardiologicznych w 2015 r. w poszczególnych rodzajach w Polsce (wg Krajowego Rejestru Operacji Kardiologicznych KROK, Warszawa, 2016). *Kardiochir Torakochirurgia Pol.* 2016; 13(2): 185-188.
- 2) Beręsewicz A. Krążenie wieńcowe i czynność serca. W: L.Giec(red.), *Choroba niedokrwienna serca*. PZWL. Warszawa. 1996; 32 – 49.
- 3) Beręsewicz A, Karwatowska-Kryńska E. Przemiany glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych w czasie wysiłku, niedotlenienia i niedokrwienia. *Kardiologia Polska.* 1979; 22: 323.
- 4) Beręsewicz A. Endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne – co to takiego i jak to działa? *Kardiologia Polska.* 2011; 69, supl. III: 59 – 66.
- 5) Gierc L. Choroba niedokrwienna serca. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa. 1996.
- 6) Gołba K, Widenka K, Mrozek R. Kardioprotekcja i kontrolowana reperfuzja w kardiologii. *Kardiologia Polska.* 1999; 51, 160 – 164.
- 7) De Hert SG, Meeus R, Stockman BA. Cardioprotective Properties of Sevoflurane in Patients Undergoing Coronary Surgery with Cardiopulmonary Bypass Are Related to the Modalities of Its Administration. *Anesthesiology.* 2004; 101(2): 299 – 310.
- 8) Symons JA, Myles PS. Myocardial protection with volatile anesthetic agent during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Br J Anaesth.* 2006; 97, 127 – 36.
- 9) Murry C, Jennings R, Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74: 1124 – 1136.
- 10) Wilczewski P, Poloński L. Hartowanie lub uodpornienie niedokrwienne, czyli preconditioning niedokrwienne – nowe zagadnienie w kardiologii. Cześć 2 – Badania kliniczne. *Wiadomości Lekarskie.* 2000; 53, 5 – 6, 341 – 345.
- 11) Przyklenk K, Klener RA. Preconditioning: a balanced perspective. *Br Heart.* 1995; 74: 575 – 577.

Z komentarzem [MW1]: Albo 2011, supl. III(69): 59 – 66, bez oficjalnych zasad nie zgodną, w książce w której to było ciężko powiedzieć bo jest supl2(1):1

Z komentarzem [MW2]: Sprawdzić jak wymienia się kilka fragmentów we wzorcu

- 12) Hagar JM, Hale SL, Kloner RA. Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res.* 1991; 68: 61–68.
- 13) Shihi K, Hearse DJ. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol.* 1987; 253: H1470 – H1476.
- 14) Liu L, Zhu J, Glass PSA et al. Age-associated changes in cardiac gene expression after preconditioning. *Anesthesiology.* 2009; 111: 1052 – 64.
- 15) Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi M et al. Ischemic preconditioning reduces troponin T release in patient undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart.* 1997; 77: 314 – 318.
- 16) Wilczewski P, Poloński L. Zwiększanie odporności miocytów serca na niedokrwienie przy użyciu substancji farmakologicznie czynnych, czyli preconditioning farmakologiczny. *Wiadomości Lekarskie.* 2000; 53, 7 – 8, 449 – 453.
- 17) De Hert SG, ten Broecke PW, Mertens E et al. Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology.* 2002;97(1): 42 – 9.
- 18) Bowman R, Musters R, van Beek-Harmsen B et al. Reactiveoxygen species precede protein kinase C-delta activation independent of adenosine triphosphate-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology.* 2004; 100: 506 – 514.
- 19) Hausenloy D, Tsang A, Mocanu M et al. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases et reperfusion. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 2004; 288: H971 – H976.
- 20) Liu L, Zhu J, Glass PSA et al. Age-associated changes in cardiac gene expression after preconditioning. *Anesthesiology.* 2009; 111: 1052 – 64.
- 21) Tsutsumi YM, Kawaraguchi Y, Horikawa YT. Role of caveolin-3 and glucose transporter-4 in isoflurane-induced delayed cardiac protection. *Anesthesiology.* 2010; 112: 1136 – 1145.
- 22) Wilczewski P, Poloński L. Hartowanie lub uodpornienie niedokrwienne, czyli preconditioning niedokrwienno – nowe zagadnienie w kardiologii. Część 1 – Badania doświadczalne, proponowany mechanizm zjawiska. *Wiadomości Lekarskie.* 2000; 53, 3 – 4, 200 – 204.

- 23) De Hert Stefan G et al. Effect of propofol, desflurane and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology*. 2003; 99: 314 – 323.
- 24) Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the Myocardium: From Cellular Physiology to Clinical Cardiology. *Physiol Rev*. 2003; 83: 1113 – 1151.
- 25) Sommerschild HT, Kirkebøen KA. Preconditioning - endogenous defence mechanisms of the heart. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2002; Feb;46(2): 123 – 37.
- 26) Murphy GS, Szokol JW, Marymont JH et al. Morphine based cardiac anesthesia provides superior early recovery compared to fentanyl in elective cardiac surgery patients. *Anesth Analg*. 2009; 109: 311 – 319.
- 27) Murphy GS, Szokol JW, Marymont JH et al. Opioids and cardioprotection: the impact of morphine and fentanyl on recovery of ventricular function after cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2006; 20: 493 – 502.
- 28) Lemoine S, Zhu L, Massetti M et al. Continuous administration of remifentanyl and sufentanyl induces cardioprotection in human myocardium, in vitro. *Acta Anaesthesiol. Scand*. 2011; 55: 758 – 764
- 29) Kokita, N, Hara A. Propofol attenuates hydrogen peroxide-induced mechanical and metabolic derangements in the isolated rat heart. *Anesthesiology*. 1996; 84: 117 – 127.
- 30) Xia ZY, Godin DV, Chang TKH et al. Dose-dependent protection of cardiac function by propofol during ischemia and early reperfusion in rats: effects on 15-F-2t-isoprostane formation. *Can. J. Physiol. Pharm*. 2003; 81: 14 – 21.
- 31) Vasileiou I, Xanthos T, Koudouna E et al. Propofol: a review of its non-anaesthetic effects. *Eur. J. Pharmacol*. 2009; 605: 1 – 8.
- 32) Li WG, Zhang Y, Liu YR et al. In vitro kinetic evaluation of the free radical scavenging ability of propofol. *Anesthesiology*. 2012; 116: 1258 – 1266.
- 33) Hanouz JL, Yvon A, Flais F et al. Propofol decreases reperfusion-induced arrhythmias in a model of “border zone” between normal and ischemic-reperfused guinea pig myocardium. *Anesth. Analg*. 2003; 97: 1230 – 1238.
- 34) Ko SH, Yu CW, Lee SK et al. Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Anesth. Analg*. 1997; 85: 719 – 724.

- 35) Jin YC, Kim W, Ha YM et al. Propofol limits rat myocardial ischemia and reperfusion injury with an associated reduction in apoptotic cell death in vivo. *Vasc. Pharmacol.* 2009; 50: 71 – 77.
- 36) Gravning J, Kjekshus J. The perfect biomarker in acute coronary syndrome: a challenge for diagnosis and treatment. *Eur. Heart J.* 2008; 29: 2827 – 2828.
- 37) Śpiewak M, Kruk M. Nowe metody w diagnostyce i terapii. Biomarkery w ostrych zespołach wieńcowych. *Post. Kardiol.Interw.* 2008; 14: 183 – 187.
- 38) Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the Assessment of Novel Cardiovascular Biomarkers. *Circulation.* 2007; 115: 949 – 952.
- 39) Ladue JS, Wroblewski F, Karmen A. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science.* 1954; Sep 24;120(3117): 497 – 9.
- 40) The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined – A con-sensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J.* 2000; 21: 1502 – 1513.
- 41) Wraga M, Figiel Ł, Kasprzak JD. Markery niedokrwienia i martwicy mięśnia sercowego stan obecny i perspektywy na przyszłość. *Kardiologia po Dyplomie.* 2010; 9(10): 55 – 73.
- 42) Djakpo DK, Wang ZQ, Shrestha M. The significance of transaminase ratio (AST/ALT) in acute myocardial infarction. *Arch Med Sci Atheroscler Dis.* 2020; 5: e279 –e283.
- 43) Moon J, Kang WC, Oh PC et al. Serum transaminase determined in the emergency room predicts outcomes in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction who undergo primary percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol.* 2014; 177: 442–7.
- 44) Lofthus DM, Stevens SR, Armstrong PW et al. Pattern of liver enzyme elevations in acute ST-elevation myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2012; 23: 22 – 30.
- 45) Jialal I, Sokoll LJ. Clinical utility of lactate dehydrogenase: a historical perspective. *Am J Clin Pathol.* 2015; Feb;143(2): 158 – 9.
- 46) Schneider KW, Lehmann FG. The enzymatic diagnosis of myocardial infarction. I. The activity of glutamic oxaloacetic transaminase, of lactate dehydrogenase, of

- alpha-hydroxybutyrate dehydrogenase and creatine phosphokinase in myocardial infarction. *Enzymol Biol Clin (Basel)*. 1966; 6(1): 25 – 35.
- 47) Emdin M, Passino C, Michelassi C et al. Prognostic value of serum gamma-glutamyl transferase activity after myocardial infarction. *European Heart Journal*. 2001; 22: 1802 – 1807.
 - 48) Lee DH, Silventoinen K, Hu G et al. Serum gamma-glutamyltransferase predicts non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease among 28 838 middle-aged men and women. *Eur. Heart J*. 2006; 27: 2170 – 2176.
 - 49) Meisinger C, Döring A, Schneider A et al. Serum gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident coronary events in apparently healthy men from the general population. *Atherosclerosis* 2006; 189: 297 – 302.
 - 50) Mair J, Artner-Dworzak E, Lechleitner P et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction by a newly developed rapid immunoturbidimetric assay for myoglobin. *Br Heart J*. 1992; Nov;68(5): 462 – 8.
 - 51) Danese E, Montagnana M. An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann Transl Med*. 2016; 4(10): 194.
 - 52) Ay MO, Erenler AK, Dogan T et al. Diagnostic value of copeptin in acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017; 21(7): 1576 – 1582.
 - 53) Rabitzsch G, Mair J, Lechleitner P et al. Immunoenzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury. *Clin Chem*. 1995; 41(7): 966 – 978.
 - 54) Hayashida K, Kume N, Murase T et al. Serum soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels are elevated in acute coronary syndrome: a novel marker for early diagnosis. *Circulation*. 2005; Aug 9;112(6): 812 – 8.
 - 55) Kume N, Mitsuoka H, Hayashida K et al. Soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1) as a sensitive and specific biomarker for acute coronary syndrome--comparison with other biomarkers. *J Cardiol*. 2010; Sep;56(2):159 – 65.
 - 56) De Lemos JA, Marrow DA, Bentley JH et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med*. 2001; 345: 1014 – 1021.
 - 57) Thygesen K, Mair J, Mueller C et al. Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care: a position statement from the Study Group on

Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care. *Eur Heart J.* 2012; 33: 2001 – 6.

- 58) Berton G, Cordiano R, Palmieri R, Pianca S, Pagliara V, Palatini P. C-reactive protein in acute myocardial infarction: association with heart failure. *Am Heart J.* 2003; 145(6): 1094 – 1101.
- 59) Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR Et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 417 – 424.
- 60) Doo Y, Kim DM, Oh DJ et al. Effect of betablockers on expression of interleukin-6 and C-reactive protein in patients with unstable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 2001; 88: 422 – 424.
- 61) Gurumurthy P, Borra SK, Yeruva RK et al. Estimation of ischemia modified albumin (IMA) levels in patients with acute coronary syndrome. *Indian J Clin Biochem.* 2014; 29(3): 367 – 371.
- 62) Kabekkodu SP, Mananje SR, Saya RP. A Study on the Role of Heart Type Fatty Acid Binding Protein in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *J Clin Diagn Res.* 2016; Jan;10(1):OC07-10.
- 63) Sotoudeh Anvari M, Karimi M, Shafiee A et al. Complementary diagnostic value of heart type fatty acid-binding protein in early detection of acute myocardial infarction. *Crit Pathw Cardiol.* 2018; 17(1): 43 – 46.
- 64) Ravkilde J. Creatine kinase isoenzyme MB mass, cardiac troponin T, and myosin light chain isotype 1 as serological markers of myocardial injury and their prognostic importance in acute coronary syndrome. *Dan Med Bull.* 1998; Feb;45(1): 34 – 50
- 65) Hillis GS, Taggart P, Wardlaw D et al. The relative utility of cardiac troponin I, creatine kinase-MBmass, and myosin light chain-1 in the long-term risk stratification of patients with chest pain. *Clinical Cardiology.* 2003; 26(3): 147 – 152.
- 66) Ravkilde J, Nissen H, Hørder M et al. Independent prognostic value of serum creatine kinase isoenzyme MB mass, cardiac troponin T and myosin light chain levels in suspected acute myocardial infarction. Analysis of 28 months of follow-up in 196 patients. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 25(3): 574 – 81,

- 67) Ravkilde J, Bøtker HE, Søgaard P et al. Human ventricular myosin light chain isotype 1 as a marker of myocardial injury. *Cardiology*. 1994; 84: 135 – 144.
- 68) Winter MP, Wiesbauer F, Alimohammadi A et al. Soluble galectin-3 is associated with premature myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2016; 46(5): 386 – 391.
- 69) Lippi G, Mattiuzzi C, Cervellin G. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) for the early diagnosis of myocardial infarction: more doubts than certainties. *Indian Heart J*. 2012; 64(6): 625 – 626.
- 70) Peacock WF, Nagurny J, Birkhahn R et al. Myeloperoxidase in the diagnosis of acute coronary syndromes: the importance of spectrum. *Am Heart J*. 2011; 162(5): 893 – 9.
- 71) Lee R. Preanalytic considerations for using plasma myeloperoxidase as a biomarker in acute coronary syndrome. *Am Heart J*. 2012; 163(5): e39 – 40; author reply e41
- 72) Gustapane M, Cardillo MT, Biasillo G et al. Myeloperoxidase as possible diagnostic and prognostic marker of acute coronary syndrome. *Recenti Prog Med*. 2011; Nov;102(11): 447 – 50.
- 73) Blum A, Kaplan G, Vardinon N et al. Serum amyloid type A may be a predictor of restenosis. *Clin.Cardiol*. 1998; 21: 655 – 658.
- 74) Wollert KC, Kempf T, Peter T, et al. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007; Feb 27;115(8):962 – 71
- 75) Ohkawa R, Kurano M, Sakai N et al. Measurement of plasma choline in acute coronary syndrome: importance of suitable sampling conditions for this assay. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 4725.
- 76) Body R, Griffith CA, Keevil B et al. Choline for diagnosis and prognostication of acute coronary syndromes in the Emergency Department. *Clin Chim Acta*. 2009; 404(2): 89 – 94.
- 77) Woźnicka AK, Brzostowicz M, Karolko B et al. Role of ST2 in cardiovascular diseases. *Folia Cardiologica*. 2016;11(4) #44589 HTML
- 78) Galeone A, Lessana A, Mascolo E et al. Interleukin-1 receptor-related protein ST2 and mitral valve repair outcome in patients with chronic degenerative mitral regurgitation. *Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2014; 62: 47 – 51.

Z komentarzem [MW3]: Przypis skopiowany z sieci bo oryginal był trudny do korektydoi: 10.1016/j.ahj.2011.08.017.

Z komentarzem [MW4]: Do sprawdzenia bo artykuł ma 2 strony, 41 musiałaby być osobnym przypisem

Z komentarzem [MW5]: Wg wzorca dla stron ww poprawiłem żeby było podobnie jak w reszcie ale nie mogę znaleźć oryginału

- 79) Ciccone MM, Cortese F, Gesualdo M et al. A novel cardiac bio-marker: ST2: a review. *Molecules*. 2013; 18: 15314 – 15328.
- 80) Doo Y, Kim DM, Oh DJ et al. Effect of betablockers on expression of interleukin-6 and C-reactive protein in patients with unstable angina pectoris. *Am. J. Cardiol*. 2001; 88: 422 – 424.
- 81) Kaptoge S, Seshasai SR, Gao P et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *Eur Heart J*. 2014; 35(9): 578 – 589.
- 82) Yang C, Deng Z, Li J et al. Meta-analysis of the relationship between interleukin-6 levels and the prognosis and severity of acute coronary syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021; 76: e2690.
- 83) Åkerblom A, James SK, Lakic TG et al. Interleukin-18 in patients with acute coronary syndromes. *Clin Cardiol*. 2019; 42(12): 1202 – 1209.
- 84) Mason PJ, Chakrabarti S, Albers AA et al. Plasma, serum, and platelet expression of CD40 ligand in adults with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2005; 96(10): 1365 – 9.
- 85) Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V et al. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Ann Med*. 2011; 43(5): 331 – 40.
- 86) Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA*. 2005; 294: 1799 – 1809.
- 87) Latini R, Maggioni AP, Peri G et al.; Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN) Investigators. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004; 110: 2349 – 2354.
- 88) Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M et al. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000; 101: 2149 – 2153. doi: 10.1161/01.CIR.101.18.2149
- 89) Mourouzis K, Oikonomou E, Siasos G et al. Pro-inflammatory Cytokines in Acute Coronary Syndromes. *Curr Pharm Des*. 2020; 26(36): 4624 – 4647.
- 90) Wraga M, Figiel Ł, Kasprzak JD. Markery niedokrwienia i martwicy mięśnia sercowego stan obecny i perspektywy na przyszłość. *Kardiologia po Dyplomie*. 2010; 9(10): 55 – 73.

- 91) Heeschen C, Dimmeler S, Fichtischerer S et al. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. *JAMA* 2004; 291: 435 – 441.
- 92) Vaananen HK, Syrjala H, Rakkila P et al. Serum carbonic anhydrase III and myoglobin concentrations in acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 1990; 36: 635 – 638.
- 93) Onofrio N, Servillo L, Balestrieri ML. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection. *Antioxid Redox Sign.* 2018; 28(8): 711 – 732.
- 94) Cai XY, Lu L, Wang YN et al. Association of increased S100B, S100A6 and S100P in serum levels with acute coronary syndrome and also with the severity of myocardial infarction in cardiac tissue of rat models with ischemia-reperfusion injury. *Atherosclerosis.* 2011; 217: 536 – 42.
- 95) Kaier TE, Alaour B, Marber M. Cardiac myosin-binding protein C-from bench to improved diagnosis of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2019; 33: 221–30.
- 96) Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS et al, ESC Scientific Document Group. Fourth universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2019; 40: 237 – 269. doi: 10.1093/eurheartj/ehy462
- 97) Lang HW. Creatine kinase isoenzymes. Pathophysiology and clinical application. Springer-Verlag Berlin Heildeberg 1981; 1 – 3.
- 98) Andres J, Drwiła R, Kapelak B et al. Cardiac troponin T, CK-MB mass and myoglobin blood levels for diagnosis of postoperative myocardial infarction after coronary artery bypass graft surgery. *Abstract Book P06 8. The European Association of Cardiothoracic Anaesthesiologists Aarhus-Denmark 2000;*
- 99) Dąbrowska W. Komórka – jej budowa i ruch. W: Michajłowa W. i Hałonia E. (red.) *Najnowsze Osiągnięcia Nauki.* Warszawa 1987; 93 – 132
- 100) Bodor GS, Porterfield D, Voss EM et al. Cardiac troponin I is not expressed in fetal and healthy and diseased adult human and skeletal muscle tissue. *Clin. Chem.* 1995; 41:1710.
- 101) Zahler S, Massoudy P, Hartl H et al. Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res.* 1999; 41(3): 722 – 30.

Z komentarzem [MW6]: strony, nie mogę znaleźć w sieci

- 102) Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002; 21(2): 232 – 44.
- 103) te Velthuis H, Jansen PG, Oudemans-van Straaten HM et al. Myocardial performance in elderly patients after cardiopulmonary bypass is suppressed by tumor necrosis factor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 110(6): 1663 – 9.
- 104) Wan S, Yim AP, Wong CK et al. Expression of FHL2 and cytokine messenger RNAs in human myocardium after cardiopulmonary bypass. *Int J Cardiol.* 2002; 86(2–3): 265 – 72.
- 105) Alam SR, Stirrat C, Spath N et al. Myocardial inflammation, injury and infarction during on-pump coronary artery bypass graft surgery *Journal of Cardiothoracic Surgery.* 2017; 12: 115. DOI 10.1186/s13019-017-0681-6
- 106) van Gaal WJ, Arnold JR, Testa L et al. Myocardial injury following coronary artery surgery versus angioplasty (MICASA): a randomised trial using biochemical markers and cardiac magnetic resonance imaging. *EuroIntervention.* 2011; 6(6): 703–10.
- 107) Noora J, Ricci C, Hastings D et al. Determination of troponin I release after CABG surgery. *J Card Surg.* 2005; 20(2): 129–35.
- 108) Jeremias A. The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: Review of the current findings. *Vasc. Health Risk Manag.* 2010; 6: 691 – 699. doi: 10.2147/VHRM.S5306
- 109) Van Beek D, Van Zaane B, Looije M et al. Typical rise and fall of troponin in (peri-procedural) myocardial infarction: A systematic review. *World J. Cardiol.* 2016; 8: 293 – 301. doi: 10.4330/wjc.v8.i3.293
- 110) Alam SR, Stirrat C, Spath N et al. Myocardial inflammation, injury, and infarction during on-pump coronary artery bypass graft surgery. *J. Cardiothorac. Surg.* 2017; 12: 115. doi: 10.1186/s13019-017-0681-6].
- 111) Onorati F, De Feo M, Mastroroberto P et al. Determinants and prognosis of myocardial damage after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 2005; 79(3): 837 – 45.
- 112) Vikenes K, Andersen KS, Melberg T et al. Long-term prognostic value of cardiac troponin I and T versus creatine kinase-MB mass after cardiac surgery in low-risk

- patients with stable symptoms. *Am J Cardiol.* 2010; 106(6): 780-6. doi: 10.1016/j.amjcard.2010.04.038. Epub 2010 Aug 1. PMID: 20816117,
- 113) Croal BL, Hillis GS, Gibson PH et al. Relationship between postoperative cardiac troponin I levels and outcome of cardiac surgery. *Circulation.* 2006; 114(14): 1468–75.
- 114) Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet. Pathol.* 2013; 51: 759 – 774.
- 115) Hogg DR, Harries L. Human genetic variation and its effect on miRNA biogenesis, activity, and function. *Biochem. Soc. Trans.* 2014; 42: 1184 – 1189.
- 116) Weber JA, Baxter DH, Zhang S et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* 2010; 56: 1733-1741.
- 117) Lee Y, Kim M, Han J et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; 23: 4051 – 4060.
- 118) Ambros V. microRNAs: Tiny Regulators with Great Potential. *Cell.* 2001; 107: 823 – 826.
- 119) Bauersachs J, Thum T. Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs. *Circ. Res.* 2011; 109: 334 – 347.
- 120) Cullen BR. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 2004; 102: 3 – 9.
- 121) Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 2004; 15: 185 – 197.
- 122) Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 7716 – 7729.
- 123) Da Sacco L, Masotti A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of micrnas binding to 5' untranslated region. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012; 14: 480 – 495.
- 124) Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008; 455: 58 – 63.
- 125) Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: The next step. *Oncogene.* 2010; 29: 2161 – 2164.
- 126) Wang K, Zhang S, Weber J et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 7248 – 7259

Z komentarzem [MW7]: było wklejone z 118, ale to chyba osobny przypis

- 127) Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 5003 – 5008.
- 128) Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol*. 2011; 13: 423 – 433.
- 129) Fic P, Kowalczyk K, Grabarska A et al. Mikro-RNA – nowe szanse diagnostyczne w chorobie niedokrwiennej i zawale serca. *Postępy Hig Med. Dosw* (online); 2014, 68: 410 – 418.
- 130) Stachurska A, Stachurski P, Małecki M. MikroRNA w chorobach układu sercowo- naczyniowego. *Choroby serca i naczyń*. 2011; 8(3): 158 – 164.
- 131) Czajkowska A, Stachurska A, Małecki M. MikroRNA jako biomarker uszkodzenia mięśnia sercowego. *Czynniki Ryzyka*. 2011; 2: 3 – 9.
- 132) Miśkowiec D, Kasprzyk JD. Mikro-RNA jako nowe biomarkery chorób układu sercowo-naczyniowego? przegląd aktualnych doniesień. *Polski Przegląd Kardiologiczny*. 2013; 15(1): 69 – 72.
- 133) Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovascular Research*. 2008; 79(4): 562 – 570.
- 134) Zajkowska A, Kolsut P, Stachurska A. Circulating miRNA-208 and miRNA-208b as biomarker of myocardial injury in CABG patients. *Acta Biochim Pol*. 2012; 59 Suppl 3: 76.
- 135) Nishi H, Sakaguchi T, Miyagawa S et al. Impact of microRNA Expression in Human Atrial Tissue in Patients with Atrial Fibrillation Undergoing Cardiac Surgery. *PLoS ONE* 2013; 8(9): e73397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073397>
- 136) Yao Y, Du J, Cao X et al. Plasma levels of microRNA-499 provide an early indication of perioperative myocardial infarction in coronary artery bypass graft patients. *PLoS One*. 2014; 9(8): e104618. doi: 10.1371/journal.pone.0104618. PMID: 25111390; PMCID: PMC4128681.
- 137) Yang W, Shao J, Bai X et al. Expression of Plasma microRNA -1/21/208a/499 in Myocardial Ischemic Reperfusion Injury. *Cardiology* 2015; 130(4): 237 – 241.
- 138) Kukreja RC, Yin C, Salloum FN. MicroRNAs: New Players in Cardiac Injury and Protection. *Mol Pharmacol*. 2011; 80(4): 558 – 564.

- 139) Quiat D, Olson EN. MicroRNAs in cardiovascular disease: From pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest.* 2013; 123: 11 – 18.
- 140) Da Silva AMG, De Araujo JNG, De Oliveira KM et al. Circulating miRNAs in acute new – onset atrial fibrillation and their target mRNA network. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2018; 29: 1159 – 1166.
- 141) Chao Cheng et al. MiRNA as Biomarkers of Myocardial Infarction: A Meta-analysis. *PLOS ONE.* 2014; 9(2): e88566.
- 142) Corsten M, Dennert R, Jochems S et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010; 3: 499 – 506.
- 143) Wang G-K, Zhu J-Q, Zhang J-T et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 2010; 31(6): 659 – 666.
- 144) D’Alessandra Y, Devanna P, Limana F et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010; 31(22): 2765 – 2773.
- 145) Danowski N, Manthey I, Jakob HG et al. Decreased expression of miR-133a but not of miR-1 is associated with signs of heart failure in patients undergoing coronary bypass surgery. *Cardiology.* 2013; 125: 125 – 130.
- 146) Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & Development.* 2008; 22: 3242 – 3254.
- 147) Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2013; 14: 529 – 541.
- 148) Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature.* 2005; 436(7048): 214 – 220.
- 149) Zhao Y, Ransom JF, Li A et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell.* 2007; 129: 303 – 317.

- 150) Gui YJ, Yang T, Liu Q et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitors, t-AUCB, regulated microRNA-1 and its target genes in myocardial infarction mice. *Oncotarget* 2017; 8: 94635 – 94649.
- 151) Shi Q, Yang X. Circulating microRNA and long noncoding RNA as biomarkers of cardiovascular diseases. *Journal of Cellular Physiology*. 2016; 231: 751 – 755.
- 152) Cheng M, Yang J, Zhao X et al. Circulating myocardial microRNAs from infarcted hearts are carried in exosomes and mobilise bone marrow progenitor cells. *Nature Communications*. 2019; 10: 959.
- 153) Qian L, Huang Y, Spencer CI et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012; 485: 593 – 598.
- 154) Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*. 2012; 110: 1465 – 1473.
- 155) Jayawardena TM, Finch EA, Zhang L et al. MicroRNA induced cardiac reprogramming in vivo: Evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circ Res*. 2015; 116: 418 – 424.
- 156) Ikeda S, He A, Kong SW et al. MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Molecular and Cellular Biology* 2009; 29: 2193 – 2204.
- 157) Xu C, Lu Y, Pan Z et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J. Cell Sci*. 2007; 120: 3045 – 3052.
- 158) Gui YJ, Yang T, Liu Q et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitors, t-AUCB, regulated microRNA-1 and its target genes in myocardial infarction mice. *Oncotarget*. 2017; 8(55): 94635 – 94649.
- 159) Kim GH. MicroRNA regulation of cardiac conduction and arrhythmias. *Transl Res*. 2013; 161(5): 381 – 392.
- 160) Li YD, Hong YF, Yusufuaji Y et al. Altered expression of hyperpolarization – activated cyclic nucleotide-gated channels and microRNA-1 and -133 in patients with age – associated atrial fibrillation. *Mol Med Rep* 2015; 12: 3243 – 3248.
- 161) Girmatsion Z, Biliczki P, Bonauer A et al. Changes in micro-RNA 1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; 6: 1802 – 1809.

- 162) Su T, Shao X, Zhang X et al. Circulating microRNA-1 in the diagnosis and predicting prognosis of patients with chest pain: a prospective cohort study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2019; 19 (1): 5
- 163) Pinchi E, Frati P, Aromatario M et al. miR-1, miR-499 and miR-208 are sensitive markers to diagnose sudden death due to early acute myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* 2019; 23 (9): 6005 – 6016.
- 164) Cheng C, Wang Q, You W et al. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta- analysis. *PloS One.* 2014; 9(2): e88566.
- 165) Ai J, Zhang R, Li Y et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *BiochemBiophys Res Commun.* 2010; 391(1): 73 – 7.
- 166) Donga D, Yang B. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy, myocardial fibrosis and heart failure. *Acta PharmaceuticaSinica B.* 2011; 1: 1 – 7
- 167) Adam O, Lofhelm B, Thum T et al. Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Res Cardiol.* 2012; 107: 278.
- 168) Chaldoupi SM, Loh P, Hauer RN et al. The role of connexin40 in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2009; 84: 15 – 23.
- 169) Social Psychology Network – Urbaniak, GC, & Plous, S. (2013) <http://www.randomizer.org/> dostę: 17.10.2016.
- 170) Xiao J et al. Serum microRNA-499 and microRNA-208a as biomarkers of acute myocardial infarction. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7: 136 – 141.
- 171) Kuwabara Y et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011; 4: 446 – 454.
- 172) Van Beek D, Van Zaane B, Looije M et al. Typical rise and fall of troponin in (peri-procedural) myocardial infarction: A systematic review. *World J. Cardiol.* 2016; 8: 293– 301.
- 173) Zi Wang, BS, Xiaoye Li, MS et al. Plasma microRNAs reflecting cardiac and inflammatory injury in coronary artery bypass grafting surgery. *Journal of Surgical Research.* 2018; 224: 58 – 63.
- 174) Poourrajab F, Torkian Velashani F, Khanaghei M et al. Comparison of miRNA signature versus conventional biomarkers before and after off-pump coronary

- artery bypass graft. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017; 134: 11 – 17.
- 175) Khanaghaei M, Tourkianvalashani F, Hekmatimoghaddam S et al. Circulating miR-126 and miR-499 Reflect Progression of Cardiovascular Disease; Correlations with Uric Acid and Ejection Fraction. *Heart International*. 2016; 11(1): e1-e9.
- 176) Malmberg M, Parkka J, Vahasilta T et al. Cardiomyocyte apoptosis after cardioplegic ischemia: comparison to unprotected regional ischemia-reperfusion. *Eur Surg Res*. 2011; 46 (1): 19 – 25. 10.1159/000321875.
- 177) van Rooij E, Quiat D, Johnson BA et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*. 2009; 17 (5): 662 – 673. 10.1016/j.devcel.2009.10.013.
- 178) Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*. 2007; 8: 166. 10.1186/1471-2164-8-166.
- 179) Wang JX, Jiao JQ, Li Q et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*. 2011; 17 (1): 71 – 78. 10.1038/nm.2282.
- 180) Kovacevic M, Simic O, Jonjic N et al. Apoptosis and cardiopulmonary bypass. *J Card Surg*. 2007; 22 (2): 129 – 134. 10.1111/j.1540-8191.2006.00355.x.
- 181) Emanuelli C, Shearn AIU, Laftah A et al. Coronary Artery-Bypass-Graft Surgery Increases the Plasma Concentration of Exosomes Carrying a Cargo of Cardiac MicroRNAs: An Example of Exosome Trafficking Out of the Human Heart with Potential for Cardiac Biomarker Discovery. *PLoS ONE*. 2016; 11: e0154274. doi: 10.1371/journal.pone.0154274
- 182) Wang E, Nie Y, Zhao Q et al. Circulating miRNAs reflect early myocardial injury and recovery after heart transplantation. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2013; 8: 165.
- 183) Xu P, Xin J, Song L et al. Serum miR-133 as a Potential Biomarker in Acute Cerebral Infarction Patients. *Clin. Lab*. 2020; 6: 1923 – 1928. doi: 10.7754/Clin.Lab.2019.190933.
- 184) Nattel S, Harada M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63(22): 2335-45.

Z komentarzem [MW8]: wklejone na nowo z linku bo zgubila się czesc autorów

- 185) Phan K, Ha HS, Phan S et al. New-onset atrial fibrillation following coronary bypass surgery predicts long-term mortality: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* 2015; 48: 817 – 824.
- 186) Thorén E, Wernroth ML, Christersson C et al. Compared with matched controls, patients with postoperative atrial fibrillation (POAF) have increased long-term AF after CABG, and POAF is further associated with increased ischemic stroke, heart failure and mortality even after adjustment for AF. *Clin. Res. Cardiol.* 2020; 109: 1232 – 1242.
- 187) Tsoporis JN, Fazio A, Rizos IK et al. Increased right atrial appendage apoptosis is associated with differential regulation of candidate MicroRNAs 1 and 133A in patients who developed atrial fibrillation after cardiac surgery. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2018; 121: 25 – 32.
- 188) Kim TY, Kim DK, Yoon TG et al. Myocardial injury in remifentanyl-based anaesthesia for off pump coronary artery bypass surgery: an equipotent dose of sevoflurane versus propofol. *Anaesth Intensive Care.* 2011; 39: 418 – 425.
- 189) Law-Koune JD, Raynaud C, Liu N et al. Sevoflurane-remifentanyl versus propofol-remifentanyl anesthesia at a similar bispectral level for off-pump coronary artery surgery; no evidence of reduced myocardial ischemia. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2006; 20: 484 – 492.
- 190) Bignami E, Guarneri M, Pieri M et al. Volatile anaesthetics added to cardiopulmonary bypass are associated with reduced cardiac troponin. *Perfusion.* 2017; 32: 547 – 553.
- 191) Likhvantsev VV, Landoni G, Levikov DI et al. Sevoflurane versus Total Intravenous Anesthesia for Isolated Coronary Artery Bypass Surgery with Cardiopulmonary Bypass: A Randomized Trial. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2016; 30: 1221 – 1227.
- 192) De Hert SG, Meeus R, Rodrigus IE. Choice of Primary Anesthetic Regimen Can Influence Intensive Care Unit Length of Stay after Coronary Surgery with Cardiopulmonary Bypass. *Anesthesiology.* 2004; 101(1): 9 – 20.
- 193) Landoni G, Biondi-Zoccai GG, Zangrillo A et al. Desflurane and Sevoflurane in Cardiac Surgery: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2007; 21: 502 – 511.

- 194) Landoni G, Greco T, Biondi-Zoccai G et al. Anaesthetic drugs and survival: A Bayesian network meta-analysis of randomized trials in cardiac surgery. *Br. J. Anaesth.* 2013; 111: 886 – 896.
- 195) Bonanni A, Signori A, Alicino C et al. Volatile Anesthetics versus Propofol for Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass: Meta-analysis of Randomized Trials. *Anesthesiology.* 2020; 132: 1429 – 1446.
- 196) Zangrillo A, Lomivorotov VV, Pasyuga VV et al. MYRIAD Study Group. Effect of Volatile Anesthetics on Myocardial Infarction After Coronary Artery Surgery: A Post Hoc Analysis of a Randomized Trial. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2022; 36: 2454 – 2462.
- 197) Landoni G, Lomivorotov VV, Nigro Neto C et al. Volatile Anesthetics versus Total Intravenous Anesthesia for Cardiac Surgery. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380: 1214 – 1225.
- 198) Stefan M, Predoi C, Goicea R et al. Volatile Anaesthesia versus Total Intravenous Anaesthesia for Cardiac Surgery—A Narrative Review. *w. J. Clin. Med.* 2022; 11: 6031. <https://doi.org/10.3390/jcm11206031>
- 199) Djalali AG, Sadovnikoff N. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology.* 2005; 102(3): 699 – 700. doi: 10.1097/00000542-200503000-00045.
- 200) Liu Xiaou, Liu Xiaopeng, Wang R et al. Circulating microRNAs indicate cardioprotection by sevoflurane inhalation in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2016; 11: 2270 – 2276.
- 201) Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods.* 2013; 59: S1–S6.
- 202) May SM, Abbott TE, Del Arroyo AG et al. MicroRNA signatures of perioperative myocardial injury after elective noncardiac surgery: a prospective observational mechanistic cohort study. *Br J Anaesth.* 2020 Nov; 125(5): 661 – 671.
- 203) Sayed AS, Xia K, Yang TL, et al. Circulating microRNAs: A Potential Role in Diagnosis and Prognosis of Acute Myocardial Infarction. *Disease Markers.* 2013; 35 (5): 561–566.

- 204) Izraeli S, Pfeleiderer C, Lion T. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res.* 1991; **19**: 6051.
- 205) Satsangi J, Jewell DP, Welsh K et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet.* 1994; 343: 1509 – 1510.
- 206) Boeckel JN et al. Heparin selectively affects the quantification of microRNAs in human blood samples. *Clin Chem.* 2013; 59: 1125 – 1127.
- 207) Kondratov K et al. Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol Detect Quantif.* 2016; 8: 9–14.
- 208) Kaudewitz D, Lee R, Willeit P et al. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patient with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2013; 110: 609 – 615.

9 SPIS TABEL

- Tabela 1. Dane demograficzne badanych grup.
- Tabela 2. Wywiad chorobowy – schorzenia towarzyszące.
- Tabela 3. Farmakoterapia przedoperacyjna u pacjentów badanych grup.
- Tabela 4. Dane operacyjne badanych grup.
- Tabela 5. Inwazyjny profil hemodynamiczny.
- Tabela 6. Leki wazoaktywne i inotropowe stosowane w trakcie znieczulenia.
- Tabela 7. Dynamika zmian aktywności CKMB w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Tabela 8. Dynamika zmian stężenia troponiny I (hs-TnI) w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Tabela 9. Ilość poddanych analizie próbek w każdej z grup: gr. 1 – Sewofluran ; gr. 2 – Propofol w poszczególnych punktach czasowych (T0, T3, T6, T12, T24). Badanie poziomu ekspresji miRNA we krwi.
- Tabela 10. Dynamika zmian ekspresji miRNA-499-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Tabela 11. Dynamika zmian ekspresji miRNA-1-3p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Tabela 12. Dynamika zmian ekspresji miRNA-133a-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Tabela 13. Dynamika zmian ekspresji miRNA-21-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Tabela 14. Dynamika zmian ekspresji miRNA-1-3p w czasie, w mięśniu prawego przedsionka, porównanie badanych grup.

- Tabela 15. Dynamika zmian ekspresji miRNA-499-5p w czasie, w mięśniu prawego przedsonka, porównanie grup.
- Tabela 16. Dynamika zmian ekspresji miRNA-133a-5p w czasie, w mięśniu prawego przedsonka, porównanie grup.
- Tabela 17. Dynamika zmian ekspresji miRNA-21-5p w czasie, w mięśniu prawego przedsonka, porównanie grup.
- Tabela 18. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-499-5p a: miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p. Porównanie grup w zależności od metody znieczulenia.
- Tabela 19. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-499-5p a: miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p. Przedstawione dla całej badanej populacji bez podziału na grupy w zależności od metody znieczulenia.
- Tabela 20. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-133a-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p. Porównanie grup w zależności od metody znieczulenia.
- Tabela 21. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-133a-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p. Przedstawione dla całej badanej populacji bez podziału na grupy w zależności od metody znieczulenia.
- Tabela 22. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-1-3p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-21-5p. Porównanie grup w zależności od metody znieczulenia.
- Tabela 23. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-1-3p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-21-5p. Przedstawione dla całej badanej populacji bez podziału na grupy w zależności od metody znieczulenia.
- Tabela 24. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-21-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p. Porównanie grup w zależności od metody znieczulenia.

- Tabela 25. Wzajemne korelacje ekspresji we krwi, w czasie, między miRNA-21-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p. Przedstawione dla całej badanej populacji, bez podziału na grupy w zależności od metody znieczulenia.
- Tabela 26. Korelacja ekspresji miRNA-499-5p a: miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.
- Tabela 27. Korelacja ekspresji miRNA-133a-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-1-3p, miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.
- Tabela 28. Korelacja ekspresji miRNA-1-3p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.
- Tabela 29. Korelacja ekspresji miRNA-21-5p a: miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p w mięśniu prawego przedsionka przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego.
- Tabela 30. Korelacja między stężeniami troponiny I we krwi a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji we krwi.
- Tabela 31. Korelacja między ekspresją miRNA-499-5p we krwi a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji.
- Tabela 32. Korelacja między poziomem ekspresji miRNA-133a-5p we krwi a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji.
- Tabela 33. Korelacja między ekspresją miRNA-1-3p we krwi a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji.

Tabela 34. Korelacja między ekspresją miRNA-21-5p we krwi a: czasem trwania krążenia pozaustrojowego (CBP), czasem zaklemowania aorty (ACC), czasem reperfuzji.

10 SPIS RYCIN

- Rycina 1. Hartowanie niedokrwiennie – proces aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych.
- Rycina 2. Powstawanie i mechanizmy działania miRNA.
- Rycina 3. Dynamika zmian aktywności CKMB w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Rycina 4. Dynamika zmian stężenia troponiny I (hs-TnI) w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Rycina 5. Dynamika zmian ekspresji miRNA-499-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Rycina 6. Dynamika zmian ekspresji miRNA-1-3p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Rycina 7. Dynamika zmian ekspresji miRNA-133a-5p w czasie, we krwi, porównanie badanych grup.
- Rycina 8. Dynamika zmian ekspresji miRNA-21-5p w czasie, porównanie badanych grup.
- Rycina 9. Korelacja między ekspresją miRNA-133a-5p a stężeniem hsc -troponiny I w punkcie czasowym T3, gr. 1 – Sewofluran.
- Rycina 10. Korelacja między ekspresją miRNA-499-5p a CKMB_{akt} w punkcie czasowym T12, gr. 2 Propofol

11 WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W TEKŚCIE

Skróty wykaz monografia;

AAI	tryb stymulacji przedsionkowej hamowanej rytmem przedsionków
ACC	(aortic cross clamping) – krzyżowe zaklemowanie aorty
ACE inhibitory	(inhibitors angiotensin-converting enzyme) – inhibitor konwertazy angiotensyny
ACT	(activated clotting time) – aktywowany czas krzepnięcia
ACS	(Acute Coronary Syndrom) – ostry zespół wieńcowy
AF	(atrial fibrillation) – migotanie przedsionków
AGO2	białko Argonaute
AKT	(Akt kinase) – 3-kinaza białkowa B
AlAt	(alanine aminotransferase) – aminotransferaza alaninowa
AMI	(acute myocardial infarction) – ostry zawał mięśnia sercowego
ASA	skala oceny ryzyka wystąpienia powikłań lub zgonu podczas znieczulenia opracowana przez Amerykańskie Stowarzyszenie Anestezjologów
ATP	adenozynotrójfosforan
AUROC	(area under receiver-operator curve) – pole pod krzywą ROC
Bcl-2	(B-cell lymphoma 2) protoonkogen kodujący białko regulujące proces apoptozy
BSA	(body surface area) – powierzchnia ciała
BIS	(bispectral index) – index bispektralny
BNP	peptyd natiuretyczny typu B
β AR	β – adrenoreceptor

CABG	(Coronary Artery Bypass Grafting) pomostowanie aortalno-wieńcowe
CAD	Coronary Artery Disease) – choroba niedokrwienna serca
cAMP	cykliczny adenozynomonofosforan
CCS	klasyfikacja dławicy piersiowej na podstawie jej nasilenia według (Canadian Cardiovascular Society) Kanadyjskiego Stowarzyszenia Kardiologów
Cdc42	(cell division cycle 42) – kinaza transdukcji sygnału (białko regulujące cykl komórkowy)
cDNA	(complementary DNA) – komplementarny kwas dezoksyrybonukleinowy
CI	(cardiac index) – wskaźnik sercowy
CK	(creatine kinase) – kinaza fosfokreatynowa
CK-MB _{akt}	aktywność sercowego izoenzymu kinazy fosfokreatynowej
CK-MB _{mass}	stężenia sercowego izoenzymu kinazy fosfokreatynowej
CMR	(cardiac magnetic resonance imaging) – rezonans magnetyczny serca
cMyC	białko wiążące miozynę C
CO	(cardiac output) – rzut serca
CPB	(cardiopulmonary bypass) – krążenie pozaustrojowe
CRP	(C – reactive protein) – białko C reaktywne
CVP	(central venous pressure) – ośrodkowe ciśnienie żylnie
CTGF	(connective tissue growth factor) – białko regulatorowe – czynnik wzrostu tkanki łącznej
cTnT, cTnI	izoforny sercowych troponin
Ct ($\Delta \Delta Ct$)	metoda delta-delta Ct – metoda względnie ilościowa, porównawcza badająca poziom ekspresji miRNA
DAP	(diastolic arterial pressure) – rozkurczowe ciśnienie tętnicze

DDD	tryb stymulacji dwujamowej (miejscem stymulacji i czuwania jest przedsionek i komora serca)
DGCR8	(DiGeorge Syn-drome Critical Region 8) – białko jądrowe tworzące kompleks z rybonukleazą Drosha
DLL1	(delta like protein 1) – białko - mediator komórki w hematopoezie
Drp 1.	(dynamamin-related protein 1) – dynamina 1, białko zaangażowane w endocytozę i przemieszczanie pęcherzyków
ERK	(ekstracellural signal regulated kinase) – kinaza białkowa aktywowana przez czynniki pozakomórkowe
Euroscore II	(the European System for Operative Risk Evaluation) skala oceny ryzyka operacyjnego chorych poddanych zabiegom kardiochirurgicznym
FAP	(paroxysmal atrial fibrillation) – napadowe migotanie przedsionków
GATA4	białko – czynnik transkrypcyjny
GJA1	(gap junction alpha-1 protein) – białko alfa-1 złącza szczelinowego
GDF - 15	(growth differentiation factor 15) – czynnik wzrostu GDF -15
GGTP	gamma glutamylotranspeptydaza
GP-BB	(glycogen fosphorylase isoenzyme) – fosforylaza glikogenu
GSK-3β	(glycogen synthase kinase – 3beta) – izoforma β kinazy syntezy glikogenu
Hand 2	białko – czynnik transkrypcyjny
HCV	(hepatitis C virus) – wirus zapalenia wątroby typu C
HDL	(high-density lipoprotein) – lipoproteiny o dużej gęstości
h-FABP	(heart, fat acid binding protein) – sercowe białko wiążące kwasy tłuszczowe
HIF 1α	(hypoxia-inducible factor 1-alpha) – czynnik indukowany niedotlenieniem 1-α

HSP	(heat shock proteins) – białka szoku cieplnego
HR	(heart rate) – częstość akcji serca
HTX	(heart transplantation) – przeszczep serca
IGF-1	(insulin-like growth factor) – insulinopodobny czynnik wzrostu
IL - 6, IL - 18	(interleukin -6, interleukin - 18) – interleukina-6, interleukina-18
IMA	(ischemia modified albumin) – albumina modyfikowana przez niedokrwienie
IRI	(ischemia reperfusion injury) – uraz niedokrwienno – reperfuzyjny
IrX5	(iroquois-class homeodomain protein) – białko IrX5 czynnik transkrypcyjny
KCNJ2	(potassium channel, Inwardly Rectifying Subfamily J Member 2) – skierowany do wewnątrz rektyfikujący kanał potasowy, członek 2 podrodziny J
Kir 2.1.	(inwardly rectifying potassium channel) – skierowany do wewnątrz rektyfikujący kanał potasowy
KLF	(Krüpper-like factor) czynnik transkrypcyjny typu Krüppela
KROK	Krajowy Rejestr Operacji Kardiochirurgicznych
LDH	(Lactate DeHydrogenase) – dehydrogenaza mleczanowa
LVSWI	(Left Ventricular Stroke Work Index) – wskaźnik pracy wyrzutowej lewej komory serca
MAC	(Minimum Alveolar Concentration) – minimalne stężenie pęcherzykowe anestetyku wziewnego
MAP	(mean arterial pressure) – średnie ciśnienie tętnicze krwi
MAPK	(mitogen activated protein kinase) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny
MEF 2a	(Myocyte Enhancer Factor 2A) – czynnik wzmacniający miocyty 2a
MI	(Myocardial Infarction) – zawał serca

mitoK – ATP	(mitochondrial ATP – sensitive potassium channel) – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP
MiRNA	(mikroRNA) – małe niekodujące jednoniciowe cząsteczki RNA
MLC	(myosin light chain) – lekkie łańcuchy miozyny
MMP-9	(Matrix Metalloproteinase – 9) – metaloproteinaza macierzy 9
mPAP	(mean pulmonary arterial pressure) – średnie ciśnienie w tętnicy płucnej
MPO	(Myeloperoxidase) – mieloperoksydaza, hemoproteina ziarnistości granulocytów obojętnochłonnych makrofagów
MPTP	(mitochondrial permeability transition pore) – megakanał mitochondrialny
Myh 6 Myh 7	ciężkie łańcuchy miozyny
NFAT	(nuclear factor of activated T-cells) – czynnik jądrowy aktywowanych komórek T
NF-kB	(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B)
NT-proBNP	N-końcowy fragment (pro) peptydu natriuretycznego typu B
NYHA	(New York Heart Association Functional Classification) – skala niewydolności serca zaproponowana przez Nowojorskie Stowarzyszenie Kardiologów
oxyLDL - sLox-1	(soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1) – rozpuszczalny lektynopodobny receptor dla oxyLDL - sLox-1
OIT	oddział intensywnej terapii
OPCAB	(off pump coronary artery bypass) – pomostowanie naczyń wieńcowych bez użycia krążenia pozaustrojowego
PADP	(pulmonary arterial diastolic pressure) – ciśnienie rozkurczowe tętnicy płucnej
PAPP-A	(pregnancy-associated plasma protein) – ciążowe białko osocza A

PASP	(pulmonary arterial systolic pressure) – ciśnienie skurczowe tętnicy płucnej
PCWP	(pulmonary capillary wedge pressure) – ciśnienie zaklinowania tętnicy płucnej
PCV	(pressure controlled ventilation) – tryb wentylacji mechanicznej ciśnieniowo–zmienny
PDCD4	białko programowanej śmierci komórki 4
PIGF	(placental growth factor) – czynnik wzrostu łożyska
PKA	(protein kinase A) – kinaza białkowa A
PMI	(Perioperative Myocardial Infarction) – okołoperacyjny zawał mięśnia serca
POCHP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
POAF	(post-operative atrial fibrillation) – pooperacyjne migotanie przedsionków
PP2A	protein phosphatase fosfataza białkowa 2A
pre-miRNA	prekursorowe miRNA
pri-miRNA	pierwotne miRNA
PTEN	(phosphatase and tensin homolog) – proapoptyczne białko kodowane przez gen supresorowy PTEN
PTX-3	pentraksyna 3
PVRI	(pulmonary vascular resistance index) – wskaźnik oporu płucnego
RhoA	(Ras homolog gene family, member A) – substrat, białko wymiany GDP/GTP
RISC RNA	(induced silencing complex) – kompleks wyciszający indukowany RNA
RISK	(reperfusion injury salvage kinases) – kinazy wczesnej protekcji
RNA	(ribonucleic acid) – kwas rybonukleinowy

RT – qPCR	(real time quantitative polymerase chain reaction) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RVSWI	(right ventricular stroke work index) – wskaźnik pracy wyrzutowej prawej komory serca
RyR2	(ryanodine receptor 2) – receptory rianodyny 2
SAA	serum amyloid A białko amyloidu A
SAH	(subarachnoid hemorrhage) – krwawienie podpajęczynówkowe
SaO2	saturacja krwi tętniczej
SAP	(systolic arterial pressure) – skurczowe ciśnienie tętnicze
sCD40L	(soluble CD40 – ligand) – rozpuszczalny ligand CD 40
ScvO2.	(central venous oxygen saturation) – saturacja centralnej krwi żyłnej
SIRT	białka sirtuinowe
SK3	kanał potasowy 3 o małym przewodnictwie
S100 białko	białko wiążące wapń
SVI	(stroke volume index) – wskaźnik objętości wyrzutowej
SVRI	(systemic vascular resistance index) – wskaźnik oporu obwodowego
TCI	(Target Controlled Infusion) – kontrolowana infuzja sterowana osiągnięciem docelowego stężenia leku w danym kompartmentcie ciała
TIA	(transient ischemic attack) – przejściowy napad niedokrwienny
TIVA	(Total Intravenous Anaesthesia) – znieczulenie całkowicie dożylnie
UTR	(untranslated region) – region mRNA nie podlegający translacji
URL	(upper reference limit) – górna granica odniesienia
VCV	(volume controlled ventilation) – tryb wentylacji mechanicznej objętościowo – zmienny

VFGF (vascular endothelial growth factor) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

Wnt szlak (Wingless and Int-1) – szlak transdukcji sygnału, w który zaangażowane są białka Wg (wingless) oraz Int (MMTV integration site)

12 STRESZCZENIE

Uraz niedokrwienno-reperfuzyjny (IRI) operowanego serca w czasie chirurgicznego pomostowania naczyń wieńcowych (CABG) z użyciem krążenia pozaustrojowego (CPB) jest nadal bardzo poważnym problemem klinicznym i istotnym czynnikiem ryzyka powikłań pooperacyjnych. Stopień nasilenia IRI wyrażony ekspresją markerów biochemicznych, zależy również od metody postępowania anestezjologicznego ze szczególną rolą opioidów, anestetyków dożylnych – propofolu, a w szczególności inhalacyjnych środków anestetycznych, a wśród nich sewofluranu. Leki tej grupy mogą inicjować szlaki sygnałowe odpowiedzialne za wytworzenie odporności mięśnia serca na uraz niedokrwienno-reperfuzyjny w mechanizmach określanym jako hartowanie lub kondycjonowanie serca.

Podstawą diagnostyki niedokrwienia mięśnia serca są metody oznaczania stężenia białek strukturalnych kardiomiocytów – izoform troponin T (cTnT) i troponin I (cTnI) oraz stężenia sercowego izoenzymu kinazy kreatynowej (CK-MB). Pomimo niekwestionowanej przydatności tych oznaczeń, posiadają one jednak pewne ograniczenia, które sprawiają, że nadal trwają poszukiwania innych biomarkerów, których przydatność próbuje się oceniać w diagnostyce choroby niedokrwiennej serca i jej powikłań.

Mikro-RNA (miRNA) to grupa jednoniciowych, niekodujących RNA składających się z 20 – 22 nukleotydów, które biorą udział w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. MiRNA są produktem genów jądrowych rozsianych po całym genomie człowieka. Odsetkowo jest ich zaledwie około 5 %, ale szacuje się, że w organizmie człowieka aż około 50 – 60 % genów jest regulowanych właśnie za ich pośrednictwem. Działanie ich polega na połączeniu się ze specyficznymi regionami w RNA, co powoduje zahamowanie procesu translacji, a nawet degradację łańcucha RNA odpowiedzialnego za syntezę białek, ale też w pewnych sytuacjach są one odpowiedzialne za wzmocnienie jego ekspresji.

Z uwagi na rolę jaką odgrywają niektóre z miRNA w procesach protekcji, remodelingu mięśnia sercowego i urazu niedokrwienno-reperfuzyjnego miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1 i miRNA-21 budzą one szczególne zainteresowanie jako czułe

wskaźniki nasilenia lub hamowania tych procesów w chirurgii serca. Opisywany w doniesieniach naukowych profil uwalniania, swoistość i czułość pozwalają także na poddanie ich próbie wykorzystania jako biomarkerów monitorowania skuteczności zapobiegania skutkom urazu niedokrwienno - reperfuzyjnego poprzez farmakologiczne hartowanie mięśnia sercowego za pomocą środków anestetycznych wykorzystywanych w trakcie znieczuleń do zabiegów kardiochirurgicznych.

Praca podejmowała trzy zasadnicze cele badawcze.

1. Ocena kinetyki i profilu okołoperacyjnego wybranych miRNA: miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1, miRNA-21 monitorowanych we krwi obwodowej u pacjentów poddawanych chirurgicznej rewaskularyzacji wieńcowej, z zastosowaniem dwóch różnych metod znieczulenia ogólnego; jednego na bazie inhalacyjnego zastosowania sewofluranu przez cały okres zabiegu, drugiego z zastosowaniem dożylną podażą propofolu metodą TCI.
2. Ocena profilu wybranych miRNA: miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1, miRNA-21 w śródoperacyjnie pobieranych bioptatach mięśnia prawego przedsionka serca u pacjentów poddawanych rewaskularyzacji wieńcowej wymienionymi metodami znieczulenia.
3. Ocena przydatności wybranych miRNA jako biomarkerów urazu mięśnia sercowego w relacji do standardowo oznaczanych markerów CKMB i troponiny I, we wczesnym okresie pooperacyjnym.

Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w dniu 2.06.2016 (opinia Nr. KB – 280/2016). Zostało ono przeprowadzone zgodnie z wymogami Deklaracji Helsińskiej (2000) Światowego Stowarzyszenia Medyków. Było to prospektywne, obserwacyjne, randomizowane badanie kliniczne, które obejmowało 40 chorych operowanych planowo w okresie od grudnia 2016 do kwietnia 2019 w Klinice Chirurgii Serca i Klinice Anestezjologii i Intensywnej Terapii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu.

Badanie przeprowadzono u chorych poddawanych pierwszorazowym, planowym operacjom pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), przeprowadzanych w krążeniu pozaustrojowym, w normotermii, przy użyciu krwistej kardioplegii dowieńcowej. Z badania wykluczono pacjentów, którzy nie wyrazili na nie zgody. Kryteriami klinicznymi

wykluczenia były: cukrzyca, świeży udar mózgu lub TIA w wywiadzie, zaawansowana wada zastawkowa serca, kardiomiopatia przerostowa, zatorowość płucna, podwyższone stężenia troponin i CKMB w kontrolnych badaniach przed operacją, poważne zaburzenia kurczliwości mięśnia sercowego w przedoperacyjnej ocenie echokardiograficznej (frakcja wyrzutowa poniżej 40%), niewydolność nerek i wątroby, krytyczne zwężenie tętnic dogłowych, pacjenci reoperowani lub z obecnością wszczepionych stentów do naczyń wieńcowych.

Pacjenci zostali losowo przydzieleni do jednej z dwóch 20 osobowych grup różniących się zastosowaną metodą znieczulenia ogólnego: Grupa 1 – Sewofluran: znieczulenie złożone z użyciem anestetycznego środka wziewnego sewofluranu przez cały okres trwania operacji. Grupa 2 – Propofol: znieczulenie całkowicie dożylnie z użyciem propofolu metodą TCI przez cały okres trwania operacji.

Próbki krwi dla oznaczenia ekspresji miRNA (-133a, -499, -1, -21), aktywności CKMB i stężenia troponiny I (hs-TnI), pobierano z cewnika centralnego po wprowadzeniu do żyły szyjnej wewnętrznej prawej w 5 punktach czasowych: po indukcji znieczulenia (ale przed rozpoczęciem zabiegu) oraz w okresie reperfuzji (w 3, 6, 12, 24 godzinie od przywrócenia krążenia wieńcowego).

Celem oznaczenia ekspresji miRNA (miRNA-133a, miRNA-499, miRNA-1, miRNA-21) w tkance mięśniowej pobierano dwukrotnie bioptaty 5 x 5 mm z mięśnia prawego przedsionka: przed podłączeniem krążenia pozaustrojowego, w trakcie zakładania kaniuli żyłnej do prawego przedsionka oraz po zakończeniu krążenia pozaustrojowego, w trakcie usuwania kaniuli żyłnej do CPB z prawego przedsionka. Zamrożone i zakodowane próbki krwi i bioptaty tkankowe przesłane były do laboratorium Katedry i Zakładu Histopatologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, gdzie wykonano izolację i selektywne oznaczenie ekspresji poszczególnych miRNA za pomocą metody RT-qPCR. Ekspresję poszczególnych miRNA mierzono metodą względnie ilościową, porównawczą Ct ($\Delta \Delta Ct$).

Próbki krwi do oznaczeń biochemicznych – troponiny I (hs-TnI) i CKMB pobrano w tych samych przedziałach czasowych i analizowano według ustalonych procedur i standardów postępowania anestezjologicznego w opiece okołoperacyjnej chorych poddawanych procedurom chirurgicznej rewaskularyzacji wieńcowej, obowiązujących

w Klinice Anestezjologii i Intensywnej Terapii oraz procedur i standardów obowiązujących w laboratorium Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego. Aktywność izoenzymu MB kinazy kreatynowej w pobranych próbkach oznaczano metodą immunoinhibicyjną, zaś stężenie troponiny I testem immunochemicznym z użyciem mikrocząstek i znacznika chemiluminescencyjnego.

Badanie grupy nie różniły się istotnie w analizie danych demograficznych i operacyjnych. Podobny był przebieg pooperacyjny we wszystkich grupach. Nie było śmiertelności szpitalnej w badanej grupie chorych.

Porównanie badanych grup: gr. 1 – Sewofluran i gr. 2 – Propofol w zakresie stężenia w surowicy biomarkerów oznaczanych zarówno standardowo (hsc -troponina I - stężenie, CKMB - aktywność), jak i ekspresji we krwi badanych miRNA, nie wykazało pomiędzy nimi różnic istotnych statystycznie ($p > 0,05$) w całym okresie obserwacji. W obu badanych grupach dynamika zmian badanych wskaźników w czasie przebiegała podobnie. MiRNA-499-5p charakteryzował się niewielką nieistotną statystycznie dynamiką zmian ekspresji w czasie. MiRNA-1-3p oraz miRNA-133a-5p wykazywały istotny spadek ekspresji w stosunku do wartości wyjściowych obserwowany w czasie, zaś poziom ekspresji miRNA-21-5p istotnie statystycznie wzrastał w 3 godzinie reperfuzji

Analiza badanych miRNA i biomarkerów uszkodzenia mięśnia sercowego (troponina I, CKMB) w poszczególnych punktach czasowych wykazała słabą ich wzajemną korelację. Tylko w dwóch punktach czasowych stężenia troponin i CKMB istotnie statystycznie korelowały z badanymi miRNA (miRNA-133a-5p / Troponina I ujemna korelacja w 3 godzinie reperfuzji, miRNA-499-5 p / CKMB w 12 godzinie reperfuzji). Analiza wzajemnych korelacji MiRNA we krwi wykazała z kolei silną dodatnią korelację miRNA-499-5p z miRNA-21-5p w większości badanych punktów czasowych oraz brak wzajemnych istotnych statystycznie korelacji miRNA-1-3p z miRNA-21-5p we wszystkich badanych punktach czasowych.

W analizie ekspresji miRNA w biopsjach mięśnia prawego przedsionka serca nie stwierdzono istotnego wpływu rodzaju znieczulenia na ekspresję miRNA-499-5p, miRNA- 1- 3p i miRNA-133-5p przed, jak i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego ($p > 0.05$). Stwierdzono natomiast w obu grupach istotny statystycznie spadek ekspresji

miRNA-21– p w stosunku do wartości wyjściowych. Badając wzajemne korelacje miRNA w biopłatach prawego przedsionka wykazano istotne statystycznie korelacje miRNA-499–5p z miRNA-133a–5p i miRNA-1–3p niezależnie od metody znieczulenia, przed i po zakończeniu krążenia pozaustrojowego. W innych badanych przypadkach te wzajemne korelacje charakteryzowały się zmiennym nasileniem w zależności od grupy badanej.

W analizie porównawczej wpływu czynników operacyjnych na kinetykę miRNA uzyskiwane wyniki wykazywały istotne różnice między grupami. Ekspresja miRNA-499–5p zawartego w biopłatach pobranych z mięśnia prawego przedsionka po zakończeniu krążenia pozaustrojowego wykazywała silną dodatnią korelację z czasem zaklepowania aorty (ACC) w grupie 2 – Propofol, przy braku istotnej statystycznie korelacji w grupie 1 – Sewofluran ($p > 0,05$). Podobne zależności stwierdzono w ocenie miRNA-1–3p w mięśniu prawego przedsionka. Dość silna istotna korelacja z czasem zaklepowania aorty występowała w grupie 2 – Propofol przy braku istotnej statystycznie zależności w grupie 1 – Sewofluran ($p > 0,05$). Analiza wzajemnych korelacji miRNA we krwi pełnej z czasem niedokrwienia (ACC), czasem reperfuzji w kolejnych punktach czasowych po odklepowaniu aorty przyniosła niejednoznaczne w większości przypadków słabo wyrażone i różniące się pomiędzy badanymi grupami rezultaty. W analizie tradycyjnych markerów zwracała uwagę silna dodatnia korelacja stężenia troponiny I z czasem trwania krążenia pozaustrojowego w obu badanych grupach.

Najważniejsze wnioski z prezentowanej pracy są następujące:

1. Dynamika zmian ekspresji badanych miRNA we krwi obwodowej przebiegała podobnie w całym czasie obserwacji, niezależnie od metody znieczulenia.
2. Dynamika zmian ekspresji miRNA-1–3p i miRNA-133a–5p, monitorowana we krwi obwodowej u pacjentów badanej grupy, ulegała istotnemu wyhamowaniu w późnym okresie reperfuzji, niezależnie od zastosowanej metody znieczulenia.
3. Krążenie pozaustrojowe powoduje wzrost ekspresji miRNA-21–5p monitorowanej we krwi obwodowej u pacjentów badanej grupy, z jej wczesnym wzrostem od 3. godziny reperfuzji.
4. Poziom ekspresji miRNA-499–5p, monitorowany we krwi obwodowej nie zmienia się pod wpływem krążenia pozaustrojowego.

5. Profil ekspresji miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p i miRNA-21-5p w śródoperacyjnie pobieranych biopsjach mięśnia prawego przedsionka serca u pacjentów poddawanych rewaskularyzacji wieńcowej przebiegał podobnie, niezależnie od metody znieczulenia.
6. Krążenie pozaustrojowe powoduje istotny spadek ekspresji miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedsionka serca, u pacjentów poddawanych rewaskularyzacji wieńcowej niezależnie od metody znieczulenia.
7. Okołooperacyjne zmiany stężeń markerów uszkodzenia mięśnia sercowego TnI i CKMB w surowicy korelowały w różnym czasie i z różnym nasileniem ze zmianami ekspresji miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p i miRNA-21-5p w mięśniu prawego przedsionka serca oraz ich stężeniami we krwi obwodowej.
8. Uszkodzenie mięśnia sercowego monitorowane ekspresją wybranych miRNA, w badanej grupie operowanych chorych, nie wykazało przewagi nad standardowo oznaczonymi stężeniami Tn I i CKMB w surowicy.

13 SUMMARY

Ischemia-reperfusion injury (IRI) of the operated heart during coronary bypass graft surgery (CABG) with the use of cardiopulmonary bypass (CPB) is still a major clinical problem and a significant risk factor for postoperative complications. The severity of IRI, usually assessed by the expression of biochemical markers, also depends on the method of anesthesiologic management with the highlighting the role of opioids, intravenous anesthetics - propofol, and inhalation anesthetics, including sevoflurane. This group of drugs may initiate signaling pathways responsible for stimulation of myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in mechanisms referred to as cardiac conditioning.

The basis for the diagnosis of myocardial ischemia are the methods of determining the concentration of cardiomyocyte structural proteins - troponin T (cTnT) and troponin I (cTnI) isoforms and the concentration of the cardiac isoenzyme creatine kinase (CK-MB). Despite the unquestionable usefulness of these assays, they have certain limitations, which make it necessary to search for other biomarkers whose usefulness is being assessed in the diagnosis of ischemic heart disease and its complications.

Micro-RNAs (miRNAs) are a group of single-stranded, non-coding RNAs consisting of 20-22 nucleotides, which are involved in the regulation of gene expression at the post-transcriptional level. MiRNAs are the product of nuclear genes spread throughout the human genome. As a percentage, there are only about 5% of them, but it is estimated that in the human body as much as about 50-60% of genes are regulated by them. They are acting by binding to specific regions in the RNA, which inhibits the translation process and even degrades the RNA chain responsible for protein synthesis, but in some situations, they are also responsible for enhancing its expression.

Due to the role played by some of the miRNAs in the processes of protection, myocardial remodeling and ischemia-reperfusion injury, miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1 and miRNA-21 are of particular interest as sensitive indicators of the intensity or inhibition of these processes in cardiac surgery. The release profile, specificity and sensitivity described in scientific reports also allow them to be tested as biomarkers to monitor the effectiveness of preventing the effects of ischemia-reperfusion injury

through pharmacological hardening of the myocardium using anesthetics used during anesthesia for cardiac surgery procedures.

The aim of the study was to find answers to three main research objectives.

1. Assessment of the kinetics and perioperative profile of selected miRNAs: miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1, miRNA-21, monitored in peripheral blood in patients undergoing surgical coronary revascularization, using two different methods of general anesthesia, one based on sevoflurane inhalation throughout the whole procedure, the second with the use of intravenous propofol by TCI method.
2. Evaluation of the profile of selected miRNAs: miRNA-499, miRNA-133a, miRNA-1, miRNA-21, in intraoperatively collected biopsies of the right atrium muscle in patients undergoing coronary revascularization with the above-mentioned methods of anesthesia.
3. Evaluation of the usefulness of selected miRNAs as a biomarkers of myocardial injury in relation to the usually determined markers, CKMB and troponin I in the early perioperative period.

The study received a positive opinion of the Bioethics Committee at the Medical University of "Piaśtów Śląskich" in Wrocław on June 2, 2016 (opinion No. KB - 280/2016). It was carried out in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association. It was a prospective, observational, randomized clinical trial that included 40 patients who underwent elective surgery between December 2016 and April 2019 at the Department of Cardiac Surgery and the Department of Anesthesiology and Intensive Care at the University Clinical Hospital in Wrocław.

The study was conducted in patients undergoing first-time elective coronary artery bypass grafting (CABG) performed with use of extrCPB, under normothermia, with the application of bloody coronary cardioplegia. Clinical exclusion criteria were diabetes mellitus, history of recent stroke or TIA, advanced valvular heart disease, hypertrophic cardiomyopathy, pulmonary embolism, elevated troponin and CKMB levels in preoperative follow-up, severe myocardial contractility abnormalities in preoperative

echocardiographic assessment (ejection fraction below 40%), renal and hepatic insufficiency, critical cephalic artery stenosis, reoperated patients or patients with coronary stents implanted.

Patients were randomly assigned to one of two 20-person groups differing in the method of general anesthesia used: Group 1 – Sevoflurane: combined anesthesia with the inhalation anesthetic sevoflurane throughout the operation. Group 2 - Propofol: total intravenous anesthesia with propofol by TCI method throughout the entire operation.

Blood samples for the determination of miRNA expression (-133a, -499, -1, -21), CKMB activity and troponin I (hs-TnI) concentration were collected from a central catheter after insertion into the right internal jugular vein at 5 time points: after induction anesthesia (but before the start of the procedure) and during the reperfusion period (in 3 h, 6 h, 12 h, 24 h from the restoration of coronary circulation).

In order to determine the expression of miRNAs (miRNA-133a, miRNA - 499, miRNA - 1, miRNA -21) in muscle tissue, 5 x 5 mm biopsies were taken twice from the right atrium muscle: and after completion of extracorporeal circulation, during removal of the venous cannula to the CPB from the right atrium.

Frozen and coded blood samples and tissue biopsies were sent to the laboratory of the Department of Histopathology and Embryology of the Medical University of Wrocław, where the isolation and selective expression of individual miRNAs was performed using the RT - qPCR method. The expression of individual miRNAs was measured by a relatively quantitative, comparative Ct ($\Delta \Delta Ct$) method.

Blood samples for biochemical determinations - troponin I (hs-TnI) and CKMB. collected in the same time intervals and analyzed according to established procedures and standards of anesthesiologic management in perioperative care, patients undergoing surgical coronary revascularization procedures, applicable at the Department of Anesthesiology and Intensive Care, and procedures and standards applicable at the laboratory of the University Clinical Hospital. The activity of the MB creatine kinase isoenzyme in the collected samples was determined by the immunoinhibitory method, and the concentration of troponin I by the immunochemical test with the use of microparticles and a chemiluminescent marker.

The study groups did not differ significantly in the analysis of demographic and operational data. The postoperative course was similar in all groups. There was no in-hospital mortality in the study group.

Comparison of the studied groups: Group 1 - Sevoflurane and Group 2 – Propofol, in the serum concentration of biomarkers determined both in a standard way (hs-c troponin I - concentration, CKMB - activity) and expression in the blood of the tested miRNAs, did not show statistically significant differences between them ($p > 0.05$) throughout the entire period of observation. In both examined groups, the dynamics of changes in the examined indicators over time was similar. miRNA-499-5p was characterized by a small, not statistically significant change in expression over time. miRNA-1-3p and miRNA-133a-5p showed a significant decrease in expression from baseline observed over time, while the expression level of miRNA-21-5p statistically significantly increased at 3 hours of reperfusion.

The analysis of the studied miRNAs and biomarkers of myocardial damage (troponin I, CKMB) at individual time points showed their weak mutual correlation. Only in two time points, troponin and CKMB statistically significantly correlated with the miRNAs (miRNA-133a-5p / Troponin I negative correlation at the 3rd hour of reperfusion, miRNA-499-5p / CKMB at the 12th hour of reperfusion).

The cross-correlation analysis of miRNAs in the blood showed a strong positive correlation of miRNA-499-5p with miRNA-21-5p at most of the time points studied, and not statistically significant cross-correlation of miRNA-1-3p with miRNA-21-5p at all time points studied.

In the analysis of miRNA expression in right atrial muscle biopsies, there was no significant effect of the type of anesthesia on the expression of miRNA-499-5p, miRNA-1-3p and miRNA-133a-5p before and after the end of cardiopulmonary bypass ($p > 0.05$). However, in both groups, a statistically significant decrease in the expression of miRNA-21-5p was found compared to the baseline values. By examining the mutual correlations of miRNAs in right atrial biopsies, statistically significant correlations of miRNA-499-5p with miRNA-133a-5p and miRNA-1-3p were found, regardless of the method of anesthesia, before and after end of extracorporeal circulation. In other studied cases, these mutual correlations were characterized by variable intensity depending on the study group.

In the comparative analysis of the influence of operational factors on miRNA kinetics, the application obtained showed significant differences between the groups. The expression of miRNA-499-5p biopsies taken from the right atrium muscle after the end of CPB showed a strong positive correlation with the aortic clamping time (ACC) in group 2 - Propofol, with no statistically significant correlation in group 1 - Sevoflurane ($p > 0.05$). Similar relationships were found in the assessment of miRNA-1-3p in the right atrium muscle. There was quite a strong significant correlation with the time of aortic clamping in group 2 - Propofol with no statistically significant relationship in group 1 - sevoflurane ($p > 0.05$).

The analysis of cross-correlations of miRNAs in whole blood with ischemic time (ACC) and reperfusion time at subsequent time points after aortic unclamping brought ambiguous, in most cases, poorly expressed correlations that differed between the study groups. In the analysis of usual markers, a strong positive correlation of troponin I concentration with the duration of extracorporeal circulation in both study groups was notated.

The most important conclusions arising from the presented study are as follows:

1. The dynamics of changes in the expression of the examined miRNAs in peripheral blood was similar throughout the observation period, regardless of the method of anesthesia.
2. The dynamics of changes in the expression of miRNA-1-3p and miRNA-133a-5p, monitored in the peripheral blood of patients in the study group, was significantly diminished in the late reperfusion period, regardless of the method of anesthesia.
3. Extracorporeal circulation causes an increase in the expression of miRNA-21-5p, monitored in peripheral blood in patients of the study group, with its early increase from the 3rd hour of reperfusion.
4. The expression level of miRNA-499, monitored in peripheral blood, does not change under the influence of extracorporeal circulation.

5. The intraoperative expression profile of miRNA-499-5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p and miRNA-21-5p in in right atrial muscle biopsies from patients undergoing coronary revascularization was similar, regardless of the method of anesthesia.
6. Extracorporeal circulation causes a significant decrease in the expression of miRNA-21-5p in the right atrium muscle of the heart, in patients undergoing coronary revascularization, regardless of the method of anesthesia.
7. Perioperative changes in serum concentrations of myocardial damage markers, TnI and CKMB correlated at different times and with different intensity, with changes in the expression of miRNA-499- 5p, miRNA-133a-5p, miRNA-1-3p and miRNA-21-5p in the right atrium muscle and their concentrations in peripheral blood.
8. Myocardial damage monitored by the expression of selected miRNAs, in the studied group of operated patients, did not show an advantage over standard Tn I and CKMB concentrations in serum.