

Received: 2013.07.16  
Accepted: 2014.02.27  
Published: 2014.04.28

## Mikro-RNA – nowe szanse diagnostyczne w chorobie niedokrwiennej i zawale serca

### MicroRNA – a new diagnostic tool in coronary artery disease and myocardial infarction

Piotr Fic<sup>1</sup>, Krystyna Kowalczyk<sup>2</sup>, Aneta Grabarska<sup>2</sup>, Andrzej Stepulak<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Oddział Kardiologii z Pododdziałem Kardiologii Inwazyjnej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. Kardynała Wyszyńskiego w Lublinie

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

<sup>3</sup> Oddział Otolaryngologii Szpitala MSW w Lublinie

#### Streszczenie

Choroba niedokrwienności serca jest główną przyczyną śmiertelności na świecie, dlatego szuka się doskonalszych metod terapeutycznych i diagnostycznych chorób serca. W ostatnich kilku latach szczególną uwagę zwrócono na mikro-RNA (miRNA) jako jeden z ważniejszych regulatorów potranskrypcyjnej ekspresji genów biorących udział w prawidłowym rozwoju serca oraz w patofizjologii wielu chorób układu sercowo-naczyniowego: powstawaniu arytmii, niewydolności serca, włóknieniu serca, chorobie niedokrwiennej oraz zawale serca. miRNA są 18-23 nukleotydowymi jednoniciowymi sekwencjami niekodującego RNA, które łącząc się komplementarnie do końca 3' mRNA blokują translację białek. miRNA występują nie tylko wewnątrzkomórkowo, ale także w przestrzeni pozakomórkowej, w tym w płynach ustrojowych: surowicy, ślinie, moczu. W artykule przedstawiono najnowsze doniesienia na temat biogenezy i sekrecji miRNA, ich udziału w patofizjologii choroby niedokrwiennej i zawału serca oraz użyteczności miRNA jako biomarkerów niedokrwienia miokardium.

Słowa kluczowe:

miRNA • regulacja ekspresji genów • choroba niedokrwienności serca • zawał serca • uraz poreperfuzyjny • biomarkery martwicy miocytów

#### Summary

Coronary artery disease remain one of the leading causes of mortality in the world, indicating the need for innovative therapies and diagnosis for heart disease. MicroRNAs (miRNAs) have recently emerged as one of the central players in regulating gene expression which implicate in normal cardiac development and many pathological processes of the cardiovascular system, including cardiac arrhythmia, heart failure, cardiac fibrosis, coronary artery disease and myocardial infarction. miRNA are small noncoding RNAs 18-23 nucleotides in length that regulate expression of target genes through sequence-specific hybridization to the 3' untranslated region of messenger RNAs and block translation. miRNAs are not only found intracellularly, but also detectable outside cells, including various body fluids (i.e. serum, plasma, saliva, urine). This review will highlight recent findings in the regulation of miRNA biogenesis and secretion, modulation of the cardiovascular pathological process in CAD and AMI and the potential as non-invasive biomarkers for cardiac ischemia.

Key words:

miRNA • gene expression regulation • coronary artery disease • myocardial infarction • post reperfusion injury • biomarkers of myocytes necrosis

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1100348>

**Word count:** 3215

**Tables:** 1

**Figures:** –

**References:** 77

**Adres autora:** dr hab. n. med. Andrzej Stepulak, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Witolda Chodźki 1, 20-093 Lublin; e-mail: andrzej.stepulak@gmail.com

**Wykaz skrótów:** **AMI** – świeży zawał mięśnia sercowego (acute myocardial infarction); **Bcl2** – protoonkogen kodujący białko regulujące proces apoptozy (B-cell lymphoma 2); **CAD** – choroba niedokrwiennej serca (coronary artery disease); **CDC42** – białko regulujące cykl komórkowy (cell division cycle 42); **CK** – kinaza keratynowa (creatine kinase); **CK MB** – izoforma sercowa kinazy keratynowej; **Col1α1** – kolagen typ I alfa 1 (collagen type I alpha 1); **CTGF** – czynnik wzrostowy tkanki łącznej (connective tissue growth factor); **DII-1** – białkowy mediator komórkowy w hematopoezie (delta-like protein 1); **DNMT3** – metylotransferaza 3 DNA (DNA methyltransferase 3); **Elk-1** – białko z rodziny onkogenów ETS (ETS domain-containing protein Elk-1); **Eln** – elastyna (elastin); **Fbn1** – fibrylina 1 (fibrillin-1); **GJA1** – białko z rodziny koneksyn tworzące kanały międzykomórkowe (gap junction alpha-1 protein); **HCV** – wirus zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus); **HDL** – lipoproteiny dużej gęstości (high density lipoprotein); **HIF** – czynnik indukowany hipoksją (hypoxia inducible factor); **Hsp60, Hsp70** – białka szoku cieplnego (heat shock protein); **IGF-1** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); **IRX5** – czynnik transkrypcyjny (iroquois-class homeodomain protein); **KCNJ2** – kanał potasowy (potassium channel, Inwardly Rectifying Subfamily J Member 2); **KLF** – czynnik transkrypcyjny (Krüppel-like factor); **LDL** – lipoproteiny małej gęstości (low-density lipoprotein); **Map2k4** – kinaza 4 aktywowana miogenami (dual specificity mitogen-activated protein kinase 4); **Mcl-1** – członek rodziny białek Bcl-2 hamujących apoptozę (induced myeloid leukemia cell differentiation protein); **MET** – protoonkogen receptor dla czynnika wzrostowego hepatocytów; **MR** – magnetyczny rezonans jądrowy (magnetic resonance imaging); **NPM1** – nukleofosmina 1 (nucleophosmin-1); **NSTEMI** – zawał serca bez uniesienia odcinka ST (No ST elevation myocardial infarction); **p85α** – podjednostka regulatorowa PI3K– kinazy fosfatidyloinozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha); **PIK3R2** – podjednostka regulatorowa beta kinazy 3 fosfatidyloinozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta); **PPAR** – receptor aktywowany proliferatorami peroksyosomów (peroxisome proliferator-activated receptor gamma); **PTEN** – białko regulujące cykl komórkowy (phosphatase and tensin homolog); **qPCR** – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (quantitative polymerase chain reaction); **RFT** – reaktywne formy tlenu (ROS – reactive oxygen species); **RhoB** – rodzina białek komórkowych wiążących GTP (Ras homolog gene family, member B); **S1pr1** – receptor fosforanu sfingozyny 1 (sphingosine-1-phosphate receptor 1); **SIRT1, sirtuina-1** – NAD-zależna deacetylaza histonowa (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1); **SpreD-1** – wewnątrzkomórkowy inhibitor czynnika wzrostowego komórek endotelium – VEGF (sprouty-related, EVH1 domain containing protein 1); **Spry 1** – białko sygnałowe (sprouty homolog 1); **STEM** – zawał serca z uniesieniem odcinka ST (ST elevation myocardial infarction); **Tcl-1** – białko onkogenne (T-cell leukaemia/lymphoma 1); **THRAP1** – białko receptorowe (thyroid hormone receptor associated protein 1); **VSD** – ubytek przegrody międzykomorowej (ventricular septal defect); **YY1** – czynnik transkrypcyjny (Yin Yang 1).

## WPROWADZENIE

W ostatnich latach dzięki rozwojowi farmakoterapii oraz metod inwazyjnych i zwiększonej ich dostępności dokonał się duży postęp w leczeniu choroby niedokrwiennej serca. Choroba wieńcowa nadal jednak jest jedną z najważniejszych przyczyn zgonów oraz poważnym problemem społecznym. Poszukuje się więc nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych w celu wcześniejszej identyfikacji pacjentów wysokiego ryzyka i poprawy skuteczności leczenia. W ostatnich kilku latach szczególną uwagę zwrócono na mikro-RNA – jeden z ważniejszych potran-

skrypcyjnych regulatorów ekspresji genów. Liczne doniesienia naukowe potwierdzają także szczególną rolę miRNA w patogenezie różnych chorób serca, w tym: zaburzeń rytmu, choroby niedokrwiennej, przerostu i włóknieniu mięśnia sercowego oraz miażdżycy naczyń. Wzmocniona ekspresja lub supresja nawet pojedynczego rodzaju miRNA jest wystarczająca do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania komórek miokardium, dlatego ingerencja na poziomie miRNA może mieć znaczenie terapeutyczne [43]. W artykule podsumowano znaczenie najważniejszych rodzajów miRNA w chorobie niedokrwiennej i zawałe mięśnia sercowego.

## POWSTAWANIE miRNA I ICH ROLA W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

miRNA są endogennymi, konserwatywnymi 18-23-nukleotydowymi (najczęściej 22-nukleotydowymi) jednoniciowymi sekwencjami niekodującego RNA [6,27]. Regulują one ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym przez wpływ na degradację mRNA i represję translacji, odgrywając znaczącą rolę w procesach komórkowych typu: proliferacji, różnicowania, starzenia, apoptozy, odnowy z komórek macierzystych [15]. Do tej pory u człowieka zidentyfikowano prawie 1600 typów miRNA [38]. W początkowym etapie syntezy miRNA są transkrybowane przez polimerazę II RNA jako pierwotne transkrypty w postaci pri-miRNA. W wyniku działania jądrowego enzymu RNazy III Drosha po usunięciu części nukleotydów powstają prekursorzy pre-miRNA, które są następnie transportowane do cytoplazmy przez jądrowy czynnik transportujący eksportynę 5. W cytoplazmie pod wpływem działania RNazy III Dicer powstają dojrzałe miRNA, które są następnie wiązane z białkami z rodziny Argonaute (Ago 1-4, piwi). Najważniejszym z nich wydaje się białko Argonaute 2 mające zdolność degradacji RNA. Po wiązaniu z białkami powstają tzw. kompleksy RISC (RNA-induced silencing complex). RNazy III Dicer i Drosha biorą również udział w regulacji ekspresji miRNA [2,36]. Kompleksy RISC mogą się łączyć na zasadzie komplementarności z odpowiednim fragmentem mRNA - najczęściej nietranslacyjnego regionu 3' (tzw. 3'UTR), powodując degradację docelowego mRNA, co w konsekwencji hamuje ekspresję danego białka. Najnowsze doniesienia wskazują także na możliwość łączenia się miRNA z końcem 5' mRNA [9,40] oraz potwierdzają zdolność miRNA do wzmacniania ekspresji genu [62]. Przykładem tych właściwości miRNA jest opisana przez Robertsa i wsp. aktywacja translacji wirusa HCV przez miR-122, które łącząc się z końcem 5' wirusowego RNA wzmacnia jego replikację [53,58]. Jeden typ miRNA ma zdolność regulacji ekspresji wielu genów. Pojedynczy transkrypt mRNA może być regulowany przez jedno lub wiele typów miRNA, w zależności od liczby komplementarnych miejsc we fragmencie 3'UTR [29]. Ze względu na umiejscowienie miRNA w genomie dzieli się je na cztery grupy: I - wewnątrzgenowe miRNA - są niezależnie transkrybowane ze swoich własnych genów, II - intronowe miRNA - wywodzą się z intronów genów kodujących białka, III - eksonowe miRNA - zlokalizowane w eksonach genów kodujących białka, IV - nietranslacyjne (UTR) miRNA - powstające z fragmentów 5' lub 3' UTR genów kodujących białka. U człowieka ok. 42% stanowią miRNA wewnątrzgenowe, ok. 44% intronowe, ok. 7% eksonowe oraz <7% UTR miRNA [69]. Szacuje się, że u człowieka około 50% genów jest regulowanych za pośrednictwem miRNA [19].

Większość cząsteczek miRNA jest umiejscowiona wewnątrzkomórkowo, jednak wiele z nich znajduje się w przestrzeni pozakomórkowej, w tym w osoczu, ślinie, moczu, łzach [70]. Poza tym zmiany w stężeniu i składzie pozakomórkowych miRNA korelują z procesami chorobowymi toczącymi się w organizmie, przez co stają się one użyteczne jako biomarkery [11]. Specyficzny profil ekspresji poszczególnych typów miRNA w różnych płynach ustrojowych świadczy o tym, że nie są one uwalniane tylko biernie z martwych

lub uszkodzonych komórek, lecz jest to proces czynny, związany ze stymulacją biologiczną komórki za pośrednictwem sygnałów komórkowych [51]. Spośród różnych pozakomórkowych miRNA, które mogą odgrywać potencjalną rolę jako biomarkery w chorobie niedokrwiennej serca jednymi z najważniejszych są: mir-145, -155, -92a, -17, -126. [10]. Pozakomórkowe miRNA wykazują także dużą stabilność mimo dużej aktywności pozakomórkowej RNazy [39]. Ostatnie badania wykazały, że miRNA są chronione przez kilka mechanizmów: wydzielanie w postaci pęcherzyków, eksosomów, ciałek apoptotycznych oraz dzięki tworzeniu kompleksów z białkami, np. nukleofosfiną 1 (NPM1), która pełni funkcje transportujące w komórce między jądrem a cytoplazmą, chociaż NPM1 wykryto także w przestrzeni pozakomórkowej [66]. miRNA mogą być także transportowane przez frakcję HDL lipoprotein [63]. Funkcja pozakomórkowych miRNA polega na działaniu regionalnym, między innymi: przekazywaniu sygnałów między komórkami, modulacji angiogenezy i proliferacji oraz apoptozy [32]. W zależności od rodzaju miRNA korzyści terapeutyczne mogą być związane z indukcją bądź hamowaniem ekspresji poszczególnych miRNA. Zwiększenie ekspresji jest możliwe przez transfekcję, tj. podawanie zsyntetyzowanych miRNA za pośrednictwem odpowiednich wektorów, np. adenowirusowych.

## miRNA W FIZJOLOGII I PATOFIZJOLOGII SERCA

Dynamika ekspresji miRNA jest zróżnicowana i zależy od wielu czynników, m.in. rodzaju tkanki lub typu komórki, jej metabolizmu, zmian patofizjologicznych zachodzących w komórkach podczas procesu chorobowego. Podobnie jak w każdym organie, również w sercu znajdują się specyficzne rodzaje miRNA. Dotychczasowe badania potwierdziły kluczową rolę miRNA-1, miRNA-133, miRNA-143 w rozwoju embrionalnym serca u kręgowców [7]. Wykazano również, że brak enzymu RNA-zy III Dicer w komórkach neuroektodermy uniemożliwia prawidłową embriogenezę serca u myszy, prowadząc do takich wad wrodzonych jak: przerwanie łuku aorty, podwójna prawa komora, ubytek przegrody międzykomorowej (VSD) [26]. Spadek ekspresji miRNA-1-1 i wzrost ekspresji miRNA-181c opisano w grupie 25 pacjentów z VSD. miRNA regulują działanie genów, których produkty odpowiadają za proliferację i apoptozę komórek serca, warunkują ich kurczliwość i przewodnictwo elektryczne, odpowiadają za angiogenezę i formowanie błony wewnętrznej naczyń, a więc są niezbędne do jego prawidłowego rozwoju i funkcjonowania [34,44,56].

Specyfika „sercowych” miRNA być może pozwoli na znalezienie nowych markerów uszkodzenia kardiomiocytów oraz nowych „punktów uchwytu” w terapii chorób. Jak już wspomniano, potwierdzono duże znaczenie miRNA jako kluczowych regulatorów odgrywających rolę w patogenezie niektórych chorób układu krążenia. Odpowiednie ukierunkowanie ekspresji miRNA biorących udział w powstawaniu schorzeń serca mogłoby pozwolić na zapobieżenie lub spowolnienie postępu choroby, co wskazuje na ich duże znaczenie w potencjalnej terapii. W tabeli 1 przedstawiono rolę najważniejszych typów miRNA w fizjologii i patofizjologii serca [30].

**Tabela 1.** Rola miRNA w patofizjologii chorób serca

MiRNA	Substrat	Rola w patogenezie
let-7	trombospondyna 1	angiogeneza
miR-1	KCNJ2, GJA1	arytmie
	IGF-1	zawał serca
	Bcl2	stres związany z niedokrwieniem/reperfuzją
		prekondycjonowanie
		arytmie
	Irx5	arytmie
	Dll-1	różnicowanie komórek macierzystych serca
miR-7		schyłkowa faza niewydolności serca
miR-21	Spry 1	włóknienie serca
		stres związany z niedokrwieniem/reperfuzją
		prekondycjonowanie
	PTEN	stres związany z niedokrwieniem/reperfuzją
	PTEN, Bcl-2	restenoza po angioplastyce
miR-24		prekondycjonowanie
miR-27	trombospondyna 1	angiogeneza
miR-29	Col1a1, Col1a2, Col3a1, Fbn1, Eln	włóknienie serca
miR-30	CTGF	włóknienie serca
miR-92a	integryna α5, Sirt1, S1pr1, Map2k4	angiogeneza
miR-126	Spred1	angiogeneza
	PIK3R2	angiogeneza
miR-133	Dll-1	różnicowanie komórek macierzystych serca
	KLF15	kontrola procesów metabolicznych
	CTGF	włóknienie serca
miR-143	KLF4, myocardyna, Elk-1	wpływ na komórki mięśni gładkich
miR-145	KLF4, myocardyna, Elk-1	wpływ na komórki mięśni gładkich
miR-199a	HIF 1α, Sirt1	prekondycjonowanie
miR-206	MET	miogeneza
miR-208a	THRAP1	przerost mięśnia sercowego
		arytmie
miR-210	efryna A3	angiogeneza
miR-217		angiogeneza
miR-221/222		zgrubienie neointymy
miR-320	Hsp20	stres związany z reperfuzją/niedokrwieniem
miR-378		schyłkowa faza niewydolności serca

### ROLA miRNA W CHOROBIE NIEDOKRWIENNEJ SERCA

Obecność zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych nie zawsze daje objawy kliniczne. Nagłe jednak pęknięcie niestabilnej blaszki miażdżycowej i powstający na niej za-

krzep prowadzi do ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego, dlatego ważne jest znalezienie nowych markerów pozwalających na identyfikację pacjentów wysokiego ryzyka wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego. W badaniach z ostatnich lat wykazano rolę pozakomórkowych miRNA

jako biomarkerów w chorobie niedokrwiennej serca, jednak ich skuteczność i przydatność jest uzależniona od czułości metod używanych do wykrywania miRNA, rodzaju materiału biologicznego oraz czasu normalizacji profilu miRNA po wystąpieniu epizodu niedokrwienia [11,17].

Badania przeprowadzone w 2010 r. w grupie 36 pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową ujawniły zmiany profilu miRNA, których ekspresja odbywa się w komórkach śródbłonna naczyń. Obserwowano obniżenie poziomu miR-126, miR-17, miR-92a, miR-145, miR-155, miR-21 w surowicy za pomocą metody ilościowej qPCR. Możliwym wyjaśnieniem tych zmian jest wychwytywanie krążących miRNA przez formującą się blaszkę miażdżycową [17,60].

Znaczenie miRNA we wczesnym zdiagnozowaniu pacjentów zagrożonych wystąpieniem ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego potwierdziły badania na grupie 50 pacjentów: 25 ze stabilną i 25 z niestabilną chorobą wieńcową. U wszystkich chorych wykonano badanie koronarograficzne, stwierdzając chorobę wieńcową przynajmniej jednego naczynia (zwężenie powyżej 50% światła tętnicy wieńcowej). Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych osób. W badaniu przeprowadzono analizę ekspresji 157 miRNA izolowanych z komórek jednoczących krwi obwodowej za pomocą metody qPCR. W grupie badanej i kontrolnej wykazano różnicę w ekspresji tylko dwóch miRNA – pięciokrotny wzrost stężenia miR-135a i czterokrotny spadek stężenia miR-147. Jednocześnie wskaźnik miR-135a/miR147 był dziewiętnastokrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tych zmian jest udział powyższych miRNA w przekazywaniu sygnałów komórkowych w czasie niedokrwienia za pośrednictwem HIF (czynnika indukowanego hipoksją) oraz kadheryn. Wykazano również różnice w stężeniu miR-198 w grupie pacjentów ze stabilną i niestabilną dławicą. W drugim przypadku stężenie miR-198 było dwunastokrotnie wyższe, co może wskazywać na przydatność miR-198 w stratyfikacji ryzyka pacjentów z chorobą niedokrwinną serca [24].

Ważnym czynnikiem ryzyka choroby niedokrwiennej są zaburzenia lipidowe. Jednocześnie niektóre miRNA, tj.: miR-122, miR-370, miR-33a/b pełnią istotną rolę jako regulatory metabolizmu lipidów [16]. W badaniu 255 pacjentów z hiperlipidemią oraz 100 zdrowych osób oceniano związek zmian ekspresji miRNA w surowicy krwi z występowaniem choroby niedokrwiennej serca, potwierdzonej w badaniu koronarograficznym w korelacji z profilem lipidowym. Stwierdzono znacznie podwyższony poziom miR-122 i miR-370 u pacjentów z hiperlipidemią oraz dodatnią korelację ze stężeniem cholesterolu całkowitego, triglicerydów oraz LDL. Wykazano również związek podwyższonego poziomu powyższych miRNA z obecnością i zaawansowaniem zmian miażdżycowych w angiografii [20].

Kolejnym mechanizmem ważnym w patogenezie choroby niedokrwiennej serca jest aktywacja płytek krwi i powstawanie zakrzepu na pękniętej blaszce miażdżycowej. W badaniu 12 młodych pacjentów z chorobą wieńcową oceniano poziom ekspresji miRNA uzyskanych z płytek krwi metodą

qPCR. Stwierdzono nadekspresję miR-340, miR-451, miR-454, miR-545:9, miR-615-5p, miR-624 oraz znacznie obniżoną ekspresję miR-1280 w porównaniu z grupą kontrolną [59].

Bardzo istotną rolę w leczeniu choroby niedokrwiennej oraz zawału serca odgrywają leki przeciwplatekcyjne, tj: aspiryna, kłopidogrel, prasugrel i tikagrelor. W badaniu przeprowadzonym przez Zampetaki i wsp. oceniano wpływ terapii przeciwplatekcyjnej na profil miRNA krążących w surowicy. W grupie 9 ochotników, którą stanowili mężczyźni przed 40 rokiem życia, analizowano poziom 92 miRNA. Pierwsze oznaczenie profilu miRNA wykonano przed włączeniem leków przeciwplatekcyjnych, następnie po tygodniu przyjmowania prasugrelu w dawce 10 mg na dobę, w drugim tygodniu do prasugrelu dodano aspirynę w dawce 75 mg na dobę, a w trzecim zwiększono dawkę aspiryny do 300 mg na dobę. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem dawki leków przeciwplatekcyjnych zmniejszał się poziom następujących krążących miRNA: miR-126, miR-150, miR-191, miR-223. Badanie to ma duże znaczenie, ponieważ analiza profilu miRNA być może pozwoli na ustalenie stopnia zahamowania aktywności płytek oraz indywidualne dopasowanie dawki leków przeciwplatekcyjnych dla każdego chorego. Należy pamiętać, że zbyt duże zahamowanie aktywności płytek może prowadzić do zagrażających życiu krwawień [71].

Podsumowując, przydatność miRNA jako biomarkerów we wczesnym rozpoznaniu i ocenie czynników ryzyka rozwoju choroby wieńcowej oraz jej zaawansowania wydaje się duża, jednak wymaga dalszych badań na większych grupach chorych.

#### MI RNA W ZAWALE MIĘŚNIA SERCOWEGO

Niewystarczające zaopatrzenie komórek serca w krew w wyniku zawału powoduje stres oksydacyjny, martwicę i zapalenie miokardium oraz następowy patologiczny remodeling i dysfunkcję lewej komory [25]. Wczesna reperfuzja w wyniku zastosowanego leczenia trombolitycznego lub inwazyjnego prowadzi z jednej strony do ocalenia niedokrwionego regionu, z drugiej powoduje powstanie tzw. urazu związanego z niedokrwieniem i reperfuzją. Jest on spowodowany nagłym wzrostem dopływu tlenu do uprzednio niedokrwionych tkanek, czego konsekwencją jest zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) pochodzących z łańcucha oddechowego. RFT w wielu przypadkach powodują nieodwracalne uszkodzenie błon komórkowych kardiomiocytów, ich apoptozę, a w następstwie niekorzystną przebudowę mięśnia lewej komory serca (tzw. patologiczny remodeling). Wyróżniono cztery typy urazów związanych z reperfuzją: I – martwica miocytów, II – uszkodzenie mikrokrążenia, III – „ogłuszenie” miokardium – przedłużony okres dysfunkcji skurczowej miocytów, IV – arytmie poreperfuzyjne [31]. Molekularny mechanizm odpowiedzialny za regulację ekspresji genów w czasie urazu związanego z reperfuzją nie jest w pełni poznany, a próby wyciągnięcia wniosków i ich wykorzystanie w praktyce klinicznej zakończyły się niepowodzeniem. Wiadomo natomiast, że stres oksydacyjny prowadzi do deregulacji wytwarzania białek komórkowych, w tym także enzymów ważnych dla powsta-

wania dojrzałych miRNA – Rnazy III Dicer i Drosha, wpływając na zmiany w ekspresji miRNA. Profil ekspresji miRNA w przebiegu zawału mięśnia sercowego jest zależny od czasu jaki upłynął od wystąpienia niedokrwienia. We wczesnym okresie prawdopodobnie zależy od apoptozy i nasilonego stresu oksydacyjnego, w późniejszym okresie istotną rolę w zmianie profilu pełni pozawałowy remodeling i uruchomienie mechanizmów kompensacyjnych [77]. Ze względu na różnorodność komórek mięśnia sercowego, udział miRNA w patomechanizmie zawału jest trudny do oceny. W badaniach autopsyjnych fragmentów pozawałowych ludzkich serc stwierdzono zmniejszoną ekspresję miR-1 i miR-133 [4]. Wczesniejsze badania na myszach ujawniły przeciwstawne funkcje tych miRNA w regulacji przeżycia miocytów w odpowiedzi na niedokrwienie; pierwsze z nich wzmacnia apoptozę, drugie ją hamuje. Dzieje się tak, ponieważ zwiększona ekspresja miR-1 powoduje supresję genów kodujących białka odpowiedzialne za hamowanie apoptozy Hsp60, Hsp70, a także jest przyczyną potranskrypcyjnej supresji białek Bcl2 i IGF-1 przeciwdziałających apoptozie. miR-133 natomiast zmniejsza ekspresję genu kodującego kaspazę 9, głównego efektoru procesu apoptozy [72,74]. Dane te sugerują, że obniżenie poziomu „sercowego” miRNA-1 przy jednoczesnym zwiększeniu miRNA-133 podczas epizodu niedokrwienia serca prawdopodobnie ogranicza ryzyko wystąpienia urazu związanego z niedokrwieniem i reperfuzją.

Zmiany w profilu kolejnego rodzaju miRNA, tj. miR-21 nie są jednoznaczne. W badaniach *in vitro* wykazano, że zwiększona ekspresja miR-21 podczas pozawałowego remodelingu hamuje angiogenezę przez wpływ na proliferację i migrację komórek endotelium za pośrednictwem RhoB [55]. Jednocześnie angiogeneza naczyń wieńcowych jest bardzo ważnym mechanizmem kompensacyjnym w przywróceniu prawidłowej funkcji miokardium po zawale serca, więc zahamowanie funkcji miR-21 w tym okresie mogłoby mieć wpływ kardioprotekcyjny. W modelach zwierzęcych zwiększona ekspresja miR-21 w granicznej strefie okołozawałowej, bogatej w fibroblasty powodowała aktywację włóknienia przez hamowanie ekspresji genu PTEN i nasilenie aktywności metaloproteiny 2 [54]. Sugeruje to, iż hamowanie ekspresji miR-21 może zmniejszyć niekorzystne włóknienie po zawale. Ograniczenie jednak strefy zawału w szczurzych sercach może być powiązane z indukowaną zwiększoną ekspresją miR-21 osiągniętą przez transfekcję za pośrednictwem wektora adenowirusowego [12]. Inni badacze zwrócili także uwagę na niekorzystną rolę zmniejszonej ekspresji miRNA-21 w formowaniu zmian miażdżycowych w śródbłonku po angioplastyce balonowej tętnicy szyjnej u szczurów z udziałem PTEN i Bcl-2 [28]. Ważną rolę w powstawaniu restenozy w stencie po angioplastyce wieńcowej stwierdzono dla miR-143 i miR-145, których obniżoną zawartość w śródbłonku naczyń wieńcowych wykryto w badaniach autopsyjnych pacjentów poddanych angioplastyce ze stentem [48].

Ważnym w patogenezie zawału serca typem miRNA jest rodzina miR-29 (a,b,c). Podobnie jak w przypadku miR-21, ekspresja miR-29 jest większa w fibroblastach niż w kardiomiocytach. Wykazano zmniejszoną ekspresję miR-29 po zawale serca w strefie granicznej niedokrwienia. Ten typ miRNA jest

odpowiedzialny za regulację genów kodujących białka związane z włóknieniem, w tym kolageny, fibryliny, lamininy, elastyny i integryny. W badaniach *in vivo* i *in vitro* nadekspresja miR-21 powodowała zmniejszenie translacji wymienionych białek [61]. Oprócz funkcji regulatora genów związanych z włóknieniem miR-29 negatywnie wpływa na regulację kilku hamujących apoptozę genów kodujących białka: Tcl-1, Mcl-1, YY1, p85 $\alpha$ , CDC42 oraz DNMT3 [41,45,46,65].

Podawanie pioglitazonu – agonisty receptorów PPAR, znacząco obniżało zawartość miR-29 w sercu szczura, co pozytywnie wpływało na ochronę przed urazem związanym z niedokrwieniem/reperfuzją [73]. W przypadku miRNA-24 istnieją sprzeczne doniesienia na temat właściwości kardioprotekcyjnych, wymaga to dalszych badań [18,49,77]. W niedokrwionej strefie zawału dochodzi do kompensacyjnego przerostu miokardium, co jest zjawiskiem niekorzystnym i może wpływać na przebudowę oraz dysfunkcję lewej komory serca (remodeling) [52]. Wśród typów miRNA, które spełniają ochronną rolę w poreperfuzyjnym remodelingu jest miR-126, który stymuluje angiogenezę przez supresję genu kodującego białko Spred-1 oraz regenerację miokardium z komórek macierzystych [67,76].

miR-210 również stymuluje angiogenezę oraz hamuje apoptozę związaną ze stresem oksydacyjnym [14,42].

miR-494 oraz miR-499 także wykazują działanie ochronne, hamując apoptozę związaną ze stresem poreperfuzyjnym [57,68]. Możliwość regeneracji niedokrwionego miokardium przez neowaskularyzację ogranicza miR-92a, które jak dowiedziono w badaniach na modelach zwierzęcych, hamuje angiogenezę przez supresję genów kodujących białka z nią związane: Sirtuiny 1, podjednostki  $\alpha 5$  integryny oraz Map2k4 [3]. Wpływ na mięsień sercowy w przypadku miR-199a zależy od czasu wystąpienia ischemii. Zmniejszona ekspresja miR-199a występująca w czasie niedokrwienia nasila apoptozę przez stymulujący wpływ na Sirtuinę-1, natomiast jej wystąpienie przed niedokrwieniem ma działanie ochronne [50].

Podsumowując, wśród miRNA, które chronią miocyty przed apoptozą wywołaną urazem związanym z niedokrwieniem/reperfuzją wymienia się: miR-21, -24, -133, -210, -494, -499. Sprzyjające apoptozie są: miR-1, -29, -199a. Włóknienie miokardium może być regulowane przez miR-29 oraz -21. Z kolei miR-126 i -210 indukują angiogenezę w odpowiedzi na uraz związany z reperfuzją, natomiast miR-24, -92a hamują pozawałową neoangiogenezę [77].

#### MI RNA JAKO MARKERY ZAWAŁU MIĘŚNIA SERCOWEGO

Obecnie stosowanym w praktyce klinicznej markerem zawału mięśnia sercowego pozostaje troponina, która wykazuje dużą czułość i swoistość we wczesnej diagnozie martwicy miokardium. Nie jest ona jednak markerem doskonałym. Diagnostyczny wzrost jej stężenia pojawia się dopiero po około 6 godzinach od wystąpienia epizodu niedokrwienia, poza tym jej podwyższone wartości mogą występować w innych schorzeniach, np. niewydolności nerek. Dlatego wciąż

istnieje potrzeba znalezienia nowego biomarkera, który pozwoliłby na jeszcze wcześniejsze rozpoznanie i wykazywałby większą swoistość oraz pozwoliłby na dokładniejszą identyfikację pacjentów wysokiego ryzyka w chwili przyjęcia do szpitala [47].

W świeżym zawałe wykazywano różną ekspresję poszczególnych miRNA. Porównywano wartość diagnostyczną swoistych dla serca miRNA z klasycznymi markerami niedokrwienia: troponiny, CK i CK-MB. Potwierdzono silny wzrost zawartości miR-208b oraz miR-499 w surowicy u 32 pacjentów z zawałem w porównaniu z grupą kontrolną oraz ich dodatnią korelację ze stężeniem troponiny T i kinazy fosfokreatynowej (CK) [8]. Podobne wyniki uzyskano w innym badaniu, stwierdzając silną korelację miR-208b i miR-499-5p z troponiną T na większej grupie 319 pacjentów z zawałem serca [22]. Zwrócono także uwagę na zależność ekspresji krążących miR-208b i miR-499 od innych czynników, tj. wiek i płeć [23]. Cheng i wsp. wykazali wzrost ekspresji miR-1 w surowicy pacjentów w ostrym okresie niedokrwienia miokardium oraz dodatnią korelację z poziomem CK-MB [5]. Inni badacze, oznaczając ekspresję miR-1 w surowicy 93 pacjentów z zawałem wykazali jego istotny wzrost w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych osób, jednak bez korelacji z klasycznymi markerami niedokrwienia [1]. Gidlof i wsp. w swoim badaniu nie stwierdzili istotnej różnicy w profilu miR-1 u pacjentów z zawałem w porównaniu z grupą kontrolną, co może być tłumaczone różną eliminacją nerkową tej miRNA [21]. W analizie poziomu miR-1,-133a,-208b,-499 w surowicy 67 pacjentów; stwierdzono znaczący wzrost ich zawartości w STEMI i NSTEMI w porównaniu z grupą kontrolną, nie wykazano jednak ich większej przydatności jako biomarkerów w porównaniu z troponiną T [35]. Ważną cechą jaką powinien charakteryzować się dobry biomarker niedokrwienia miokardium jest wczesny czas jego pojawienia się od czasu wystąpienia ischemii i odpowiednio długi okres półtrwania w surowicy, pozwalający na potwierdzenie rozpoznania i śledzenie procesu zdrowienia/leczenia [33]. Interesujące badanie prospektywne przeprowadzili Zampetaki i wsp. w rozpoczętym w 1990 r. eksperymencie, losowo wybranym pacjentom (125 kobietom i mężczyznom w wieku 40-79 lat) pobierano krew w odstępach 5-letnich (1995, 2000, 2005 r.) oraz w razie wystąpienia u nich zawału serca. Badanie miało

na celu ocenę zmian w profilu miRNA, które sprzyjałyby wystąpieniu ostrego niedokrwienia. Spośród uczestników, u których w czasie 10-letniej obserwacji wystąpił zawał serca (5,3%) stwierdzono zmiany w profilu trzech miRNA: -126, -197 oraz -223 [75].

Analizowano również zależność ekspresji miRNA od czasu wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego. W badaniach profilu miR-208 w surowicy 33 pacjentów ze świeżym zawałem mięśnia sercowego i grupie kontrolnej 30 zdrowych osób, wykazano, że miR-208 jest obecne w surowicy u wszystkich pacjentów po czterech godzinach od wystąpienia pierwszych objawów choroby, podczas gdy klasyczny marker troponina I (cTnI) w dalszym ciągu pozostawał w normie [64]. Long i Wang zaobserwowali również zwiększoną ekspresję miR-30a w 4, 8 i 12 godzinie od wystąpienia objawów zawału mięśnia sercowego, a także zwiększoną ekspresję miR-195 w 8 i 12 godzinie od wystąpienia epizodu niedokrwienia oraz spadek ekspresji let-7b w czasie 4, 8, 12, 24, 48, 72 godzin i tydzień od początkowych objawów zawału. Stężenie w surowicy miR-30a, miR-195 i let-7b wykazywało silną korelację ze stężeniem troponiny I. Analizując jednocześnie zawartość tych trzech miRNA, uzyskano 94% czułość i 90% swoistość w identyfikacji pacjentów z zawałem mięśnia sercowego [37].

Oceniając użyteczność miRNA jako markerów w prognozie klinicznej pacjentów po zawałe serca, wykazano dodatnią korelację między zwiększoną ekspresją miR-208b i miR-499-5p w surowicy; a spadkiem frakcji skurczowej lewej komory w badaniu ECHO serca oraz zwiększoną śmiertelnością w obserwacji 30-dniowej w grupie 319 chorych [22]. Podobną wartość kliniczną wykazano w przypadku miR-133a, którego zwiększona ekspresja korelowała z rozmiarem zawału w MRI i wiązała się ze wzrostem śmiertelności oraz większym ryzykiem wystąpienia niewydolności serca w 6 miesięcy od wystąpienia STEMI w grupie 216 pacjentów [13].

Podsumowując, poznanie zasad wpływu miRNA na procesy patofizjologiczne może pomóc w lepszym zrozumieniu mechanizmów prowadzących do śmierci kardiomiocytów podczas niedokrwienia. Badania nad miRNA, których ekspresja istotnie zmienia się we wczesnej fazie zawału mięśnia sercowego, mogą znacznie zwiększyć możliwości nie tylko wczesnego diagnozowania chorób serca, ale też prognozowania i wprowadzania terapii.

## PIŚMIENNICTWO

[1] Ai J., Zhang R., Li Y., Pu J., Lu Y., Jiao J., Li K., Yu B., Li Z., Wang R., Wang L., Li Q., Wang N., Shan H., Yang B.: Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 391: 73-77

[2] Bauersachs J., Thum T.: Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs. *Circ. Res.*, 2011; 109: 334-347

[3] Bonauer A., Carmona G., Iwasaki M., Mione M., Koyanagi M., Fischer A., Burchfield J., Fox H., Doebele C., Ohtani K., Chavakis E., Potente M., Tjwa M., Urbich C., Zeiher A.M., Dimmeler S.: MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*, 2009; 324: 1710-1713

[4] Bostjancic E., Zidar N., Stajer D., Glavac D.: MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology*, 2010; 115: 163-169

[5] Cheng Y., Tan N., Yang J., Liu X., Cao X., He P., Dong X., Qin S., Zhang C.: A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin. Sci.*, 2010; 119: 87-95

[6] Cordes K.R., Srivastava D.: MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ. Res.*, 2009; 104: 724-732

[7] Cordes K.R., Srivastava D., Ivey K.N.: MicroRNAs in cardiac development. *Pediatr. Cardiol.*, 2010; 31: 349-356

- [8] Corsten M.F., Dennert R., Jochems S., Kuznetsova T., Devaux Y., Hofstra L., Wagner D.R., Staessen J.A., Heymans S., Schroen B.: Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, 2010; 3: 499-506
- [9] Da Sacco L., Masotti A.: Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of microRNAs binding to 5' untranslated region. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012; 14: 480-495
- [10] Deddens J.C., Colijn J.M., Oerlemans M.I., Pasterkamp G., Chamuleau S.A., Doevendans P.A., Sluijter J.P.: Circulating microRNAs as novel biomarkers for the early diagnosis of acute coronary syndrome. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 2013; 6: 884-898
- [11] Dimmeler S., Zeiher A.M.: Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases? *Eur. Heart J.*, 2010; 31: 2705-2707
- [12] Dong S., Cheng Y., Yang J., Li J., Liu X., Wang X., Wang D., Krall T.J., Delphin E.S., Zhang C.: MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 29514-29525
- [13] Eitel I., Adams V., Dieterich P., Fuernau G., de Waha S., Desch S., Schuler G., Thiele H.: Relation of circulating microRNA-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST-elevation myocardial infarction. *Am. Heart J.*, 2012; 164: 706-714
- [14] Fasanaro P., D'Alessandra Y., Di Stefano V., Melchionna R., Romani S., Pompilio G., Capogrossi M.C., Martelli F.: MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 15878-15883
- [15] Fazi F., Nervi C.: MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc. Res.*, 2008; 79: 553-561
- [16] Fernandez-Hernando C., Suarez Y., Rayner K.J., Moore K.J.: MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2011; 22: 86-92
- [17] Fichtlscherer S., De Rosa S., Fox H., Schwietz T., Fischer A., Liebertrau C., Weber M., Hamm C.W., Roxe T., Muller-Ardogan M., Bonauer A., Zeiher A.M., Dimmeler S.: Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ. Res.*, 2010; 107: 677-684
- [18] Fiedler J., Jazbutyte V., Kirchmaier B.C., Gupta S.K., Lorenzen J., Hartmann D., Galuppo P., Kneitz S., Pena J.T., Sohn-Lee C., Loyer X., Soutschek J., Brand T., Tuschl T., Heineke J., Martin U., Schulte-Merker S., Ertl G., Engelhardt S., Bauersachs J., Thum T.: MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*, 2011; 124: 720-730
- [19] Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B., Bartel D.P.: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.*, 2009; 19: 92-105
- [20] Gao W., He H.W., Wang Z.M., Zhao H., Lian X.Q., Wang Y.S., Zhu J., Yan J.J., Zhang D.G., Yang Z.J., Wang L.S.: Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease. *Lipids Health Dis.*, 2012; 11: 55
- [21] Gidlof O., Andersson P., van der Pals J., Gotberg M., Erlinge D.: Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*, 2011; 118: 217-226
- [22] Gidlof O., Smith J.G., Miyazu K., Gilje P., Spencer A., Blomquist S., Erlinge D.: Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc. Disord.*, 2013; 13: 12
- [23] Goretti E., Vausort M., Wagner D.R., Devaux Y.: Association between circulating microRNAs, cardiovascular risk factors and outcome in patients with acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.*, 2013; 168: 4548-4550
- [24] Hoekstra M., van der Lans C.A., Halvorsen B., Gullestad L., Kuiper J., Aukrust P., van Berkel T.J., Biessen E.A.: The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 394: 792-797
- [25] Hori M., Nishida K.: Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, 2009; 81: 457-464
- [26] Huang Z.P., Chen J.F., Regan J.N., Maguire C.T., Tang R.H., Dong X.R., Majesky M.W., Wang D.Z.: Loss of microRNAs in neural crest leads to cardiovascular syndromes resembling human congenital heart defects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010; 30: 2575-2586
- [27] Jaguszewski M., Osipova J., Ghadri J.R., Napp L.C., Widera C., Franke J., Fijalkowski M., Nowak R., Fijalkowska M., Volkmann I., Katus H.A., Wollert K.C., Bauersachs J., Erne P., Luscher T.F., Thum T., Templin C.: A signature of circulating microRNAs differentiates takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.*, 2013 (w druku)
- [28] Ji R., Cheng Y., Yue J., Yang J., Liu X., Chen H., Dean D.B., Zhang C.: MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ. Res.*, 2007; 100: 1579-1588
- [29] Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labouirie E., Reinert K.L., Brown D., Slack F.J.: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 2005; 120: 635-647
- [30] Kartha R.V., Subramanian S.: MicroRNAs in cardiovascular diseases: biology and potential clinical applications. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 2010; 3: 256-270
- [31] Kloner R.A.: Does reperfusion injury exist in humans? *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1993; 21: 537-545
- [32] Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., Matsuki Y., Ochiya T.: Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 17442-17452
- [33] Li C., Pei F., Zhu X., Duan D.D., Zeng C.: Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial infarction. *Clin. Biochem.*, 2012; 45: 727-732
- [34] Li J., Cao Y., Ma X.J., Wang H.J., Zhang J., Luo X., Chen W., Wu Y., Meng Y., Yuan Y., Ma D., Huang G.Y.: Roles of miR-1-1 and miR-181c in ventricular septal defects. *Int. J. Cardiol.*, 2013; 168: 1441-1446
- [35] Li Y.Q., Zhang M.F., Wen H.Y., Hu C.L., Liu R., Wei H.Y., Ai C.M., Wang G., Liao X.X., Li X.: Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013; 68: 75-80
- [36] Liu X., Jin D.Y., McManus M.T., Mourelatos Z.: Precursor microRNA-programmed silencing complex assembly pathways in mammals. *Mol. Cell*, 2012; 46: 507-517
- [37] Long G., Wang F., Duan Q., Yang S., Chen F., Gong W., Yang X., Wang Y., Chen C., Wang D.W.: Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction. *PLoS One*, 2012; 7: e50926
- [38] miRBase: the microRNA database. <http://www.mirbase.org> (31.01.2014)
- [39] Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogossova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W., Knudsen B.S., Stirewalt D.L., Gentleman R., Vessella R.L., Nelson P.S., Martin D.B., Tewari M.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 10513-10518
- [40] Moretti F., Thermann R., Hentze M.W.: Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA*, 2010; 16: 2493-2502
- [41] Mott J.L., Kobayashi S., Bronk S.F., Gores G.J.: miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, 2007; 26: 6133-6140
- [42] Mutharasan R.K., Nagpal V., Ichikawa Y., Ardehali H.: microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011; 301: H1519-H1530



- [43] Pan Z.W., Lu Y.J., Yang B.F.: MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2010; 31: 1-9
- [44] Papoutsidakis N., Deftereos S., Kaoukis A., Bouras G., Giannopoulos G., Theodorakis A., Angelidis C., Hatzis G., Stefanadis C.: MicroRNAs and the heart: small things do matter. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2013; 13: 216-230
- [45] Park S.Y., Lee J.H., Ha M., Nam J.W., Kim V.N.: miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16: 23-29
- [46] Pekarsky Y., Santanam U., Cimmino A., Palamarchuk A., Efanov A., Maximov V., Volinia S., Alder H., Liu C.G., Rassenti L., Calin G.A., Hagan J.P., Kipps T., Croce C.M.: Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.*, 2006; 66: 11590-11593
- [47] Pleister A., Selemion H., Elton S.M., Elton T.S.: Circulating miRNAs: novel biomarkers of acute coronary syndrome? *Biomark. Med.*, 2013; 7: 287-305
- [48] Popovich I.M.: The role of micro-RNA/143/145 in evolution of intra-stent restenosis. *Kardiologija*, 2011; 51: 17-21
- [49] Qian L., Van Laake L.W., Huang Y., Liu S., Wendland M.F., Srivastava D.: miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *J. Exp. Med.*, 2011; 208: 549-560
- [50] Rane S., He M., Sayed D., Vashistha H., Malhotra A., Sadoshima J., Vatner D.E., Vatner S.F., Abdellatif M.: Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ. Res.*, 2009; 104: 879-886
- [51] Recchioni R., Marcheselli F., Olivieri F., Ricci S., Procopio A.D., Antonicelli R.: Conventional and novel diagnostic biomarkers of acute myocardial infarction: a promising role for circulating microRNAs. *Biomarkers*, 2013; 18: 547-558
- [52] Reichek N., Parcham-Azad K.: Reperfusion injury putting the genie back in the bottle? *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2010; 55: 1206-1208
- [53] Roberts A.P., Lewis A.P., Jopling C.L.: miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: 7716-7729
- [54] Roy S., Khanna S., Hussain S.R., Biswas S., Azad A., Rink C., Gnyawali S., Shilo S., Nuovo G.J., Sen C.K.: MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc. Res.*, 2009; 82: 21-29
- [55] Sabatel C., Malvaux L., Bovy N., Deroanne C., Lambert V., Gonzalez M.L., Colige A., Rakic J.M., Noel A., Martial J.A., Struman I.: MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One*, 2011; 6: e16979
- [56] Scalbert E., Bril A.: Implication of microRNAs in the cardiovascular system. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2008; 8: 181-188
- [57] Shieh J.T., Huang Y., Gilmore J., Srivastava D.: Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One*, 2011; 6: e19481
- [58] Shimakami T., Yamane D., Jangra R.K., Kempf B.J., Spaniel C., Barton D.J., Lemon S.M.: Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; 109: 941-946
- [59] Sondermeijer B.M., Bakker A., Halliani A., de Ronde M.W., Marquart A.A., Tijssen A.J., Mulders T.A., Kok M.G., Battjes S., Maiwald S., Sivapalaratnam S., Trip M.D., Moerland P.D., Meijers J.C., Creemers E.E., Pinto-Sietsma S.J.: Platelets in patients with premature coronary artery disease exhibit upregulation of miRNA340\* and miRNA624\*. *PLoS One*, 2011; 6: e25946
- [60] Sun X., Zhang M., Sanagawa A., Mori C., Ito S., Iwaki S., Satoh H., Fujii S.: Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: correlation with LDL cholesterol. *Thromb. J.*, 2012; 10: 16
- [61] van Rooij E., Sutherland L.B., Thatcher J.E., DiMaio J.M., Naseem R.H., Marshall W.S., Hill J.A., Olson E.N.: Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 13027-13032
- [62] Vasudevan S.: Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2012; 3: 311-330
- [63] Vickers K.C., Palmisano B.T., Shoucri B.M., Shamburek R.D., Remaley A.T.: MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, 2011; 13: 423-433
- [64] Wang G.K., Zhu J.Q., Zhang J.T., Li Q., Li Y., He J., Qin Y.W., Jing Q.: Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.*, 2010; 31: 659-666
- [65] Wang H., Garzon R., Sun H., Ladner K.J., Singh R., Dahlman J., Cheng A., Hall B.M., Qualman S.J., Chandler D.S., Croce C.M., Guttridge D.C.: NF-kB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*, 2008; 14: 369-381
- [66] Wang K., Zhang S., Weber J., Baxter D., Galas D.J.: Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 2010; 38: 7248-7259
- [67] Wang S., Aurora A.B., Johnson B.A., Qi X., McAnally J., Hill J.A., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N.: The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev. Cell*, 2008; 15: 261-271
- [68] Wang X., Zhang X., Ren X.P., Chen J., Liu H., Yang J., Medvedovic M., Hu Z., Fan G.C.: MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation*, 2010; 122: 1308-1318
- [69] Wang Z.: MicroRNA: a matter of life or death. *World J. Biol. Chem.*, 2010; 1: 41-54
- [70] Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K.: The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.*, 2010; 56: 1733-1741
- [71] Willeit P., Zampetaki A., Dudek K., Kaudewitz D., King A., Kirkby N.S., Crosby-Nwaobi R., Prokopi M., Drozdov I., Langley S.R., Sivaprasad S., Markus H.S., Mitchell J.A., Warner T.D., Kiechl S., Mayr M.: Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ. Res.*, 2013; 112: 595-600
- [72] Xu C., Lu Y., Pan Z., Chu W., Luo X., Lin H., Xiao J., Shan H., Wang Z., Yang B.: 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
- [73] Ye Y., Hu Z., Lin Y., Zhang C., Perez-Polo J.R.: Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, 2010; 87: 535-544
- [74] Yu X.Y., Song Y.H., Geng Y.J., Lin Q.X., Shan Z.X., Lin S.G., Li Y.: Glucose induces apoptosis of cardiomyocytes via microRNA-1 and IGF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 376: 548-552
- [75] Zampetaki A., Willeit P., Tilling L., Drozdov I., Prokopi M., Renard J.M., Mayr A., Weger S., Schett G., Shah A., Boulanger C.M., Willeit J., Chowniczek P.J., Kiechl S., Mayr M.: Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2012; 60: 290-299
- [76] Zhang Q., Kandic I., Kutryk M.J.: Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011; 405: 42-46
- [77] Zhu H., Fan G.C.: Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. *Cardiovasc. Res.*, 2012; 94: 284-292

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.