



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА**

**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
ВТОРА КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
УС ПО ХЕМАТОЛОГИЯ**

Д-р Свилена Ангелова Атанасова

**РОЛЯ НА ПОДБРАНИ ПЛАЗМЕНИ МИКРО
РНК-И КАТО ДИАГНОСТИЧНИ И
ПРОГНОСТИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ
МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕН СИНДРОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „доктор”
Докторска програма “Хематология и преливане на кръв”

Научен ръководител:

Проф. д-р Илина Димитрова Мичева, д.м.

Варна, 2025 г.

Дисертационният труд е представен в обем от 176 страници и съдържа 29 таблици и 19 фигури. Литературната справка включва 290 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден на открито заседание на Катедрен съвет на Втора катедра по вътрешни болести при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна (протокол на № 2/19.02.2025 г.). Приет е и насочен за защита пред Научно жури в състав:

Външни членове:

1. Проф. д-р Жанет Грудева-Попова, д.м.
2. Проф. д-р Георги Балаценко, д.м.
3. Доц. д-р Иван Киндеков, д.м.

Вътрешни членове:

4. Доц. д-р Трифон Червенков, д.м.
5. Доц. д-р Елеонора Димитрова-Господинова, д.м.

Резервни членове:

1. Доц. д-р Антонио Антонов, д.м.
2. Проф. д-р Николай Цонев, д.м.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 28.05.2025г.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения на кирилица:	7
Използвани съкращения на латиница:	7
I. Въведение	9
II. Цел и задачи на изследването	12
1. Цел	12
2. Задачи	12
III. Материали и методи	14
1. Материална база за реализиране на дисертационния труд	14
2. Изследвани лица	14
3. Подбор на пациенти	14
3.1. Критерии за включване:	15
3.2. Критерии за изключване:	15
4. Подбор на здрави контроли	15
5. Рутинни клинични изследвания. Получаване и съхраняване на проби. Методи на анализ	15
5.1. Специфични методи на изследване	16
6. Статистически анализ	20
IV. Резултати	24
1. Демографски и клинико-лабораторни характеристики на пациентите	24
2. Анализ на нивата на микроРНКите при пациенти и здрави контроли	32
2.1 МикроРНК-22	35
2.2 МикроРНК-144	36
2.3 МикроРНК-16	37
2.4 Let-7a	38
2.5 МикроРНК-451a	39
3. Определяне на прагови стойности за микроРНК със статистически значима разлика между пациенти с МДС и здрави контроли	42

3.1 Анализ на прагови стойности за miP-144	42
3.2 Анализ на прагови стойности за miP-16	43
3.3 Анализ на прагови стойности за miP-let7a	44
3.4 Анализ на прагови стойности за miP-451a	45
4. Сравнителен анализ по демографски показатели:	46
4.1 Сравнителен анализ по пол	46
4.2 Анализ на нивата на микроРНКите спрямо възрастта	48
5. Сравнителен анализ между нивата на микроРНКите и различни характеристики на заболяването	49
5.1 Анализ на нивата на микроРНКи при различните подтипове МДС	49
5.2 Анализ на микроРНКи според рисковата стратификация на пациентите по R-IPSS скала	50
5.3 Анализ на микроРНКи според цитогенетичният риск	51
6. Корелационен анализ за изследване на взаимовръзки между избраните микроРНКи и различни хематологични и биохимични показатели при пациенти с МДС	53
6.1 Корелационен анализ между избраните микроРНКи	54
6.2 Корелационен анализ между микроРНКи и лабораторни показатели	59
6.3 Корелационен анализ между нивата на микроРНКи и процента бласти в костния мозък	64
7. Определяне на диагностична стойност на подбрани miP	65
7.1 Описание на резултатите за отделните микроРНКи	67
7.2 Оценка на предиктивната стойност на микроРНКите чрез регресионен анализ	70
8. Оценка на предиктивната роля на микроРНКите при	

разграничаване на висок и нисък риск МДС според R-IPSS	76
8.1 LASSO анализ на петте микроРНК	76
8.2 Еднофакторен логистичен регресионен анализ на let-7a	77
9. Определяне на предиктивната стойност на микроРНКите за различните типове МДС	79
9.1 LASSO анализ на петте микроРНК	79
9.2 Еднофакторен логистичен регресионен анализ на let-7a	81
10. Определяне прогностичната стойност на избраните плазмени микроРНК	83
10.1 Cox proportional анализ за miP-22	83
10.2 Cox proportional анализ за miP-144	84
10.3 Cox proportional анализ за miP-16	84
10.4 Cox proportional анализ за let-7a	85
10.5 Cox proportional анализ за miP-451a	85
10.6 Cox proportional анализ за miP-144 и miP-16	86
10.7 Обобщение на анализа за прогностичната стойност на микроРНКите	87
V. Дискусия	89
1. Въведение	89
2. Анализ на нивата на експресия на микроРНКите при различни групи пациенти с МДС	90
2.1 МикроРНК-22	90
2.2 МикроРНК-144	92
2.3 МикроРНК-16	94
2.4 Let-7a	95
2.5 МикроРНК-451a	98
3. Корелации между микроРНКите и клинични параметри	101
4. Предиктивната стойност на микроРНКите при МДС	

109

4.1 Диагностичен потенциал на микроРНКите 109

4.2 Прогностична стойност спрямо преживяемостта
115

5. Заключение 118

VI. Приноси: 121

VII. Научни публикации по темата 123

VIII. Благодарности 124

Използвани съкращения на кирилица:

ЛДХ – Лактатдехидрогеназа

МДС – Миелодиспластичен синдром

ОМЛ – Остра миелоидна левкемия

РНК – Рибонуклеинова киселина

иРНК – Информационна рибонуклеинова киселина

миРНК – МикроРНК

ХСК – Хематопоеетични стволови клетки

Използвани съкращения на латиница:

AIC – Akaike Information Criterion

APC – Adenomatous Polyposis Coli

AUC – Area Under the Curve

BCL2 – B-Cell Lymphoma 2

ERK1/2 – Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2

FoxO – Forkhead Box O

GATA1 – GATA Binding Protein 1

GLUT – Glucose Transporter

HR – Hazard Ratio

MCL1 – Myeloid Cell Leukemia 1

OR – Odds Ratio

PI3K/AKT – Phosphoinositide 3-Kinase / Protein Kinase B

Pseudo- R^2 – Pseudo Coefficient of Determination

PTEN – Phosphatase and Tensin Homolog

R-IPSS – Revised International Prognostic Scoring System

ROS – Reactive Oxygen Species

SMAD2 – Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2

SMAD4 – Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4

TET2 – Ten-Eleven Translocation 2

TGF- β – Transforming Growth Factor Beta

TGFBR1 – Transforming Growth Factor Beta Receptor 1

TGFBR2 – Transforming Growth Factor Beta Receptor 2

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

VIF – Variance Inflation Factor

Wnt – Wingless-Related Integration Site (signaling pathway)

I. Въведение

Миелодиспластичните синдроми (МДС) представляват хетерогенна група от клонални хематопоеични нарушения, характеризиращи се с неефективна хемопоеза, цитопении и повишен риск от прогресия в остра миелоидна левкемия. Диагностицирането на МДС продължава да бъде клинично предизвикателство, тъй като изисква комплексно интегриране на клинични, морфологични и генетични находки. Много пациенти с цитопения имат генетични изменения или дисплазия, които могат да наподобяват МДС, но не изпълняват установените диагностични критерии. Състояния като клонална цитопения с неясно значение (CCUS) и клонална хематопоеза с неясно значение (CHIP) попадат в диагностично „сива зона“, при която е налице клоналност, но без категорични доказателства за МДС. Освен това, фактори като герминативни мутации, съпътстващи заболявания или прилагани лечения (например цитотоксични медикаменти или имуно-модулиращи терапии) могат допълнително да усложнят диагностичния процес, като предизвикват диспластични изменения или цитопении. Някои хромозомни аномалии се считат за диагностични за МДС, дори при липса на съществена дисплазия, докато други не са достатъчни сами по себе си. Тези предизвикателства подчертават необходимостта от многократни и всеобхватни диагностични оценки, които включват изследване на костен мозък, флуоцитометричен анализ и молекулярни тестове, за да се направи надеждно разграничаване на МДС от други сходни състояния. Освен това, МДС е силно хетерогенно заболяване, при което преживяемостта на пациентите може да варира от едва няколко месеца до няколко години. Тази значителна

вариабилност в клиничното протичане налага необходимостта от откриване на надеждни прогностични биомаркери, които да подпомогнат индивидуализирането на терапията и подобряването на изхода за пациентите. По-задълбоченото разбиране на патогенезата на МДС би могло да подпомогне разработването на надеждни диагностични и прогностични биомаркери, което би допринесло за по-ранно и по-точно установяване на заболяването.

МикроРНКите са малки некодирани РНК молекули, обикновено с дължина 19–25 нуклеотида, които регулират генната експресия, като се свързват с 3'-нетранслируемите региони на таргетните информационни РНКи (иРНК), водейки до потискане на транслацията или до разграждане на иРНК. МикроРНКите изпъкват като критични регулатори в патогенезата на МДС, повлиявайки ключови клетъчни процеси като диференциация, пролиферация и апоптоза. При МДС са открити нарушения в експресията на микроРНКи, като са идентифицирани специфични профили, различаващи се от тези при здрави хора. Тези промени в експресията се асоциират с различни аспекти на заболяването, включително хемопоетична дисфункция, хромозомни аномалии и прогресия на болестта. Няколко проучвания показват потенциалната стойност на микроРНКите като диагностични и прогностични биомаркери, допринасяйки за по-добро стратифициране на заболяването и оценка на риска. Независимо от нарастващите доказателства за ролята на микроРНКите в МДС, техните точни функционални роли и клинични приложения не са напълно изяснени. Макар повечето изследвания да се съсредоточават върху микроРНКи, извлечени от костен мозък, възможността за

изолирането им от плазма, като минимално инвазивни биомаркери, остава обещаваща област за изследване. Напредъкът в технологиите за секвениране от следващо поколение и в биоинформатичните технологии, улеснява идентифицирането на нови микроРНК профили, които биха могли да подобрят точността на диагностика и рисковата стратификация на пациентите. Въпреки нарастващия интерес към микроРНКите като потенциални биомаркери за МДС, клиничното им значение все още е в процес на проучване.

II. Цел и задачи на изследването

1. Цел

Целта на настоящото проучване е да се оценят нивата на експресия на подбрани пет микроРНК - миР-22, миР-144, миР-16, миР-451a, let7a, при пациенти с МДС, да се направи сравнителен анализ на резултатите в групите с висок и нисък риск МДС и между пациенти с МДС и здрави контроли и да се определи прогностичното им значение.

2. Задачи

Във връзка с поставената цел са формулирани следните основни задачи:

1. Подбор на група от пациенти с МДС и определяне на техните демографски и клинично-лабораторни характеристики и подбор на здрави контроли със сходни демографски характеристики на пациентската група.
2. Анализирание на плазмени проби от пациентите и здравите контроли и изследване нивата на експресия на подбраните пет микроРНК-и при двете групи.
3. Сравняване на нивата на изследваните пет микроРНК-и между пациентите с МДС и здрави контроли.
4. Анализ на нивата на петте микроРНК при пациентите спрямо демографските показатели.

5. Анализ на нивата на подобрните пет микроРНКи при различните подтипове МДС и според рисковата стратификация на пациентите по R-IPSS скалата.
6. Корелационен анализ за изследване на взаимовръзки между избраните пет микроРНКи и различни хематологични и биохимични показатели при пациентите с МДС.
7. Определяне на диагностична стойност на подобрните пет микроРНКи.
8. Оценка на предиктивната роля на петте микроРНКи за разграничаване на висок и нисък риск МДС според R-IPSS и за различните типове МДС.
9. Определяне на прогностичната стойност на подобрните пет плазмени микроРНКи при МДС.

III. Материали и методи

1. Материална база за реализиране на дисертационния труд

- Клиника по клинична хематология - УМБАЛ "Света Марина"- Варна
- Централна Клинична лаборатория - УМБАЛ "Света Марина"- Варна
- Имунологична лаборатория - УМБАЛ "Света Марина"- Варна
- Генетична лаборатория - УМБАЛ "Света Марина"- Варна

2. Изследвани лица

Извършеното научно изследване е проспективно и обхваща 50 участника - 40 пациента с доказан миелодиспластичен синдром и 10 здрави контроли. Проучването е проведено в клиника по Клинична хематология към УМБАЛ "Света Марина" Варна след получаване на положителна оценка от Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – гр. Варна. Участниците в него са включени след подписване на информирано съгласие.

3. Подбор на пациенти

Пациентите са подбрани според включващите и изключващи критерии на изследването.

3.1. Критерии за включване:

- Възраст над 18 г.;
- Пациенти с поставена диагноза миелодиспластичен синдром според критериите на СЗО от 2016г.;
- Изявено желание за участие в изследването, чрез подписан формуляр за информирано съгласие.

3.2. Критерии за изключване:

- Пациенти на възраст под 18 г.;
- Пациенти не отговарящи на критериите за включване;
- Изявено нежелание за участие в изследване;

4. Подбор на здрави контроли

Контролната група включва 10 клинично здрави индивиди, сходни по демографски характеристики с пациентите, на възраст над 18 години, след подписване на информирано съгласие.

5. Рутинни клинични изследвания. Получаване и съхраняване на проби. Методи на анализ

При всички пациенти е извършен клиничен преглед, включващ анамнеза и физикален статус. Проведени са рутинни лабораторни изследвания - показатели на периферна кръвна картина, изследване на ЛДХ, бета2-микроглобулин, феритин и еритропоетин.

5.1. Специфични методи на изследване

За извършване на специфичен анализ на нивата на подобраните пет микроРНК, еднократно е взета венозна кръв в две EDTA-кръвни епруветки (всяка по 3 ml) и един вакутейнер за серум (8 ml). Пробите са центрофугирани на 1500 оборота за 15 минути при 4 °C и кръвната плазма е отделена и разпределена на порции от 500 µl и съхранена до извършване на анализа при температура -80 °C.

МикроРНК-ите са изолирани от 200 µl кръвна плазма с помощта на комерсиален комплект miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Германия) съгласно протокола на производителя. За целите на нормализацията към всяка проба е добавена 3,5 µl ($1,6 \times 10^8$ копия/µl) контролна микроРНК *C. elegans* miR-39. Пробите са елуирани в 25 µl вода, свободна от РНКази. Процедурата по изолиране включва следните стъпки:

1. Пробите са размразени на стайна температура (15–25 °C).
2. Към пробите се добавят 1000 µl (5 обема) QIAzol Lysis Reagent. Пробите се хомогенизират чрез вортексиране.
3. Епруветката, съдържаща лизата, се инкубира при стайна температура (15-25°C) за 5 мин. Към всяка проба се прибавя 3,5 µl ($1,6 \times 10^8$ копия на µl) контролна микроРНК *C. elegans* miR-39.
4. Лизатът е обработен с 200 µl хлороформ (обем, равен на обема на изходната проба), след което пробите са вортексирани за 15 секунди до пълно смесване.
5. Епруветката, съдържаща лизата, се инкубира при стайна температура за 2-3 минути.

6. Пробата се центрофугира за 15 минути при $12\,000 \times g$ при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. След центрофугиране пробата се разделя на 3 фази: надстояща, безцветна, водна фаза, съдържаща РНК; бяла интерфаза; и подстояща, червена, органична фаза.
7. $600\text{ }\mu\text{l}$ от надстоящата водна фаза се прехвърля в нова епруветка, като се избягва прехвърлянето на материал от интерфазата. Добавят се $900\text{ }\mu\text{l}$ ($1,5$ обема) 100% етанол и сместа е хомогенизирана чрез пипетиране.
8. Пробата е прехвърлена на порции (до $700\text{ }\mu\text{l}$) в RNeasy MinElute колонка, поставена в 2 ml събирателна епруветка, и е центрофугирана при $8000 \times g$ за 15 секунди при стайна температура, след което промивната течност се изхвърля. Тази стъпка е повторена, докато цялата проба премине през колонката.
9. Мембраната на колонката е промита със $700\text{ }\mu\text{l}$ буфер RWT. Центрофугира се за 15 s при $8000 \times g$, за да промиете колоната, след което промивната течност се изхвърля.
10. Добавя се $500\text{ }\mu\text{l}$ буфер RPE върху колонката RNeasy MinElute. Центрофугира се за 15 s при $8000 \times g$, за промиване на колонката, след което промивната течност се изхвърля.
11. Добавя се $500\text{ }\mu\text{l}$ 80% етанол върху колонката RNeasy MinElute. Центрофугира се в продължение на 2 минути при $8000 \times g$, за да се промие мембраната на спин-колонката. Събирателната епруветка се изхвърля.
12. Колонката RNeasy MinElute се поставя в нова епруветка за събиране от 2 ml . За изсушаване на мембраната, колонката е центрофугирана на

максимална скорост (25 000 × g за 5 минути) с отворен капак. Събирателната епруветка се изхвърля.

13. Колонката RNeasy MinElute се поставя в нова 1,5 ml епруветка. Елуцията на микроРНК-ите е осъществена чрез добавяне на 25 µl вода, свободна от РНКази, директно в центъра на мембраната на спин-колонката, последвано от центрофугиране на максимална скорост (25 000 × g за 1 минута).

Обратна транскрипция

Елуираните микроРНК-и са подложени на обратна транскрипция чрез готов търговски набор miRCURY LNA RT Kit, съгласно протокола на производителя. Реакционната смес включва 1,0 µl елуирана РНК и 9,0 µl мастърмикс, съдържащ 2,0 µl 5× реакционен буфер, 6,0 µl вода, свободна от РНКази, и 1,0 µl 10× ензимен микс. Реакцията е проведена при 42 °C за 60 минути, последвана от 5 минути при 95 °C за инактивиране на ензима.

Количествен PCR

Количественото измерване на микроРНК-ите е извършено чрез количествена полимеразна реакция в реално време (RealTime PCR) чрез готов търговски набор miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (200) и (600) и готови праймери за таргетните микроРНК-и miRCURY LNA miRNA PCR Assay, според протокола на производителя. Реакцията е проведена с 3,0 µl комплементарна ДНК (cDNA), разредена 30 пъти, към която се добавят 7,0 µl мастърмикс (5,0 µl 2× miRCURY SYBR® Green Master Mix,

0,05 µl ROX багрило, 1,0 µl праймер микс и 0,95 µl свободна от РНК-ази вода) в 10 µl в трикратни повторения за 6 таргетни микроРНК в 384 кладенчеви плаки. Използваните праймери miRCURY LNA miRNA PCR Assay, каталожен №339306 (QIAGEN, Германия) са както следва (в скоби е посочен референтния номер GeneGlobe на QIAGEN): cel-miR-39-3p (YP00203952), hsa-miR-144-3p (YP00204754), hsa-miR-22-3p (YP00204606), hsa-let-7a-5p (YP00205727), hsa-miR-16-5p (YP00205702), hsa-miR-451a (YP02119305). Използваните температурни параметри са както следва: задържане за 2 минути при 95 °C за активиране на ензима; 40 цикъла от 10 секунди при 95 °C; 60 секунди при 56 °C с флуоресцентно отчитане; анализ на крива на топене за доказване на специфичността на амплификацията: първоначална денатурация за 15 секунди при 95 °C и охлаждане до 60 °C за 60 секунди и повишаване до 95 °C със скорост +0,05 °C за секунда и флуоресцентно отчитане.

Анализът е осъществен на **QuantStudio Dx** (Applied Biosystems, USA), като за всяка проба е отчетен праговият цикъл (Ct). Относителната експресия на таргетните микроРНК-и е изчислена чрез метода $\Delta\Delta Ct$, нормализирана спрямо референтната микроРНК ***C. elegans* miR-39**.

Относителната концентрация на изследваните таргетни микроРНК-и е изчислена чрез $\Delta\Delta Ct$ метод^[276] спрямо референтна микроРНК – нормализационен контрол ***C. elegans* miR-39** спрямо референтна проба – представена от средноаритметична стойност на Ct на всички индивиди е изчислена чрез Microsoft Office Excel 2016 и е представена като отношение спрямо референтна проба.

6. Статистически анализ

Данните от изследването са обработени с помощта на специализиран софтуер за статистическа обработка (IBM SPSS Statistics v.24, GraphPad Prism, version 10.4.1, Python v.3.8 и Google Sheets) с цел оценка на диагностичната и прогностичната роля на избраните плазмени микроРНК-и при МДС. Използвани са следните методи:

Описателна статистика: Използвана за обобщаване на основните характеристики на данните чрез изчисляване на средни стойности, стандартни отклонения, медиани и процентни разпределения.

Тестът на Шапиро-Уилк се използва за проверка на нормалността на разпределението на данните в дадена група. Той изчислява дали разпределението на данните значително се отклонява от нормалното разпределение. При $p > 0.05$ се приема, че данните следват нормално разпределение, докато при $p \leq 0.05$ разпределението се счита за ненормално.

Тестът на Ман-Уитни е непараметричен тест, който се използва за сравнение на медианите между две независими групи. Тестът е приложим, когато данните не следват нормално разпределение. Той проверява дали има значима разлика в ранговете на стойностите между двете групи.

Размер на ефекта (r): Изчислява се при теста на Ман-Уитни и оценява практическата значимост на разликите между групите. r се интерпретира като малък ($r < 0.3$), умерен (r между 0.3 и 0.5) и голям ($r > 0.5$) ефект. Този тест предоставя допълнителна информация за това

колко големи са разликите между групите, дори когато статистическата значимост не е налице.

Корелационен анализ: Коефициент на корелация на Спирман: Използван за оценка на връзката между две количествени променливи, независимо от разпределението на данните. Методът измерва посоката и силата на монотонната връзка между променливите. Резултатите са интерпретирани според следните степени на корелация:

- Слаба връзка: (0,1–0,3)
- Умерена връзка: (0,3–0,5)
- Значима връзка: (0,5–0,7)
- Силна връзка: (0,7–0,9)
- Много силна връзка: (0,9–1].

Регресионни анализи:

- **Еднофакторна линейна регресия:** Прилагана за оценка на линейната зависимост между независима и зависима променлива. Резултатите от регресията включват коефициенти на детерминация (R^2), които показват степента, до която една променлива обяснява вариацията на друга.
- **Логистична регресия:** Прилагана за оценка на вероятността за настъпване на бинарно събитие в зависимост от една или повече независими променливи.
- **Кокс регресионен анализ:** Използван за оценка на връзката между нивата на изследваните микроРНК и времето до настъпване на събитие (напр. смърт) при пациентите с МДС. Този анализ е

полупараметричен и не изисква предположение за формата на базовата функция на риска, което го прави гъвкав и подходящ за анализ на данни за преживяемост. Кокс моделът изчислява коефициенти на риска (**Hazard Ratios, HR**), които показват влиянието на всяка независима променлива върху риска от настъпване на събитието. Той е приложим при данни с цензуриране (когато събитието не е настъпило за всички участници) и се използва широко за оценка на прогностичната стойност на биомаркери, клинични характеристики и други фактори.

- **LASSO анализ:** Използван за оценка на предиктивната стойност на изследваните микроРНК и за идентифициране на най-значимите сред тях. Методът е приложен с цел справяне с мултиколинеарността между микроРНКите, която може да повлияе на стабилността и интерпретацията на модела. LASSO позволява редукция на модела чрез елиминиране на по-малко значимите променливи, като по този начин се идентифицират ключовите микроРНК, които допринасят за диагностичната и прогностичната точност.

ROC анализ: ROC (Receiver Operating Characteristic) анализът е използван за оценка на диагностичната точност на микроРНК-ите. Изчислена е площта под кривата (AUC), както и оптималните прагови стойности, базирани на индекса на Юден.

Каплан–Майер криви: Използвани за оценка на времето до настъпване на събитие, като преживяемост.

Резултатите са представени графично чрез:

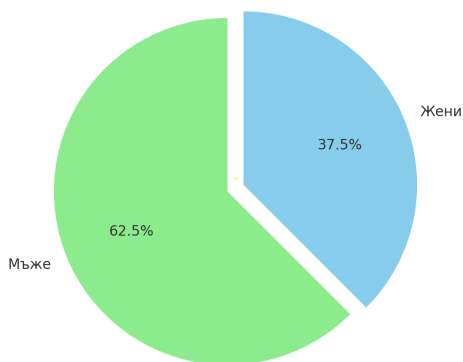
- **Box plot** за сравнение на разпределенията на микроРНКите между различни групи, като предоставят информация за медианата, междуквартилния диапазон (IQR), и потенциалните отклонения (outliers).
- **Scatter plots** за визуализация на корелационните връзки.
- **ROC криви** за оценка на диагностичната точност.

Всички статистически тестове са проведени при ниво на значимост $\alpha = 0,05$. Резултатите са интерпретирани с помощта на р-стойности и доверителни интервали.

IV. Резултати

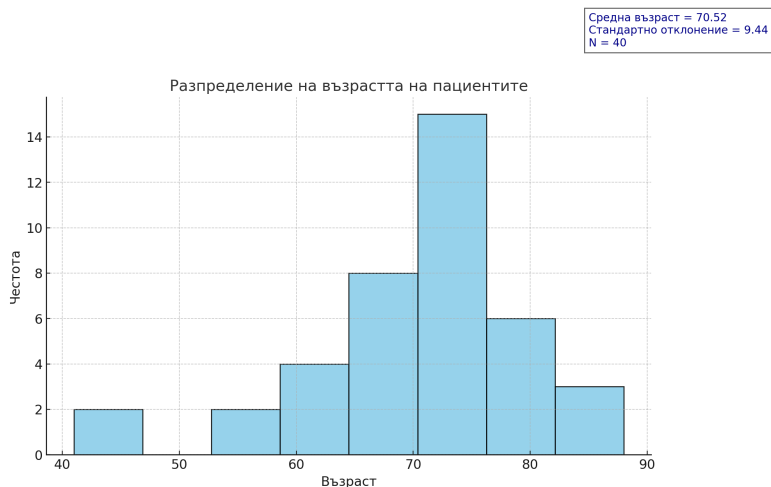
1. Демографски и клинико-лабораторни характеристики на пациентите

Включени са 40 проби на пациенти и 10 здрави контроли. Малко над една трета от пациентите са от женски пол и около две трети са от мъжки пол: жени - 15 (37,5%), мъже - 25 (62,5%)(фигура 1).



Фигура 1. Разпределение на пациентите с МДС по пол.

Средната възраст на пациентите е 71 години (41-88), като 67,5% (n=27) са над 70 години и преобладават пациентите във възрастова група между 70-75 години - 40% (n=16). При жените средната възраст е около 70 г. (69,93), а при мъжете 71г. (70,88). Разпределението по възраст е представено на фигура 2.



Фигура 2. Разпределение по възраст.

Разпределението по възраст и пол, при жените средната възраст е около 70 г. (69,93), а при мъжете 71 г. (70,88). Осъществена е проверка на хипотеза за разлика във възрастта между двата пола (Таблица 4). Изследователската хипотеза е, че съществува разлика в групите. А нулевата и алтернативната могат да се представят по следния начин:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Приема се равнище на значимост $\alpha = 0,05$, P-value (0,763) $> \alpha$ (0,05), следователно няма основание да се отхвърли H_0 в полза на H_1 при равнище на значимост $\alpha = 0,05$. Това означава, че разликата между средната възраст на мъжете и жените е статистически незначима.

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
										95% Confidence Interval of the Difference
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Age	Equal variances assumed	4,422	,042	-,303	38	,763	-,947	3,120	-7,262	5,369
	Equal variances not assumed			-,263	18,904	,796	-,947	3,602	-8,489	6,595

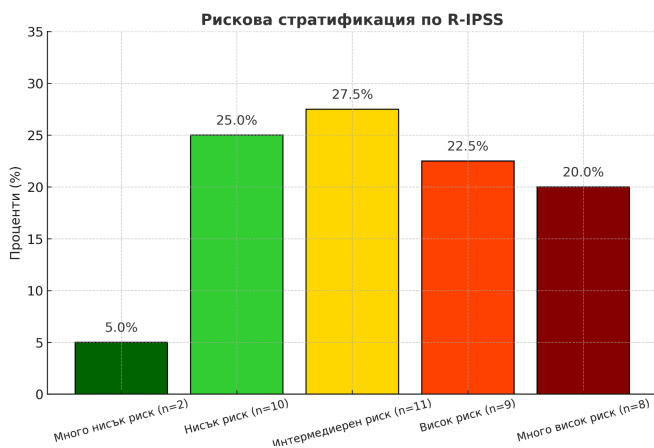
Таблица 4: Резултати от проверка на хипотезата за разлика във възрастта между два пола.

Спрямо класификацията на СЗО от 2016г, с МДС с мултилинеарна дисплазия са 47,5%(n=19), МДС с ринг сидеробласти са 10% (n=4), МДС с del5q са 10% (n=4) и с ексцес на бласти са 32,5% (n=13) (Фигура 3).



Фигура 3: Разпределение на пациентите спрямо подтип МДС, СЗО 2016г.

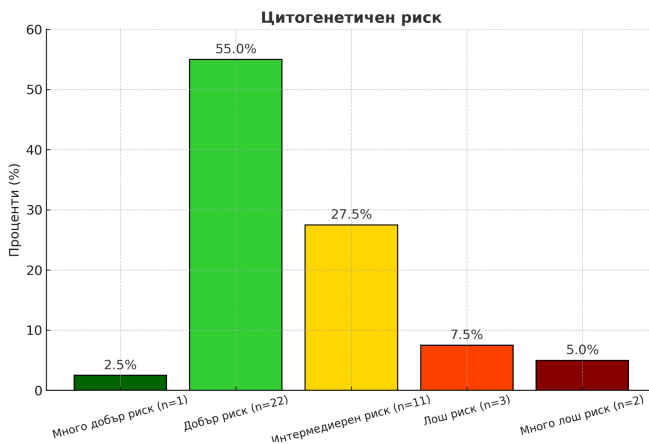
Спрямо рисковата стратификация по R-IPSS, пациентите са разпределени по следния начин - много нисък риск - 5% (n= 2), нисък риск 25% (n=10), интермедиерен риск - 27,5% (n=11), висок риск 22,5% (n=9), много висок риск 20% (n=8) (Фигура 4).



Фигура 4: Разпределение на пациентите спрямо рисковата стратификация по R-IPSS

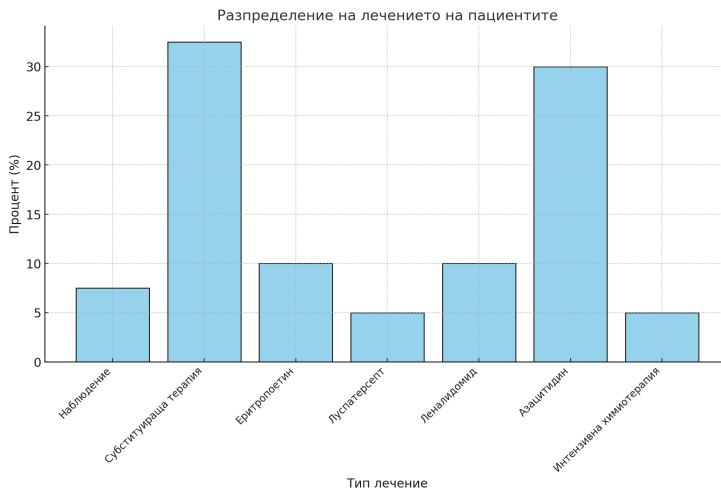
С оглед статистически значима обработка на данните пациентите са групирани според риска в две групи: с нисък риск МДС, включващ R-IPSS групите много нисък, нисък и интермедиерен риск (≤ 3.5 т.), и с висок риск МДС, включващ R-IPSS групите интермедиерен (> 3.5 т.), висок и много висок риск.

Спрямо цитогенетичния риск, 2,5% (n=1) са с много добър риск, 55% (n=22) са с добър риск, 27,5% (n=11) са с интермедиерен риск, 7,5% (n=3) са с лош риск и 5% (n=2) са с много лош риск (Фигура 5).



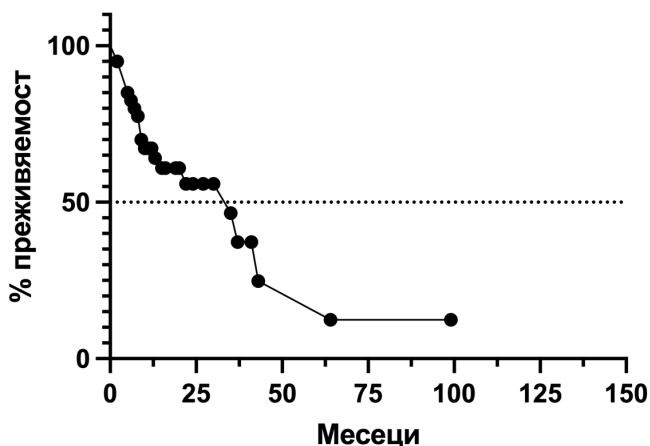
Фигура 5: Разпределение на пациентите спрямо цитогенетичния риск.

По отношение на броя цитопении, 40% (n=16) имат само една, 37,5% (n=15) са с две и 22,5% (n=9) са с три цитопении. По отношение процента бласти в костен мозък пациентите са разпределени в три групи: <5%, 5-9% и 10-19%. В първата група влизат 65% (n=26), във втората - 5% (n=2) и в третата - 30% (n=12). Спрямо лечението, което пациентите са получили към момента на анализа, те са разделени на: активно наблюдение 7,5% (n=3), субституираща терапия 32,5% (n=13), получаващи терапия с цел покачване стойностите на хемоглобина 25% (n=18) - еритропоетин, леналидомид, луспатерсепт и такива получаващи терапия с цел намаляване на блатите с костен мозък 35% (n=14) - азацитидин и интензивна химиотерапия (Фигура 6).



Фигура 6: Разпределение на пациентите спрямо получаваното лечение.

Към момента на анализа 50% ($n=20$) са живи и 50% ($n=20$) от пациентите са починали (Фигура 7). Медианата на общата преживяемост е достигната на 35 месец.



Фигура 7: Обща преживяемост на пациентите.

Всички демографски и клинико-лабораторни данни на пациентите са представени на таблица 5.

Показател	N(%) / Mean $\pm$ SD (range)
Възраст <70 години 70-75 години >75 години	70,53 / 70,52 $\pm$ 9,441 (44-88) 13 (32,5) 14 (40) 11 (27,5)
Пол (М:Ж)	25:15 (62,5:37,5)
Подтип спрямо СЗО 2016 МДС с мултилинеарна дисплазия МДС с ринг сидеробласти МДС с del(5q) МДС с ексцес на бласти	19 (47,5) 4 (10) 4 (10) 13 (32,5)
Рисков профил спрямо R-IPSS Много нисък риск Нисък риск Интермедиерен риск Висок риск Много висок риск	2 (5) 10 (25) 11 (27,5) 9 (22,5) 8 (20)
Цитогенетичен риск Много добър риск Добър риск Интермедиерен риск Лош риск Много лош риск	1 (2,5) 22 (55) 11 (27,5) 3 (7,5) 1 (2,5)

Неизвестен	2 (5)
Брой цитопении Една Две Три	16 (40) 15 (37,5) 9 (22,5)
Процент бласти <5% 5-9% 10-19%	26 (65) 2 (5) 12 (30)
Лечение Активно наблюдение Субститурища терапия Терапия за покачване на Хб Еритропоетин Луспатерспет Леналидомид Терапия за намаляване на бласти Азациитидин Интензивна химиотерапия	3 (7,5) 13 (32,5) 10 (25) 4 (10) 2 (5) 4 (10) 14 (35) 12 (30) 2 (5)
Хемоглобин (g/L)	79,43 ± 17,52 (28-115)
Ретикулоцити (%)	2,495 ± 2,113 (0,32 - 9,06)
Левкоцити (x10 ⁹ /L)	4,01 ± 2,188 (1,54 - 10,32)
Неутрофили (x10 ⁹ /L)	2,012 ± 1,553 (0,18 - 7,79)

Тромбоцити ($\times 10^9/L$)	170,8 $\pm$ 164,3 (15 - 859)
ЛДХ (U/L)	467,2 $\pm$ 329,6 (187 - 1977)
Бета2-микроглобулин (mg/L)	3,413 $\pm$ 1,518 (1,4 - 8,1)
Еритропоетин (U/l)	320,3 $\pm$ 286,5 (23,5 - 751)
Феритин ($\mu g/L$)	840,2 $\pm$ 626,7 (11,31 - 3172)

Таблица 5: Демографски и клиничко-лабораторни характеристики на пациентите с МДС.

2. Анализ на нивата на микроРНКите при пациенти и здрави контроли

За да се оцени дали нивата на изследваните микроРНКи при пациенти с МДС и здрави контроли следват нормално разпределение, беше проведен тестът на Шапиро-Уилк (Shapiro-Wilk test).

Тест на Шапиро-Уилк

За да оценим диагностичния потенциал на избраните плазмени микроРНКи при пациенти с МДС, проведехме сравнителен анализ между двете групи – пациенти с МДС и здрави контроли. Първо е приложен теста на Шапиро-Уилк (Shapiro-Wilk test), за да се определи дали нивата на изследваните микроРНКи при пациенти с МДС и здрави контроли следват нормално разпределение (Таблица 6). Тестът на Шапиро-Уилк е статистически метод за проверка на хипотезата, че дадена извадка произлиза от популация с нормално

разпределение. Той е подходящ за малки до средни размери на извадките и е един от най-чувствителните тестове за нормалност.

- **Нулева хипотеза (H_0):** Данните са с нормално разпределение.
- **Алтернативна хипотеза (H_1):** Данните не са с нормално разпределение.
- Ако р-стойността е по-малка от $\alpha=0.05$, нулевата хипотеза се отхвърля, което предполага, че разпределението не е нормално.

МиР	Група	W	p	Нормално разпределени ($\alpha = 0.05$)
МиР-22	Пациенти	0.6917	<0.0001	Не
	Контроли	0.8907	0.1726	Да
МиР-144	Пациенти	0.8383	<0.0001	Не
	Контроли	0.9079	0.2666	Да
МиР-16	Пациенти	0.898	0.0017	Не
	Контроли	0.9088	0.2729	Да
Let-7a	Пациенти	0.2235	<0.0001	Не
	Контроли	0.9571	0.7526	Да
МиР-451a	Пациенти	0.8845	0.0007	Не
	Контроли	0.9218	0.3721	Да

Таблица 6: Резултати от тест на Шапиро-Уилк за нормално разпределение на данните при пациентите с МДС и здрави контроли.

При анализа на нормалността на разпределението на нивата на микроРНКите с теста на Шапиро-Уилк е установено, че всички микроРНКи при пациентите показват значими отклонения от нормално разпределение ($p < 0.05$). В същото време, стойностите при здравите контроли преминават теста за нормалност ($p > 0.05$). Тази разлика може да се обясни с няколко фактора. Първо, малката извадка при здравите контроли ($n=10$) може да не е достатъчно представителна за цялата популация, което затруднява откриването на отклонения от нормалност. Освен това, здравите контроли обикновено са по-хомогенна група, което допринася за по-стабилни и близки стойности на микроРНКите.

Наличието на ненормално разпределение дори само при една от групите изисква използването на непараметрични тестове за сравнение. Тези тестове не предполагат нормалност и са подходящи за анализ на данни с асиметрия, отклонения или малки размери на извадките. Въз основа на тези резултати, за последващия анализ на нивата на микроРНКите между пациентите и здравите контроли са приложени непараметрични методи.

В допълнение към статистическия анализ с теста на Ман-Уитни (Mann-Whitney U test) беше изчислен и размерът на ефекта, за да се оцени практическата значимост на разликите между пациентите и здравите контроли. Размерът на ефекта (r) се изчислява по формулата:

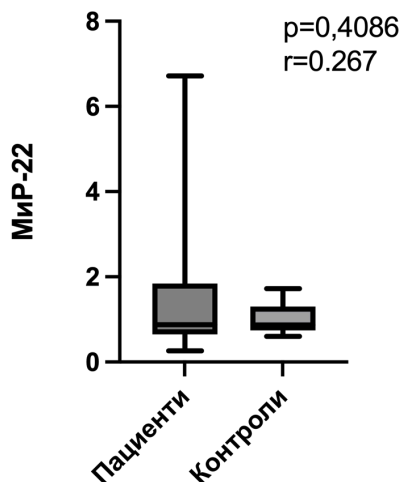
$$r = Z \div \sqrt{N}$$

където Z е Z -стойността от теста на Ман-Уитни, а N е общият брой наблюдения в двете групи. Коефициентът r показва силата на разликата между групите, като следва интерпретация, подобна на тази за корелационните коефициенти: $r < 0.1$ се счита за минимален ефект, $0.1 \leq r < 0.3$ за малък ефект, $0.3 \leq r < 0.5$ за среден ефект и $r \geq 0.5$ за голям ефект. Този подход предоставя допълнителна информация, която допълва резултатите от статистическия тест, като позволява по-детайлна интерпретация на разликите в нивата на микроРНКите между пациентите и здравите контроли.

2.1 МикроРНК-22

Първата микроРНК, подложена на анализ, е миР-22 (Фигура 8). Медианата на нивата на миР-22 при пациентската група е 1.294, а при контролната група – 1.030. Разликата между двете групи е тествана с помощта на теста на Ман-Уитни, който не отчете статистически значима разлика ($p=0.4086$).

Размерът на ефекта (r), изчислен въз основа на Z -стойността и общия брой наблюдения ($N=50$), е -0.267 , което показва **малък ефект**. Тези резултати показват, че разликите в нивата на миР-22 между пациентите с МДС и здравите контроли са статистически и клинично незначителни.

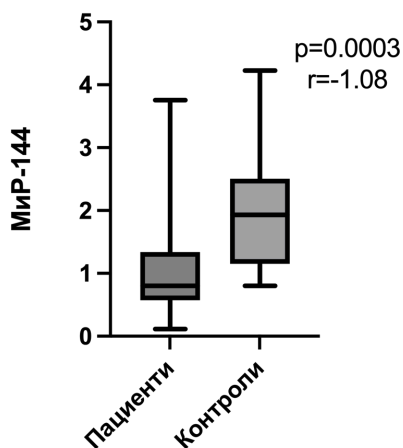


Фигура 8: Сравнение на нивата на миР-22 между пациенти и здрави контроли.

2.2 МикроРНК-144

При миР-144, медианата на нивата на експресия при пациентите с МДС е 0.802, докато при здравите контроли е 1.933 (Фигура 9). Това показва, че нивата на миР-144 са значително по-ниски при пациентите в сравнение със здравите контроли. Тестът на Ман-Уитни отчете статистически значима разлика между двете групи ($p=0.0003$), което подчертава потенциалната роля на миР-144 като диагностичен биомаркер за МДС.

Освен това, размерът на ефекта ($r=-1.08$) показва изключително голям ефект. Отрицателният знак на r отразява, че стойностите на пациентите са по-ниски от тези на контролите. Това показва висока клинична значимост на разликите в експресията на миР-144 между двете групи.



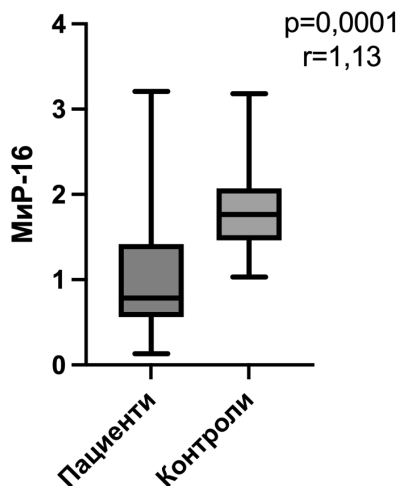
Фигура 9: Сравнение на нивата на миР-144 между пациенти и здрави контроли.

2.3 МикроРНК-16

Следващата анализирана микроРНК е миР-16 (Фигура 10). Резултатите показват статистически значима разлика в нивата на експресия между пациентите с МДС и здравите контроли. Медианата на нивата на миР-16 при пациентите с МДС е 0.7855, докато при здравите контроли тя е значително по-висока – 1.764.

Тестът на Ман-Уитни отчете $p=0.0001$, което потвърждава, че разликата между двете групи е статистически значима. Размерът на ефекта ($r=-1.13$) е изключително голям. Отрицателният знак на r отразява, че стойностите при пациентите са значително по-ниски в сравнение със

здравите контроли. Това подчертава клиничната значимост на откритите различия.

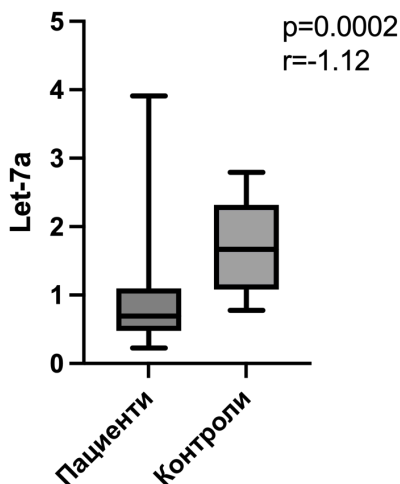


Фигура 10: Сравнение на нивата на миР-16 между пациенти и здрави контроли.

2.4 Let-7a

При let-7a, медианата на нивата на експресия при пациентите с МДС е 0.692 , докато при здравите контроли тя е значително по-висока – 1.669 (Фигура 11). Една стойност от групата на пациентите е премахната, тъй като е идентифицирана като екстремална. Тестът на Ман-Уитни отчете $p=0.0002$, което потвърждава, че нивата на let-7a са значително по-ниски при пациентите с МДС.

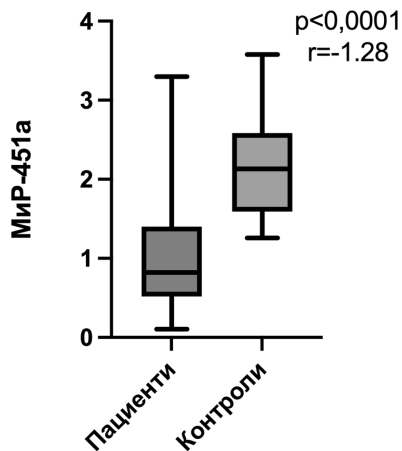
Размерът на ефекта ($r=-1.12$) е изключително голям. Това подчертава значимостта на разликите и потенциалната роля на let-7a като диагностичен биомаркер.



Фигура 11: Сравнение на нивата на let-7a между пациенти и здрави контроли.

2.5 МикроРНК-451a

Последната микроРНК, подложена на анализ, е миР-451a (Фигура 12). Резултатите показват значителна разлика в нивата на експресия на миР-451a между пациентите с МДС и здравите контроли. Медианата на нивата на миР-451a при пациентите с МДС е 0.8215, докато при здравите контроли тя е значително по-висока – 2.132. Тестът на Ман-Уитни отчете $p < 0.0001$, което потвърждава, че разликата между двете групи е статистически значима. Освен това, размерът на ефекта ($r = -1.28$) е изключително голям, което ясно показва клиничната значимост на разликите в нивата на миР-451a между двете групи.



Фигура 12: Сравнение на нивата на миР-451а между пациенти и здрави контроли.

На Таблица 7 и 8 са отразени обобщаващи резултати от проведения анализ на Ман-Уитни за сравнение на нивата на микроРНКите при пациентите с МДС и здрави контроли:

МиР	Медиана (Пациенти)	Медиана (Контроли)	p	Размер на ефекта (r)	Клинична значимост
МиР-22	1.294	1.03	0.4086	-0.267	Не е значима
МиР-144	0.802	1.933	0.0003	-1.08	Изключително голям ефект
МиР-16	0.7855	1.764	0.0001	-1.13	Изключително голям ефект
Let-7a	0.692	1.669	0.0002	-1.12	Изключително голям ефект

					но голям ефект
МиР-451а	0.8215	2.132	<0.0001	-1.28	Изключително голям ефект

Таблица 7: Резултати от теста на Ман-Уитни сравняващ нивата на микроРНКите между групата на пациентите спрямо здравите контроли.

Статистически хипотези и размер на ефекта при две независими извадки		Групи: пациенти и контролна група
МиР-22	статистическа значимост	незначима разлика
	размер на ефекта	малък
МиР-144	статистическа значимост	значима разлика
	размер на ефекта	много голям
МиР-16	статистическа значимост	значима разлика
	размер на ефекта	много голям
Let-7a	статистическа значимост	Значима разлика
	размер на ефекта	много голям
МиР-451а	статистическа значимост	значима разлика
	размер на ефекта	много голям

Таблица 8: Схематично представяне на получените резултати от теста на Ман-Уитни и определения размер на ефекта.

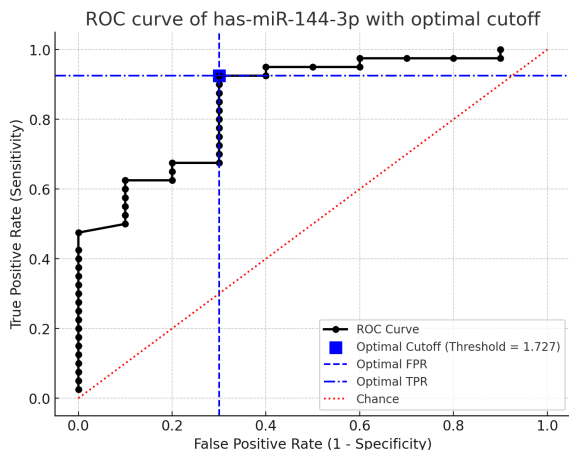
3. Определяне на прагови стойности за микроРНК със статистически значима разлика между пациенти с МДС и здрави контроли

За микроРНК, при които е установена статистически значима разлика между пациентите с МДС и здравите контроли, е извършен ROC (Receiver Operating Characteristic) анализ и са определени праговите стойности, използвайки индекса на Юден (Youden's Index), с цел да се идентифицира оптималният диагностичен праг за разграничаване на пациенти с МДС от здрави контроли. Индексът на Юден е често използван метод за намиране на оптималната прагова стойност, която оптимизира разликата между чувствителността (sensitivity) и специфичността (specificity), като се изчислява по формулата:

$$\text{Youden Index} = \text{Sensitivity} + \text{Specificity} - 1$$

3.1 Анализ на прагови стойности за миР-144

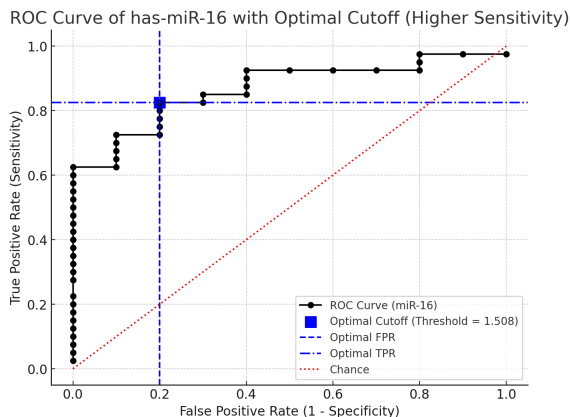
При миР-144, която има значителна разлика между двете групи и голям размер на ефекта, ROC анализът определи оптимална прагова стойност от 1,727, при която чувствителността е 92,5%, а специфичността – 70% (Фигура 13). Площта под кривата (AUC) е 0,8538 (0,7274 - 0,9801), p 0,0006.



Фигура 13: ROC анализ за миР-144 и определяне на диагностичния праг.

3.2 Анализ на прагови стойности за миР-16

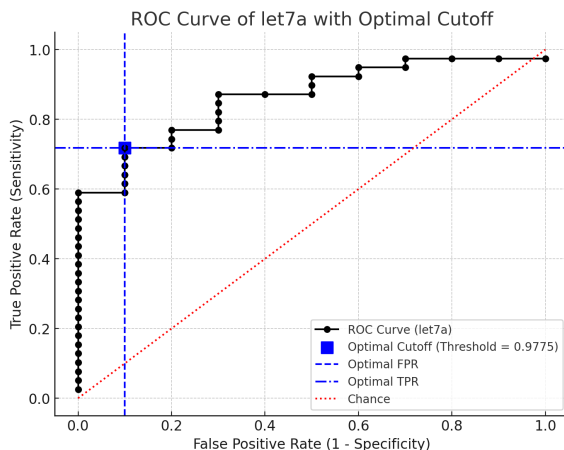
Изготвена е ROC крива за **миР-16** с AUC 0,8675 (0,7646 - 0.9704) $p = 0.0004$, показвайки добра дискриминативна способност на модела (Фигура 14). При анализа на **миР-16** е изчислен индекс на Юден (Youden's Index) със стойност **0.625** за два възможни прага – **0.9955** и **1.508**. За по-добър баланс между чувствителност и специфичност е избран прагът **1.508**, който осигурява по-висока чувствителност (**82.5%**), макар и със специфичност от **80%**, в сравнение с прага **0.9955**, който има специфичност **100%**, но по-ниска чувствителност (**62.5%**). По-високата чувствителност е особено важна при диагностиката на редки заболявания като МДС.



Фигура 14: ROC анализ за миР-16 и определяне на диагностичния праг.

3.3 Анализ на прагови стойности за миР-let7a

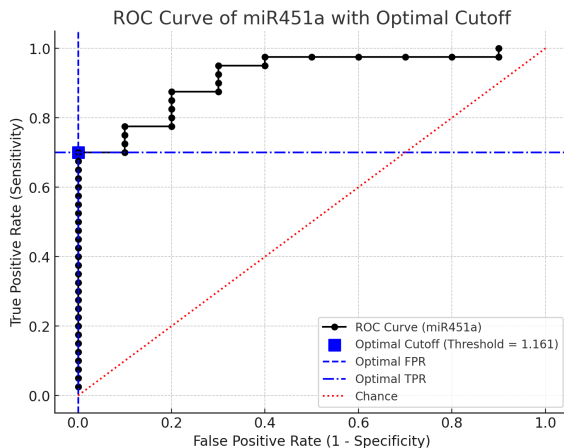
При анализа на **let7a** е изготвена ROC крива с AUC 0,8615 (CI 0,7536 - 0,9695), $p = 0,0005$ (Фигура 15). Индексът на Юден е изчислен за всяка стойност на прага, като максималната му стойност е **0.6179**. Оптималният праг е определен на **0.9775**, при който чувствителността е **71.79%**, а специфичността — **90.0%**.



Фигура 15: ROC анализ за let-7a и определяне на диагностичния праг.

3.4 Анализ на прагови стойности за миР-451a

При миР-451a, която показва най-голяма разлика в експресията между двете групи, е съставена ROC крива с AUC 0,9175 (CI 0,8354 - 0,996) и $p < 0,0001$ (Фигура 16). Индексът на Юден е изчислен за всяка стойност на прага, като максималната стойност на индекса е **0.7**. Оптималният праг е определен на **1.161**, при който чувствителността е **70.0%**, а специфичността — **100.0%**. Този праг осигурява висока специфичност, което е от съществено значение за минимизиране на фалшивите позитивни резултати.



Фигура 16: ROC анализ за миР-451а и определяне на диагностичния праг.

4. Сравнителен анализ по демографски показатели:

4.1 Сравнителен анализ по пол

Извършено е сравнение на нивата на миР между мъже и жени, за да се установи дали има полови различия в изследваните микроРНКи. Статистическият анализ не показва значима разлика в нивата на нито една от микроРНКите между мъжете и жените (Таблица 9). Резултатите от този анализ са представени в таблица, която отразява средните стойности и стандартното отклонение за всяка миР в двете групи, както и съответните р-стойности, доказващи липсата на значима разлика. Тези данни потвърждават, че полът не влияе съществено върху нивата на изследваните микроРНКи,

което позволява обединяване на данните за последващите анализи.

МиР	Пол	Брой	Mean $\pm$ SD	p-value
МиР-22	Мъже	25	1,357 $\pm$ 1,299	0,6633
	Жени	15	1,190 $\pm$ 0,8924	
МиР-144	Мъже	25	0,9850 $\pm$ 0,5125	0,9284
	Жени	15	1,005 $\pm$ 0,8713	
МиР-16	Мъже	25	0,9548 $\pm$ 0,5356	0,7547
	Жени	15	1,022 $\pm$ 0,7567	
Let7a	Мъже	25	0,8350 $\pm$ 0,4645	0,5886
	Жени	15	0,9567 $\pm$ 0,9274	
МиР-451a	Мъже	25	0,9184 $\pm$ 0,5193	0,6201
	Жени	15	1,022 $\pm$ 0,7898	

Таблица 9: Резултати от сравнителен анализ по пол.

4.2 Анализ на нивата на микроРНКите спрямо възрастта

За да се оцени потенциалната връзка между нивата на микроРНКите и възрастта на пациентите, е проведен корелационен анализ с помощта на Спирманов коефициент на корелация. Резултатите показват, че има слаби до умерени отрицателни корелации между възрастта и нивата на всички микроРНКи (Таблица 10). Статистически значима корелация е установена единствено за let-7a-5p ($r=-0.4569$, $p=0.0035$), което предполага, че с увеличаването на възрастта нивата на тази микроРНК намаляват. При останалите микроРНКи корелациите не бяха статистически значими ($p>0.05$), въпреки че коефициентите на корелация показват тенденция към отрицателна връзка, което предполага, че възрастта не е фактор, който оказва влияние върху експресията на тези микроРНКи в изследваните групи.

МиР	Коефициент (ρ)	95% CI	P-стойност	Значимост
МиР-22	-0.2894	-0.5578 до 0.03378	0.0701	Незначима
МиР-144	-0.2228	-0.5067 до 0.1048	0.167	Незначима
МиР-16	-0.2968	-0.5634 до 0.02575	0.0629	Незначима
Let-7a	-0.4569	-0.6803 до -0.1557	0.0035	Значима
МиР-451a	-0.2682	-0.5418 до 0.05677	0.0943	Незначима

Таблица 10: Резултати от корелационен анализ за връзката между микроРНКите и възрастта на пациентите.

5. Сравнителен анализ между нивата на микроРНКите и различни характеристики на заболяването

5.1 Анализ на нивата на микроРНКи при различните подтипове МДС

Пациентите с МДС са разделени в две групи с цел по-достоверна статистическа обработка, предвид малкия общ брой участници в изследването, на пациенти с МДС с мултилинеарна дисплазия, ринг сидеробласти и *del(5q)*, и на пациенти с МДС с повишен процент бласти. Сравнението на нивата на изследваните микроРНКи между подтиповете на МДС показва, че единствено *let-7a* има статистически значима разлика между двете групи ($p=0.0250$), с голям размер на ефекта ($r=-0.653$), което подчертава потенциалната ѝ роля като биомаркер (Таблица 11). За останалите микроРНКи – *miR-22*, *miR-144*, *miR-16* и *miR-451a* – не бяха установени статистически значими разлики ($p>0.05$). Въпреки това, за *miR-144* ($r=-0.319$) и *miR-16* ($r=-0.308$) – размерът на ефекта показва умерена сила на връзката. Това предполага, че при по-голяма извадка тези микроРНКи могат да покажат значима разлика между подтиповете. За *miR-22* и *miR-451a*, размерът на ефекта е малък ($r=-0.291$ и $r=-0.274$ съответно), което показва по-слабо изразена тенденция към различие.

МиР	Медиана (MLD, 5q, RARS)	Медиана (RAEB)	Р-стойност	Размер на ефекта (г)	Интерпретация
МиР-22	0.779	0.884	0.3307	-0.291	Малък до умерен ефект
МиР-144	0.775	0.873	0.2793	-0.319	Умерен ефект
МиР-16	0.779	0.832	0.2998	-0.308	Умерен ефект
Let-7a	0.579	0.851	0.025	-0.653	Голям ефект
МиР-451a	0.77	0.87	0.3602	-0.274	Малък до умерен ефект

Таблица 11: Резултати от сравнителен анализ между нивата на петте микроРНК и различните подтипове МДС.

5.2 Анализ на микроРНКи според рисковата стратификация на пациентите по R-IPSS скала

Пациентите са разделени на две групи въз основа на тяхната рискова стратификация по R-IPSS скалата. В групата с нисък риск са включени пациентите с много нисък, нисък и интермедиерен риск ≤ 3.5 точки, а в групата с висок риск – пациентите с интермедиерен > 3.5 точки, висок и много висок риск по R-IPSS.

Сравнението на нивата на микроРНКи показва, че let-7a и миР-451a имат статистически значими разлики между двете групи ($p=0.0172$ и $p=0.0449$, съответно) (Таблица 12). Нивата на тези микроРНКи са значително по-ниски при пациентите с нисък риск в сравнение с тези с висок риск,

като размерите на ефекта са големи ($r=-0.753$ за let-7a и $r=-0.62$ за miP-451a), подчертавайки тяхната клинична значимост. Останалите микроРНКи (miP-22, miP-144 и miP-16) нямат статистически значими разлики ($p>0.05$), но размерите на ефекта ($r=-0.49$, $r=-0.51$, $r=-0.56$, съответно) предполагат умерена до голяма сила на връзката. Това показва, че при по-голяма извадка тези микроРНКи могат да покажат значими различия между групите.

МикроРНК	Медиана (Нисък риск)	Медиана (Висок риск)	Р-стойност	Размер на ефекта (r)	Интерпретация
МиР-22	0.758	0.902	0.1132	-0.49	Среден към голям ефект
МиР-144	0.731	0.923	0.0968	-0.51	Голям ефект
МиР-16	0.761	0.96	0.0696	-0.56	Голям ефект
Let-7a	0.532	0.785	0.0172	-0.753	Голям ефект
МиР-451a	0.714	0.894	0.0449	-0.62	Голям ефект

Таблица 12: Резултати от сравнителен анализ между нивата на петте микроРНКи и риска определен спрямо R-IPSS.

5.3 Анализ на микроРНКи според цитогенетичният риск

В този анализ са включени само пациентите с интермедиерен и добър цитогенетичен риск, тъй като броят на пациентите с много добър, лош и много лош риск

е под 3, което не позволява надеждна статистическа оценка.

Сравнението на нивата на микроРНКи показва статистически значими разлики при миР-144 ($p=0.0287$) и миР-451a ($p=0.0481$), с голям ($r=-0.53$) и среден към голям ($r=-0.48$) ефект съответно (Таблица 13). Това подчертава потенциалната клинична значимост на тези микроРНКи в разграничаването на цитогенетичните рискови групи. При миР-16 ($p=0.0679$) размерът на ефекта ($r=-0.45$) е среден към голям, което предполага възможността тези разлики да станат статистически значими при по-голям брой пациенти. Нивата на миР-22 ($r=-0.29$) показват малък до умерен ефект, докато let-7a няма значима разлика ($p=0.8759$, $r=-0.046$) и практически няма клинично значение.

МиР	Медиана (Добър риск)	Медиана (Интермедиерен риск)	p	Размер на ефекта (r)	Интерпретация
МиР-22	0.916	0.804	0.2484	-0.29	Малък до умерен ефект
МиР-144	0.916	0.633	0.0287	-0.53	Голям ефект
МиР-16	0.9955	0.601	0.0679	-0.45	Среден към голям ефект
Let-7a	0.712	0.785	0.8759	-0.046	Минимален ефект
МиР-451a	0.8975	0.517	0.0481	-0.48	Среден към голям ефект

Таблица 13: Резултати от сравнителен анализ между нивата на петте микроРНК и цитогенетичния риск.

6. Корелационен анализ за изследване на взаимовръзки между избраните микроРНК и различни хематологични и биохимични показатели при пациенти с МДС

За изучаване на връзката между две променливи, които не отговарят на изискванията за нормално разпределение или са на рангови скали, е най-подходящо да се използва корелационният коефициент на **Spearman**. Спирмановият корелационен коефициент измерва силата и посоката на монотонната връзка между две променливи, без значение дали тази връзка е линейна.

Ако корелационните коефициенти на **Spearman** са статистически значими при равнище на значимост $\alpha = 0,05$ и двустранна критична област, това означава, че има статистически значима връзка между изучаваните променливи.

За да се определи силата на тази връзка, се тълкуват абсолютните стойности на статистически значимите корелационни коефициенти по следния начин:

- $[0,1; 0,3)$ – слаба връзка
- $[0,3; 0,5)$ – умерена връзка
- $[0,5; 0,7)$ – значима връзка
- $[0,7; 0,9)$ – силна връзка
- $[0,9; 0,99)$ – много силна връзка
- $[0,99; 1]$ – функционална или почти функционална връзка.

Спиърмановата корелация се използва предимно при рангови данни или когато променливите не са нормално разпределени. В този контекст тя осигурява по-точна оценка на връзката между две променливи, особено при изкривени разпределения или при данни, които не са количествени в класическия смисъл.

6.1 Корелационен анализ между избраните микроРНКи

Проведен е корелационен анализ на Spearman, който изследва връзките между самите микроРНКи. Абсолютните стойности на корелационните коефициенти показват различни степени на сила на връзката между променливите. Корелациите са представени в Таблица 14.

		МиР-22	МиР-144	МиР-16	Let-7a	МиР-451a
МиР-22	<i>r</i>	1	0,7870	0,8336	0,6018	0,7553
	<i>p</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
МиР-144	<i>r</i>	0,7870	1	0,9246	0,5203	0,8860
	<i>p</i>	<0,0001		<0,0001	0,0007	<0,0001
МиР-16	<i>r</i>	0,8336	0,9246	1	0,5771	0,9559
	<i>p</i>	<0,0001	<0,0001		<0,0001	<0,0001
Let-7a	<i>r</i>	0,6018	0,5203	0,5771	1	0,5389
	<i>p</i>	<0,0001	0,0007	0,0001		0,0004
МиР-451	<i>r</i>	0,7553	0,8860	0,9559	0,5389	1

		миР-22	миР-144	миР-16	let-7a	миР-451a
a	<i>p</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	

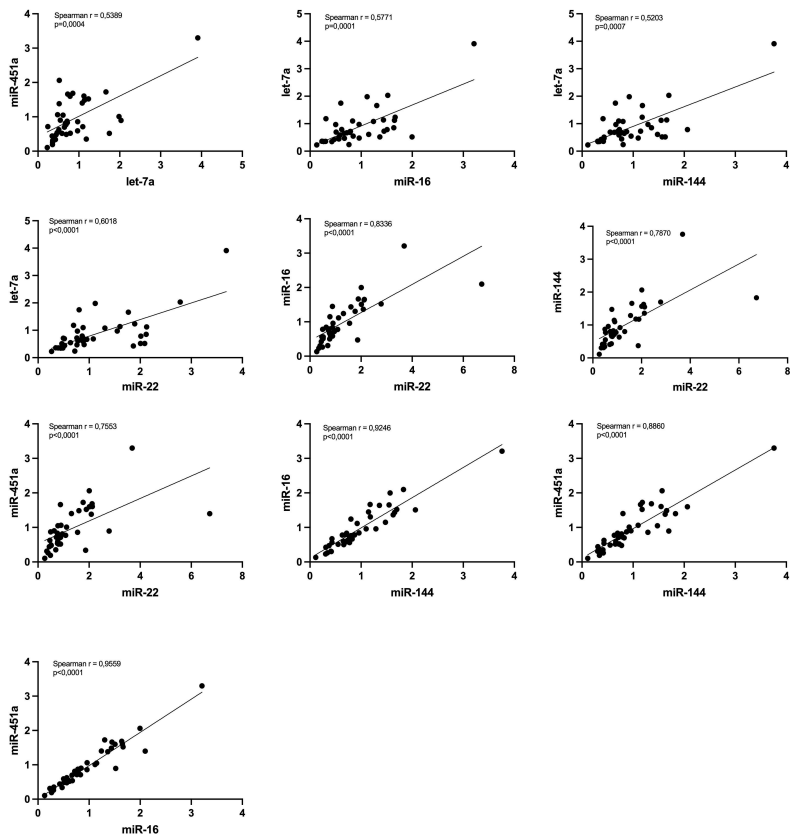
Таблица 14: Резултати от корелационен анализ между нивата на отделните микроРНКи.

Резултатите показват, че между всички микроРНКи има статистически значима положителна корелация. Значима корелация (с корелационен коефициент между 0,5 и 0,7) е установена между let-7a и останалите четири микроРНКи: миР-22, миР-144, миР-16 и миР-451a. Силна връзка (с корелационен коефициент между 0,7 и 0,9) е установена между миР-22 и миР-144, миР-16 и миР-451a, както и между миР-144 и миР-451a. Много силна връзка (с корелационен коефициент между 0,9 и 0,99) е установена между миР-16 и миР-144, както и между миР-16 и миР-451a. Всички корелации са с положителни стойности, което показва, че увеличаването на нивата на една микроРНК е свързано с увеличаване на нивата на другите. Тези връзки са визуализирани чрез scatter plots, което позволява ясно да се види посоката и силата на корелациите (Фигура 17), а схематично получените обобщените резултати са представени на таблица 15.

		миР-22	миР-144	миР-16	let-7a	миР-451a
миР-22	Връзка		силна	силна	значим а	силна

	Значимост		значима	значима	значима	значима
миР-144	Връзка	силна		много силна	значима	силна
	Значимост	значима		значима	значима	значима
миР-16	Връзка	силна	много силна		значима	много силна
	Значимост	значима	значима		значима	значима
let-7a	Връзка	значима	значима	значима		значима
	Значимост	значима	значима	значима		значима
миР-451a	Връзка	силна	силна	много силна	значима	
	Значимост	значима	значима	значима	значима	

Таблица 15: Схематично представяне на получените резултати от корелационния анализ между нивата на отделните микроРНКи.



Фигура 17: Scatter plots, показващи резултатите от корелационния анализ между нивата на отделните микроРНКи.

Използвана е простата линейна регресия, за да се оцени връзката между нивата на избраните микроРНКи, като целта е да се установи дали има линейна зависимост между тези променливи. На таблица 16 са представени резултатите от анализа, като **R²**: Показва процентът на вариацията в зависимата променлива, който може да бъде

обяснен от независимата променлива (миР), **b0**: Интерсептът показва прогнозната стойност на зависимата променлива, когато независимата променлива (миР) е нула, **b1**: Коефициентът на регресия, който показва как се променя зависимата променлива при всяка единична промяна в независимата променлива (миР), CI b1 е 95% доверителен интервал за коефициента b1 (Slope) и показва диапазона от стойности, в който с 95% вероятност се намира истинската стойност на наклона в популацията. **p-стойност за b1**: Показва дали регресионният коефициент b1 е статистически значим, **Стандартна грешка (SE) на b1**: Оценява точността на коефициента b1.

Независима променлива	Зависима променлива	R^2	b1	b0	CI b1	p	SE
МиР-22	миР-144	0,48	0,3958	0,4801	0,2605 - 0,5311	<0,0001	0,06684
МиР-22	миР-16	0,58	0,4096	0,4497	0,2957 - 0,5235	<0,0001	0,5625
МиР-22	let-7a	0,46	0,6046	0,1834	0,3875 - 0,8217	<0,0001	0,1071
МиР-22	миР-451a	0,36	0,3258	0,5353	0,1831 - 0,4685	<0,0001	0,07049
МиР-144	миР-16	0,87	0,8748	0,1117	0,7623 - 0,9872	<0,0001	0,05553
МиР-144	let-7a	0,49	0,7167	0,1859	0,4712 - 0,9623	<0,0001	0,1212
МиР-144	миР-451a	0,80	0,8496	0,1139	0,7096 - 0,9897	<0,0001	0,06917
МиР-16	let-7a	0,46	0,7611	0,1579	0,4872 - 1,035	<0,0001	0,1351

миР-16	миР-451a	0,91	0,9675	0,0091 18	0,8699 - 1,065	<0,0001	0,04818
Let-7a	миР-451a	0,39 5	0,5901	0,4253	0,3470 - 0,8333	<0,0001	0,1200

Таблица 16: Резултати от проста линейна регресия за оценка на връзката между отделните микроРНКи.

Въз основа на резултатите от проведения регресионен анализ за връзката между петте микроРНКи беше установено, че силна връзка (с $R^2 > 0,7$) съществува за двойките **миР-144 с миР-16**, **миР-144 с миР-451a** и **миР-16 с миР-451a**. Тези резултати показват, че значителна част от вариацията в нивата на едната микроРНК може да бъде обяснена чрез вариацията в нивата на другата. Умерена връзка (с R^2 между 0,5 и 0,7) е установена между **миР-22 и миР-16**, което показва по-умерена, но все пак значима връзка между тези променливи. За останалите двойки, въпреки че е установена статистически значима корелация, е регистрирана слаба връзка ($R^2 < 0,5$), което може да се дължи на влиянието на други фактори, които не са включени в модела на анализа. Допълнително, всички 95% доверителни интервали са тесни, тъй като са под 10% от стойността на наклона, което показва висока прецизност в оценката на регресионните коефициенти.

6.2 Корелационен анализ между микроРНКи и лабораторни показатели

Осъществен е корелационен анализ и между всяка от микроРНКите и специфичните лабораторни показатели, а именно: хемоглобин, ретикулоцити, левкоцити, неутрофили, тромбоцити, ЛДХ (лактатдехидрогеназа),

бета2-микроглобулин, феритин и ниво на еритропоетин (Таблица 17).

Анализът установява следните значими връзки:

- **миР-22** показва статистически значима умерена корелация с нивата на ЛДХ и еритропоетина.
- **миР-144** показва статистически значима умерена корелация с нивата на ЛДХ и феритин.
- **миР-16** показва статистически значима умерена връзка с нивата на феритин.
- **Let-7a** показва статистически значима значима корелация с ЛДХ
- **миР-451a** показва статистически значима умерена корелация с феритин.

Не са установени значими корелации между микроРНКите и нивата на хемоглобин, ретикулоцити, левкоцити, неутрофили, тромбоцити и бета2-микроглобулин.

Лабораторни показатели	let7a		миР-16		миР-22		миР-144		миР-451a	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Хемоглобин (g/L)	0,23 17	0,15 58	-0,11 52	0,47 91	-0,10 54	0,51 74	0,01 633	0,92 03	-0,1 480	0,36 20
Ретикулоцит и (%)	0,26 86	0,13 07	-0,09 811	0,58 10	0,13 57	0,44 42	-0,0 426 3	0,81 08	-0,2 022	0,25 16
Левкоцити ($\times 10^9/L$)	0,15 08	0,35 94	0,05 694	0,72 71	0,09 062	0,57 81	0,11 18	0,49 21	0,11 31	0,48 70

Неутрофили ($\times 10^9/L$)	0,02 915	0,86 02	-0,02 927	0,85 77	-0,02 608	0,87 31	-0,0 017 82	0,99 13	0,03 171	0,84 60
Тромбоцити ($\times 10^9/L$)	-0,0 433 3	0,79 34	0,18 03,	0,26 55	0,20 62	0,20 17	0,22 17	0,16 92	0,14 56	0,37 00
ЛДХ (U/L)	0,56 52	0,00 02	0,311 4,	0,05 05	0,39 70	0,01 12	0,37 04	0,01 86	0,26 77	0,09 50
Бета2-микроглобулин (mg/L)	-0,1 766	0,28 20	-0,05 319	0,74 44	0,08 063	0,62 09	-0,0 979 7	0,54 75	-0,1 467	0,36 64
Еритроцити (U/l)	0,23 17	0,21 80	0,31 34	0,08 61	0,35 92	0,04 72	0,31 72	0,08 21	0,30 51	0,09 52
Феритин ($\mu g/L$)	0,11 69	0,49 09	0,33 74	0,03 83	0,26 10	0,11 35	0,32 82	0,04 43	0,37 30	0,02 11

Таблица 17: Резултати от корелационен анализ между нивата на микроРНКи и определени лабораторни показатели.

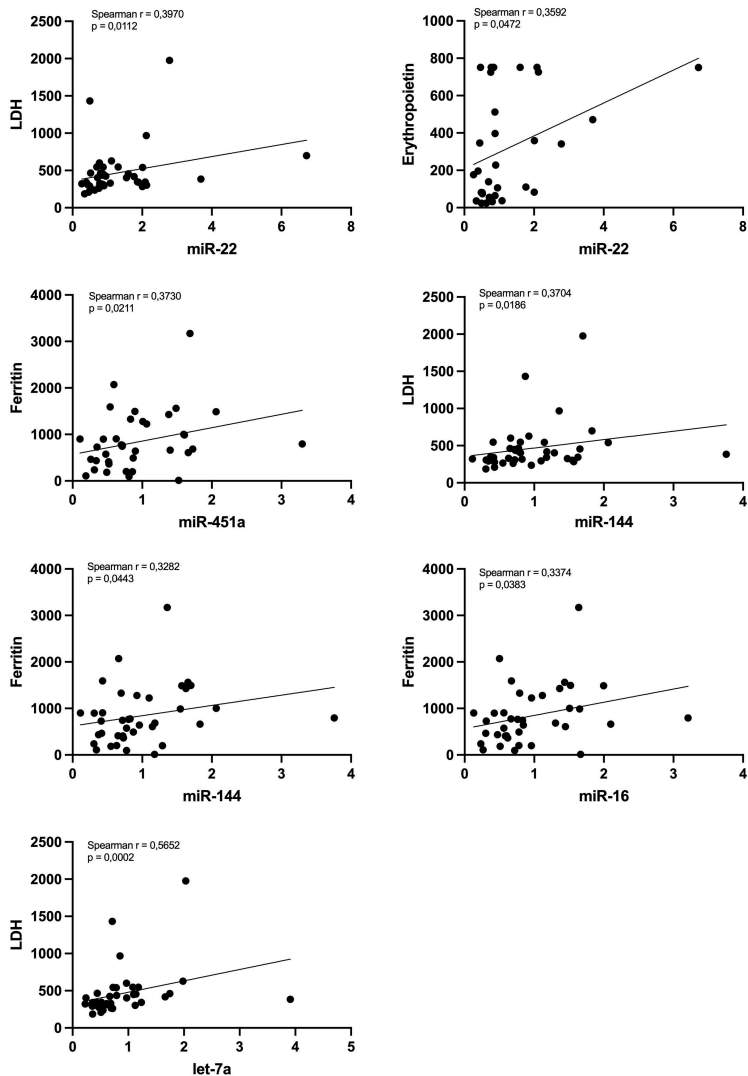
За по-дълбоко разбиране на тези връзки, анализът е продължен чрез проста линейна регресия между микроРНКите и лабораторните показатели, за които е установена статистически значима корелация (Таблица 18). Този подход позволи да се оцени степента на линейната зависимост и да се определи дали лабораторните показатели могат да бъдат предсказани въз основа на нивата на микроРНКите.

МиР	Лабораторни показатели	R^2	b1	b0	CI b1	p	SE
МиР-22	LDH	0,08	80,82	362,6	-9,184 - 170,8	0,077	44,46

МиР-22	Еритропоетин	0,16	88,06	208,0	10,39 - 165,7	0,0277	37,98
МиР-144	LDH	0,05	112,8	355,2	-47,15 - 272,9	0,1615	79,04
МиР-144	Феритин	0,06	220,7	622,9	-86,05 - 527,4	0,1532	151,2
МиР-16	Феритин	0,08	283,6	565,6	-36,88 - 604	0,0811	158
Let-7a	LDH	0,1	153,0	326,3	-3,429 - 309,4	0,0550	77,19
МиР-451a	Феритин	0,09	287,9	568,7	-29,16 - 605	0,0738	156,3

Таблица 18: Резултати от проста линейна регресия за оценка на връзката между микроРНКи и определени лабораторни показатели.

Въз основа на проведеня регресионен анализ не се установяват значими връзки между лабораторните показатели и микроРНКите. Въпреки статистически значимите корелации, регресионните модели показват, че лабораторните показатели не могат да бъдат надеждно предсказани въз основа на нивата на микроРНКите. Това може да се дължи на влиянието на други фактори, които не са включени в анализа и които вероятно оказват по-силно въздействие върху тези лабораторни показатели. Данните от корелационния и регресионния анализ са представени графично чрез scatter plots, което позволява визуализация на връзките между променливите (Фигура 18).



Фигура 18: Scatter plots, показващи резултатите от корелационния анализ между нивата на микроРНКи и определени лабораторни показатели.

6.3 Корелационен анализ между нивата на микроРНК и процента бласти в костния мозък

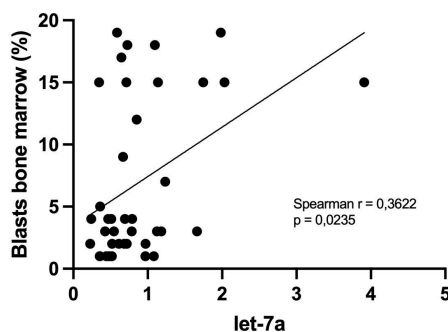
Допълнително е проведен корелационен анализ между нивата на микроРНКите и процента бласти в костния мозък (Таблица 19).

	Бласти в костен мозък (%)	
	Spearman r	p стойност
МиР-22	0,1284	0,4298
МиР-144	0,1179	0,4687
МиР-16	0,1643	0,3109
Let-7a	0,3622	0,0235
МиР-451a	0,1173	0,4709

Таблица 19: Резултати от корелационен анализ между нивата на микроРНК и процента бласти в костен мозък.

От анализът се установява статистически значима, положителна, умерена корелация между нивата на **let-7a** и процента бласти в костния мозък (Фигура 19). Не се установява корелация между останалите миР и процента на бласти в костен мозък. На тази основа е проведен и

проста линейна регресия, която обаче не установява значима предиктивна връзка, като стойността на R^2 е 0,17. Доверителният интервал за коефициента на наклона е от 1,059 до 6,902, а р-стойността е 0,0089, което показва статистическа значимост, но ниска предсказваща стойност на модела. Данните от този анализ са представени графично чрез scatter plot за визуализация на връзката.



Фигура 19: Графично изобразяване на резултат от корелационен анализ между нивата на let-7a и процент бласти в костен мозък.

7. Определяне на диагностична стойност на подобрани миР

Следващата част от анализа е насочена към оценка на предиктивната диагностична стойност на четирите микроРНКи, за които е установена статистически значима разлика между пациентите с МДС и здравите контроли. За целта е проведен единичен логистичен регресионен анализ, който оценява вероятността тези микроРНКи да

служат като предиктори за разграничаване на двете групи (Таблица 20). Изчислени са следните показатели:

- **β_0 (Intercept):** Това е интерсептът на логистичния модел, който показва логаритмичната вероятност (log-odds) за принадлежност към групата на пациентите, когато нивото на микроРНК е нула.
- **β_1 (Slope):** Коефициентът на наклона показва промяната в логаритмичната вероятност (log-odds) при промяна на нивото на микроРНК с една единица.
- **Odds Ratio (OR):** Това е експоненциалната стойност на β_1 , която показва съотношението на шансовете (odds) за принадлежност към групата на пациентите. $OR < 1$ показва, че повишаването на нивото на микроРНК намалява шансовете за принадлежност към пациентската група.
- **95% CI (OR):** Това е доверителният интервал за Odds Ratio. Ако интервалът не включва 1, връзката е статистически значима.
- **P-value (β_1):** Това е р-стойността за β_1 , която показва дали наклонът е статистически значим. $P < 0.05$ показва значима връзка.
- **Pseudo- R^2 :** Това е аналогът на коефициента на детерминация R^2 за логистична регресия и показва каква част от вариацията в зависимата променлива може да бъде обяснена от модела.
- **Deviance:** Показва отклонението на модела от идеалния модел. По-ниските стойности на девиацията показват по-добра адаптация на модела.

- **Chi-Square (χ^2):** Това е статистически тест за значимост на модела. По-високи стойности и $p < 0.05$ показват значима връзка.

МиР	β_0	β_1	OR	95% CI (OR)	p (β_1)	Pseudo-R ²	Deviance	Chi-Square (χ^2)	p (χ^2)
МиР-16	4.016 (2.177 до 6.670)	-1.941 (-3.589 до -0.7598)	0.1436	[0.02763, 0.4677]	0.0055	0.2428	38.16	11.88	0.0006
МиР-451a	4.999 (2.826 до 8.396)	-2.411 (-4.330 до -1.145)	0.08977	[0.01317, 0.3182]	0.0022	0.4193	30.57	19.47	<0.0001
МиР-144	3.548 (1.962 до 5.770)	-1.555 (-2.897 до -0.5846)	0.2111	[0.05520, 0.5573]	0.0074	0.2552	38.67	11.37	0.0007
Let-7a	3.095 (1.681 до 4.946)	-1.430 (-2.652 до -0.4638)	0.2393	[0.07049, 0.6289]	0.0092	0.2048	40.64	8.953	0.0028

Таблица 20: Резултати от логистичен регресионен анализ за определяне възможността определените микроРНК да служат за разграничаване на пациенти с МДС от здрави контроли.

7.1 Описание на резултатите за отделните микроРНК

За миР-16, коефициентът на наклона β_1 е -1.941, което води до OR от 0.1436 (95% CI: [0.02763, 0.4677]),

показвайки, че по-високите нива на тази микроРНК значително намаляват шансовете за наличие на заболяване. Р-стойността на β_1 е 0.0055, което показва статистически значима връзка.

За миР-451а, коефициентът β_1 е -2.411, а OR е 0.08977 (95% CI: [0.01317, 0.3182]), което също сочи силно намаляване на шансовете за принадлежност към пациентската група при по-високи нива на тази микроРНК. Р-стойността е 0.0022, което също потвърждава значимостта на връзката.

По отношение на миР-144, с $\beta_1 = -1.555$ и OR от 0.2111 (95% CI: [0.05520, 0.5573]), е установено, че по-високите нива на тази микроРНК също намаляват вероятността за принадлежност към пациентската група. Р-стойността от 0.0074 показва значима връзка.

И накрая, за let-7а, коефициентът β_1 е -1.430 с OR от 0.2393 (95% CI: [0.07049, 0.6289]), което също показва статистически значима връзка с р-стойност от 0.0092.

В допълнение към анализа на коефициентите на регресия, са разгледани и стойностите на Pseudo- R^2 , които показват колко добре моделът обяснява вариацията в зависимата променлива за всяка от микроРНКите. Най-високото Pseudo- R^2 е установено за миР-451а, което е 0.4193, показващо, че приблизително 42% от вариацията в диагностичния модел може да бъде обяснена чрез тази микроРНК. Това потвърждава високата предиктивна стойност на миР-451а.

За миР-16 е изчислено Pseudo- R^2 от 0.2428, което показва, че около 24% от вариацията в модела може да бъде

обяснена от тази микроРНК. Въпреки че стойността е по-ниска в сравнение с миР-451а, тя все пак предполага умерена предсказваща способност.

МиР-144 и let-7a показват стойности на Pseudo-R² съответно от 0.2552 и 0.2048, което означава, че около 25% и 20% от вариацията в диагностичните модели могат да бъдат обяснени чрез тези микроРНКи. Въпреки че и двете микроРНКи имат статистически значими връзки, тяхната предиктивна стойност е по-ниска в сравнение с миР-451а.

За всички модели е използван Chi-square тест за оценка на статистическата значимост на модела. За миР-451а Chi-square стойността е 19.47 с $p < 0.0001$, което показва изключително значима връзка. миР-16 и миР-144 показват също значими резултати с Chi-square стойности съответно от 11.88 ($p = 0.0006$) и 11.37 ($p = 0.0007$), което потвърждава значимостта на моделите за тези микроРНКи. За let-7a Chi-square стойността е 8.953 с $p = 0.0028$, което също показва значима връзка, макар и с по-ниска предсказваща стойност в сравнение с останалите микроРНКи.

Обобщение на резултатите

Проведеният логистичен регресионен анализ оцени връзката между четири микроРНКи и вероятността за принадлежност към групата на пациентите с миелодиспластичен синдром. Анализът показва, че всички разгледани микроРНКи (миР-16, миР-451а, миР-144 и let-7a) имат статистически значими връзки. За всяка

микроРНК беше установено, че по-високите й нива са свързани с намалени шансове за наличие на заболяване.

Стойностите на Pseudo-R² показват, че моделите обясняват умерена до значителна част от вариациите в данните, като най-високата предсказваща стойност е установена за miP-451a.

Chi-square тестът допълнително потвърди значимостта на всички модели, като най-силна връзка е установена отново за miP-451a. Въпреки че всички модели показват значима статистическа връзка, miP-451a изпъква като най-силният предиктор и има най-добра предсказваща стойност сред изследваните микроРНКи.

7.2 Оценка на предиктивната стойност на микроРНКите чрез регресионен анализ

За определяне на предиктивната способност на петте изследвани микроРНКи (miP-22, miP-144, miP-16, let-7a, miP-451a), е използван регресионен анализ. Поради наблюдаваната мултиколинеарност (висока корелация между някои от микроРНКите), която може да повлияе на стабилността и интерпретацията на коефициентите в модела, е проведен LASSO анализ (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator). Този метод позволява идентифициране на най-значимите предиктори чрез редуциране на коефициентите на по-слабо свързаните микроРНКи до нула и оценка на техния комбиниран ефект върху вероятността за принадлежност към групата на пациентите.

Изследвани са коефициентите на регресия (β), които показват силата и посоката на връзката между всяка

микроРНК и вероятността за принадлежност към групата на пациентите, както и съотношението на шансовете (Odds Ratio - OR), което показва колко пъти се променят шансовете за принадлежност към пациентската група при промяна в нивата на микроРНКите. Също така са определени показатели за представяне на модела: AUC и AIC (Akaike Information Criterion), който измерва качеството на модела, като по-ниски стойности показват по-добра пригодност.

Резултатите показват, че miP-22 и miP-451a имат най-значими коефициенти на регресия β , съответно 0.260 (95% CI: [0.095, 0.419]) и -0.362 (95% CI: [-0.889, 0.053]) (Таблица 21). Това означава, че по-високите нива на miP-22 са свързани с по-високи шансове за принадлежност към групата на пациентите (OR = 1.297, 95% CI: [1.100, 1.521]), докато по-високите нива на miP-451a са свързани с намалени шансове за принадлежност към пациентската група (OR = 0.696, 95% CI: [0.411, 1.054]).

Останалите микроРНКи показват по-слаба връзка с принадлежността към групата на пациентите. MiP-144 има коефициент $\beta=0.015$ (95% CI: [-0.225, 0.257]) и OR = 1.015 (95% CI: [0.799, 1.293]), което показва минимално влияние. miP-16 има коефициент $\beta=-0.010$ (95% CI: [-0.534, 0.575]) и OR = 0.990 (95% CI: [0.586, 1.777]), което показва слабо намаляване на шансовете от заболяване, при по-високи нива на микроРНК. По същия начин, let-7a има отрицателен коефициент $\beta=-0.070$ (95% CI: [-0.216, 0.039]) и OR = 0.932 (95% CI: [0.806, 1.040]), което предполага слабо намаляване на шансовете за заболяване при по-високи нива на микроРНК.

Показателите за представяне на модела потвърждават неговата ефективност: AUC е 0.994 (95% CI: [0.973, 1.0]), което показва висока дискриминационна способност на модела, AIC е 31.109, а общата точност на теста е 91.84%.

Променлива	Коефициент β (95% CI)	Odds Ratio (95% CI)	Модел (AUC/AIC/Точност)
Intercept	0.796 (0.725, 0.866)	2.216 (2.065, 2.377)	AUC: 0.994, AIC: 31.109, 91.84%
МиР-22	0.260 (0.095, 0.419)	1.297 (1.100, 1.521)	
МиР-144	0.015 (-0.225, 0.257)	1.015 (0.799, 1.293)	
МиР-16	-0.010 (-0.534, 0.575)	0.990 (0.586, 1.777)	
Let7a	-0.070 (-0.216, 0.039)	0.932 (0.806, 1.040)	
МиР-451a	-0.362 (-0.889, 0.053)	0.696 (0.411, 1.054)	

Таблица 21: Резултати от LASSO анализ за определяне на предиктивната стойност на петте изследвани микроРНКи.

Въз основа на резултатите от първоначалния LASSO анализ е взето решение да бъде проведен опростен анализ, фокусиран само върху двете микроРНКи с най-голямо значение за диагнозата – **миР-22** и **миР-451a**. Тези микроРНКи са избрани поради значимите им коефициенти и силните им връзки с вероятността за принадлежност към групата на пациентите, показани в първоначалния модел. Провеждането на анализа с тези две микроРНКи позволява да се оцени техният комбиниран ефект и предиктивната им стойност за

разграничаване на пациентите с миелодиспластичен синдром от контролната група.

В опростения LASSO анализ, се установява, че и двете миР остават значими предиктори в модела. Коефициентът β за миР-22 е 0.228 (95% CI: [0.095, 0.378]), което предполага, че по-високите нива на тази микроРНК са свързани с по-високи шансове за принадлежност към пациентската група (Таблица 22). Това се потвърждава от OR, който е 1.256 (95% CI: [1.100, 1.460]), показвайки повишен риск от заболяване при по-високи нива на миР-22.

От друга страна, миР-451а има отрицателен коефициент β от -0.378 (95% CI: [-0.509, -0.256]), което предполага, че по-високите й нива намаляват вероятността за принадлежност към пациентската група. OR за тази микроРНК е 0.685 (95% CI: [0.601, 0.774]), което показва намалени шансове за заболяване при по-високи нива на миР-451а.

Показателите за представяне на модела остават високи: AUC е 0.994 (95% CI: [0.974, 1.0]), което показва отлична способност на модела да различава пациентите от контролните лица, а AIC намалява до 24.916, като общата точност на модела се повишава до 95.92%.

Променлива	Коефициент β (95% CI)	Odds Ratio (95% CI)	Модел (AUC/AIC/Точност)
Intercept	0.799 (0.710, 0.876)	2.224 (2.034, 2.402)	AUC: 0.994, AIC: 24.916, 95.92%
МиР-22	0.228 (0.095, 0.378)	1.256 (1.100, 1.460)	

миР-451а	-0.378 (-0.509, -0.256)	0.685 (0.601, 0.774)	
----------	----------------------------	-------------------------	--

Таблица 22: Резултати от опростен LASSO анализ, включващ миР-22 и миР-451а

За да бъдат потвърдени резултатите от опростения LASSO анализ, е проведен и многофакторен логистичен регресионен анализ, включващ двете микроРНК с най-голямо значение — миР-22 и миР-451а. Допълнително, е извършен анализ за оценка на мултиколинеарността чрез изчисляване на Variance Inflation Factor (VIF), за да се потвърди, че няма значимо припокриване между двете микроРНК в модела, което би могло да повлияе на стабилността и интерпретацията на резултатите.

Резултатите от многофакторния логистичен регресионен анализ, включващ миР-22 и миР-451а, потвърждават техния съвместен значим предиктивен ефект. Коефициентът на регресия β за миР-22 е 10.31 (95% CI: [3.180, 35.99]), което показва силна положителна връзка с вероятността за принадлежност към пациентската група (Таблица 23). От друга страна, миР-451а има отрицателен коефициент β от -8.912 (95% CI: [-22.32, -3.946]), което предполага, че по-високите й нива значително намаляват шансовете за принадлежност към пациентската група.

Оценката на представянето на модела показва отлична дискриминационна способност с AUC от 0.995 (95% CI: [0.982, 1.000]), което демонстрира висока точност в разграничаването на пациентите от здравите контроли. AIC е допълнително намален до 13.73, а общата точност

на модела достига 96%, което потвърждава добрата му пригодност.

При анализа на мултиколинеарността, изчислените стойности на VIF за миР-22 и миР-451а са близки до 1 (1.183), което показва липса на значима мултиколинеарност между двете микроРНК и потвърждава стабилността на модела.

Променлива	Коефициент β (95% CI)	Odds Ratio (95% CI)	Модел (AUC/AIC/Точност)	VIF
Intercept	4.397 (-3.567, 12.361)	81.20 (0.09993, 4.77e+06)	AUC: 0.995, AIC: 13.73, 96.00%	—
МиР-22	10.31 (3.180, 35.99)	29,934 (24.04, 4.28e+15)		1.183
МиР-451а	-8.912 (-22.32, -3.946)	0.0001347 (2.03e-10, 0.01933)		1.183

Таблица 23: Резултати от многофакторен логистичен регресионен анализ за определяне на предиктивната стойност на миР-22 и миР-451а за разграничаване на пациенти и здрави контроли.

В заключение, проведените анализи подчертават значимата роля на **миР-22** и **миР-451а** като предиктори за принадлежност към групата на пациентите с миелодиспластичен синдром. Първоначалният LASSO анализ, включващ всички микроРНК, идентифицира тези две като най-значими, а последващите опростен и многофакторен анализ потвърждават тяхната силна предиктивна стойност. **миР-22** показва положителна връзка с вероятността за заболяване, докато **миР-451а**

има обратна връзка, предполагайки защитен ефект. Моделите демонстрират отлична точност и стабилност, което подкрепя диагностичната значимост на тези две микроРНКи.

8. Оценка на предиктивната роля на микроРНКите при разграничаване на висок и нисък риск МДС според R-IPSS

8.1 LASSO анализ на петте микроРНКи

Следващата част от анализа е фокусирана върху предиктивната способност на микроРНКите да разграничат високорисков от нискорисков МДС спрямо R-IPSS. Първоначалният анализ показва, че само let-7a и miP-451a демонстрират разлика между двете групи. За да се установи дали други микроРНКи имат предиктивна стойност за това разграничение, е проведен LASSO анализ. Чрез този метод е възможно да се идентифицират допълнителни микроРНКи, които може да играят значима роля при определяне на риска при МДС.

Резултатите от LASSO анализа показват различни коефициенти (β) и съответните им OR за всяка от микроРНКите. Коефициентът на let-7a е 1.275 (95% CI: [0.000, 5.617]), като съответното Odds Ratio (OR) е 3.579 (95% CI: [1.000, 57.461]), което предполага, че по-високите нива на let-7a увеличават вероятността за принадлежност към високорисковата група предполагайки, че по-високите нива на тази микроРНК са свързани с по-висок риск МДС (Таблица 24). За останалите микроРНКи (miP-22, miP-144, miP-16, miP-451a), коефициентите и OR показват

различни тенденции, но всички имат широки доверителни интервали, което предполага несигурност в ролята им.

Показателите за представяне на модела демонстрират умерена дискриминационна способност с AUC от 0.712 (95% CI: [0.500, 0.931]) и точност от 64.1%. AIC на модела е 55.841, което показва умерена пригодност на анализа. Интерсептът на модела е изчислен с коефициент 0.617 (95% CI: [-0.211, 2.344]) и съответен OR от 1.854 (95% CI: [0.810, 10.421]).

Променлива	Коефициент β (95% CI)	Odds Ratio (95% CI)	Представяне на модела
МиР-22	-0.278 [-2.562, 1.331]	0.757 [0.112, 5.544]	AUC: 0.712 (95% CI: [0.500, 0.931]), Точност: 64.1%, AIC: 55.841
МиР-144	0 [-2.954, 3.692]	1 [0.055, 16.924]	
МиР-16	0 [-11.963, 3.109]	1 [0.0002, 72.111]	
Let7a	1.275 [0.000, 5.617]	3.579 [1.000, 57.461]	
МиР-451a	0.237 [-1.571, 8.580]	1.267 [0.174, 1124.977]	
Intercept	0.617 [-0.211, 2.344]	1.854 [0.810, 10.421]	

Таблица 24: Резултати от LASSO анализ за определяне на предиктивната способност на петте микроРНК за разграничаване на висок и нисък риск МДС.

8.2 Еднофакторен логистичен регресионен анализ на let-7a

Тъй като резултатите от LASSO анализа показват, че само let-7a има потенциална предиктивна роля при

разграничаването на висок и нисък риск МДС, е проведен еднофакторен логистичен регресионен анализ. Целта на този анализ е да се оцени самостоятелното влияние на let-7a върху вероятността за принадлежност към високорисковата или нискорисковата група, като се определи неговата значимост и предиктивна стойност в този контекст.

Резултатите показват значим ефект на тази микроРНК върху модела (Таблица 25). Коефициентът на наклона β_1 за let-7a е изчислен като 2.154 (95% CI: [0.4085, 4.636]), с р-стойност от 0.0447, което показва статистически значима връзка. Стандартната грешка (SE) е 1.073, а съответното Odds Ratio (OR) е 8.620 (95% CI: [1.505, 103.1]), което предполага, че по-високите нива на let-7a увеличават шанса за принадлежност към високорисковата група.

Оценката на представянето на модела показва AUC от 0.7065 (95% CI: [0.5436, 0.8694]), с р-стойност от 0.03, което показва умерена способност на модела да разграничава висок и нисък риск МДС. Pseudo- R^2 е 0.1441, което предполага, че 14.41% от вариацията в зависимата променлива може да бъде обяснена от модела. Стойността на Chi-squared (χ^2) е 6.702, с р-стойност от 0.0096, показваща значимост на модела.

Променлива	β (95% CI)	SE	OR (95% CI)	p	χ^2	p (χ^2)	AUC (95% CI)	p (AUC)	R ²	Dev
Intercept (β_0)	-1.292 (-3.083, 0.1826)	0.8227	0.2747 (0.04584, 1.200)	—	—	—	—	—	—	—

Let-7a (β_1)	2.154 (0.4085, 4.636)	1.07 3	8.620 (1.505, 103.1)	0.0 447	6.70 2	0.00 96	0.7065 (0.5436 0.8694)	0.03	0.1 441	46.1
-------------------------	-----------------------------	-----------	----------------------------	------------	-----------	------------	------------------------------	------	------------	------

Таблица 25: Резултати от еднофакторен логистичен регресионен анализ на let-7a за разграничаване на висок и нисък риск МДС.

Еднофакторният логистичен регресионен анализ потвърждава, че let-7a има значима предиктивна роля за разграничаване на висок и нисък риск МДС, като по-високите й нива са свързани с увеличен шанс за принадлежност към високорисковата група. Моделът показва умерена дискриминационна способност и значима връзка, подкрепяйки потенциалната предиктивна стойност на let-7a в стратификацията на риска при МДС.

9. Определяне на предиктивната стойност на микроРНКите за различните типове МДС

9.1 LASSO анализ на петте микроРНКи

Следващата част от анализа е насочена към определяне на предиктивната стойност на микроРНКите по отношение на различните типове МДС. Поради ограничения брой пациенти, те са разделени на две групи – пациенти с МДС с нисък процент на бласти (включващи случаи на МДС с мултилинеарна дисплазия, МДС с ринг сидеробласти и МДС del5q) и пациенти с МДС и висок процент на бласти (RAEB I и II). Тъй като само една микроРНК показва различни стойности между тези две групи, първоначално е проведен LASSO анализ на всички изследвани

микроРНКи, за да се оцени тяхната предиктивна роля в диференциацията на различните типове МДС.

Резултатите от LASSO анализа, показват, че от петте изследвани микроРНКи само let-7a има значима предиктивна роля (Таблица 26). Коефициентът на регресия (β) за let-7a е 1.547 (95% CI: [0.031, 3.064]), с (OR) от 4.70 (95% CI: [1.03, 21.41]). Това предполага, че по-високите нива на let-7a са свързани с по-високи шансове за принадлежност към групата с висок процент бласти.

Останалите микроРНКи (миР-22, миР-144, миР-16, и миР-451a) показват по-слаба връзка и широки доверителни интервали за техните коефициенти и OR, което индикира липса на значима предиктивна стойност.

Представянето на модела е оценено чрез AUC, което е 0.74 (95% CI: [0.56, 0.90]), показващо добра дискриминационна способност. Стойността на AIC е 52.14, а общата точност на модела е 74%, което предполага умерена ефективност на модела при разграничаването на пациенти с нисък и висок процент бласти.

Променлива	Коефициент β (95% CI)	Odds Ratio (95% CI)	Представяне на модела
МиР-22	-1.526 [-3.715, 0.663]	0.22 [0.02, 1.94]	AUC: 0.74 (95% CI: [0.56, 0.90]), AIC: 52.14, Точност: 74%
МиР-144	0.235 [-2.107, 2.578]	1.27 [0.12, 13.17]	
МиР-16	2.348 [-2.284, 6.981]	10.47 [0.10, 1075.80]	

Let7a	1.547 [0.031, 3.064]	4.7 [1.03, 21.41]	
МиР-451a	-1.419 [-4.741, 1.902]	0.24 [0.01, 6.70]	
Intercept	-0.736 [-1.509, 0.037]	0.48 [0.22, 1.04]	

Таблица 26: Резултати от LASSO анализ за определяне на предиктивната способност на петте микроРНКи за разграничаване на МДС с нисък процент бласти и МДС с висок процент бласти.

9.2 Еднофакторен логистичен регресионен анализ на let-7a

Проведен е еднофакторен логистичен регресионен анализ, фокусиран само върху let-7a, с цел да се оцени самостоятелната му предиктивна роля за разграничаване на пациентите с МДС с нисък и с висок процент бласти. Този анализ има за цел да предостави по-точна оценка на неговия ефект върху вероятността за принадлежност към една от двете групи.

Анализът показва статистически значима връзка между нивата на let-7a и вида МДС (Таблица 27). Коефициентът на наклона (β_1) за let-7a е изчислен като 1.782 (95% CI: [0.3984, 3.681]), със стандартна грешка от 0.8356 и р-стойност от 0.0329, съответното OR е 5.943 (95% CI: [1.489, 39.69]), което показва повишен риск от МДС с висок процент бласти при по-високи нива на let-7a.

Представянето на модела е оценено чрез AUC от 0.7219 (95% CI: [0.5488, 0.8950]), с р-стойност от 0.0255, което показва умерена способност на модела да различава

групите. Анализът на Chi-squared (G squared) е 7.176 с р-стойност от 0.0074, което потвърждава значимостта на модела. Pseudo-R² е 0.1681, което показва, че около 16.81% от вариацията в зависимата променлива може да бъде обяснена от модела, а девиацията (Dev) на модела е 42.47.

Променлива	β (95% CI)	SE	OR (95% CI)	p	χ^2	p (χ^2)	AUC (95% CI)	p (AUC)	R ²	Dev
Intercept (β_0)	-2.275 (-4.074, -0.8609)	0.8115	0.1028 (0.01700, 0.4228)	—	—	—	—	—	—	—
Let-7a (β_1)	1.782 (0.3984, 3.681)	0.8356	5.943 (1.489, 39.69)	0.0329	7.176	0.0074	0.7219 (0.5436, 0.8950)	0.0255	0.1681	42.47

Таблица 27: Резултати от еднофакторен логистичен регресионен анализ на let-7a за разграничаване на МДС с нисък процент бласти и МДС с висок процент бласти.

В обобщение, анализът показва, че let-7a има значима предиктивна роля при разграничаването на пациентите с различен тип МДС. LASSO анализът идентифицира let-7a като най-силния предиктор сред изследваните микроРНКи, а еднофакторният логистичен регресионен анализ потвърждава тази връзка, демонстрирайки, че по-високите нива на let-7a са свързани с увеличен шанс за принадлежност към групата с МДС с висок процент бласти. Моделът показва умерена дискриминационна способност и значима предиктивна стойност.

10. Определяне прогностичната стойност на подобрите плазмени микроРНК

Следващата част от анализа има за цел да определи прогностичната стойност на всяка изследвана микроРНК спрямо преживяемостта на пациентите с МДС. За тази цел е избран подходът на индивидуален анализ, при който всяка микроРНК се оценява поотделно с помощта на Cox proportional hazards модел. Този модел позволява да се определи как нивата на всяка микроРНК влияят върху времето до събитие (смърт), като се отчита цензурирането на данните.

Коксовата регресия предоставя коефициенти на риска (Hazard Ratios, HR), които показват относителния риск, свързан с промяната в нивата на микроРНК. $HR > 1$ показва повишен риск, $HR < 1$ – намален риск, а р-стойностите определят статистическата значимост на връзката. Този подход позволява по-задълбочено изследване на индивидуалния ефект на всяка микроРНК, което е от особено значение за оценката на техния потенциал като прогностични биомаркери.

10.1 Cox proportional анализ за миР-22

Анализът на връзката между нивата на миР-22 и преживяемостта на пациентите с помощта на Коксовата регресия показва, че коефициентът (β) е 0.1447 със стандартна грешка 0.1344 и 95% доверителен интервал от -0.1643 до 0.3782. Изчисленият коефициент на риска (HR) е 1.156 с доверителен интервал от 0.8485 до 1.460, което показва леко повишен риск от събитие при увеличение на нивата на миР-22, но ефектът не е статистически значим.

AIC стойността за модела с миР-22 е 108.5, което е близко до стойността за празния модел (107.5), и предполага, че добавянето на миР-22 към модела не подобрява значително прогностичната му стойност.

10.2 Cox proportional анализ за миР-144

Анализът на връзката между нивата на миР-144 и преживяемостта на пациентите чрез Коксовата регресия показва, че коефициентът (β) е 0.4848 със стандартна грешка 0.2934 и 95% доверителен интервал от -0.1714 до 1.003. Изчисленият коефициент на риска (HR) е 1.624 с доверителен интервал от 0.8425 до 2.726, което предполага тенденция към повишен риск от събитие при увеличение на нивата на миР-144, но ефектът остава статистически незначим. AIC стойността за модела с миР-144 е 107.3, което е малко по-ниско от стойността за празния модел (107.5), и предполага, че добавянето на миР-144 може леко да подобри модела, въпреки липсата на значима прогностична стойност.

10.3 Cox proportional анализ за миР-16

Коксовата регресия за миР-16 показва коефициент (β) от 0.5192 със стандартна грешка 0.3302 и 95% доверителен интервал в границите -0.1817 до 1.126. Изчисленият коефициент на риска (HR) е 1.681, като доверителният интервал (0.8338 до 3.083) обхваща 1, което показва, че ефектът не е статистически значим. Въпреки това, AIC стойността за модела с миР-16 е 107.3, което е леко по-ниско от AIC на празния модел (107.5), което подсказва, че включването на миР-16 добавя известна прогностична информация.

10.4 Cox proportional анализ за let-7a

Анализът на връзката между нивата на let-7a и преживяемостта чрез Коксовата регресия показва коефициент (β) от 0.3197 със стандартна грешка 0.3015 и 95% доверителен интервал в границите -0.3778 до 0.8346. Изчисленият коефициент на риска (HR) е 1.377, с доверителен интервал от 0.6854 до 2.304, което предполага леко повишен риск от събитие при увеличение на нивата на let-7a, но ефектът не е статистически значим. AIC стойността за модела с let-7a е 103.8, което е малко по-високо от AIC на празния модел (102.8), което показва, че добавянето на let-7a не подобрява модела.

10.5 Cox proportional анализ за миР-451a

Анализът на връзката между нивата на миР-451a и преживяемостта на пациентите чрез Коксовата регресия показва коефициент (β) от 0.5012 със стандартна грешка 0.3308 и 95% доверителен интервал в границите -0.2075 до 1.103. Изчисленият коефициент на риска (HR) е 1.651, като доверителният интервал от 0.8126 до 3.012 включва 1, което означава, че ефектът не е статистически значим. AIC стойността за модела с миР-451a е 107.5, което е идентично с AIC за празния модел, и показва, че добавянето на миР-451a не подобрява прогностичната стойност на модела.

Резултатите от проведените анализи са обобщени на Таблица 28:

МиР	β (Коефициент)	SE	HR	95% CI за HR	AIC
-----	-------------------------	----	----	--------------	-----

МиР-22	0.1447	0.1344	1.156	0.8485 – 1.460	108.5
МиР-144	0.4848	0.2934	1.624	0.8425 – 2.726	107.3
МиР-16	0.5192	0.3302	1.681	0.8338 – 3.083	107.3
Let-7a	0.3197	0.3015	1.377	0.6854 – 2.304	103.8
МиР-451a	0.5012	0.3308	1.651	0.8126 – 3.012	107.5

Таблица 28: Резултати от Cox proportional hazards анализ на петте микроРНКи за определяне на прогностичната им стойност.

10.6 Cox proportional анализ за миР-144 и миР-16

Въз основа на получените резултати, се проведе комбиниран модел, включващ миР-144 и миР-16, с цел да се оцени тяхната съвместна прогностична стойност върху преживяемостта на пациентите с МДС (Таблица 29). Тези две микроРНКи бяха избрани на базата на индивидуалните им резултати от Коксовата регресия, които показаха тенденция към повишен риск при увеличение на нивата им (HR съответно 1.624 за миР-144 и 1.681 за миР-16). Освен това, и двете микроРНКи демонстрираха по-ниски стойности на AIC (107.3) в сравнение с празния модел, което подсказва, че те могат да добавят прогностична стойност към анализа. Комбинираният модел позволи да се изследва тяхната независимост и синергичен ефект върху преживяемостта.

Анализът на комбинирания модел с миР-144 и миР-16 показва следните резултати. Коефициентът (β) за миР-144 е 0.2795 със стандартна грешка 0.8734 и 95% доверителен интервал -1.453 до 2.034. За миР-16 коефициентът (β) е 0.2370 със стандартна грешка 0.9469 и 95% доверителен интервал -1.714 до 2.039. Изчислените коефициенти на

риска (HR) са 1.322 за миР-144 и 1.267 за миР-16, като доверителните интервали за двата параметъра включват 1 (0.2338 – 7.646 за миР-144 и 0.1802 – 7.687 за миР-16), което показва липса на статистическа значимост.

AIC стойността за модела с двете микроРНКи е 109.2, което е по-високо от AIC за празния модел (107.5), което предполага, че добавянето на тези две микроРНКи не подобрява прогнозната стойност на модела.

МиР	β (Коефициент)	Стандартна грешка	HR	95% CI за HR	AIC
МиР-144	0.2795	0.8734	1.322	0.2338 – 7.646	109.2
МиР-16	0.237	0.9469	1.267	0.1802 – 7.687	109.2

Таблица 29: Резултати от Cox proportional hazards модел за миР-144 и миР-16.

Тези резултати показват, че въпреки индивидуалния потенциал на миР-144 и миР-16, тяхното комбиниране в един модел не добавя значителна прогностична стойност към анализа.

10.7 Обобщение на анализа за прогностичната стойност на микроРНКите

Анализът на прогностичната стойност на изследваните микроРНКи беше извършен с помощта на Коксовата регресия, като всяка микроРНК беше оценена индивидуално, а след това беше създаден комбиниран модел за миР-144 и миР-16. Резултатите от индивидуалния анализ показаха, че всички изследвани микроРНКи, включително миР-22, миР-144, миР-16, let-7a и миР-451a,

демонстрират коефициенти на риска (HR) над 1, което подсказва тенденция към повишен риск от събитие при увеличение на нивата им. Въпреки това, доверителните интервали за HR обхващат 1 за всички микроРНКи, което показва липса на статистическа значимост.

Комбинираният анализ с миР-144 и миР-16 също не показва значима прогностична стойност, като AIC стойността за модела (109.2) беше по-висока от тази за празния модел (107.5), което предполага, че добавянето на тези микроРНКи не подобрява прогнозната мощност на модела. Тези резултати подчертават, че въпреки идентифицираните тенденции, индивидуалните и комбинираните модели не предоставят достатъчно доказателства за значим прогностичен ефект на изследваните микроРНКи в настоящата извадка.

Липсата на значимост в настоящия анализ може да се дължи на малкия размер на извадката, което ограничава статистическата мощност. Въпреки това, наблюдаваните тенденции при някои микроРНКи, като миР-144 и миР-16, предполагат, че те могат да имат прогностична стойност в по-голяма кохорта или в комбинация с други клинични показатели. Допълнителни изследвания с по-голяма извадка и мултивариантни модели са необходими, за да се оцени потенциалната им роля като биомаркери за прогноза при пациенти с МДС.

V. Дискусия

1. Въведение

МДС представлява хетерогенна група от клонални нарушения, които се характеризират с неефективна хемопоеза, морфологична дисплазия в костния мозък и повишен риск от прогресия в ОМЛ. Тежестта на заболяването варира значително между отделните пациенти, от форми с бавен ход до агресивни варианти с кратка преживяемост и висока риск от трансформация в ОМЛ. Тази хетерогенност подчертава нуждата от по-добро разбиране на патогенезата на заболяването и откриване на надеждни диагностични и прогностични биомаркери.

Патогенезата на МДС е сложна и включва както генетични, така и епигенетични механизми. Генетичните изменения, като хромозомни аберации и соматични мутации, са чести и водят до нарушаване на основни клетъчни процеси, включително клетъчна пролиферация, апоптоза, сплайсинг на РНК и сигналната трансдукция. В допълнение към генетичните промени, епигенетични механизми, като нарушено ДНК метилиране, хистонови модификации и дисрегулация на некодиращи РНКи, играят ключова роля в развитието на заболяването. Сред епигенетичните регулатори, микроРНКите заемат важно място в патогенезата на МДС. Тези малки некодиращи РНК молекули регулират генната експресия чрез потискане на транслацията или разграждане на целеви иРНК. Променената експресия на миРНКи е свързана с различни аспекти на МДС, включително нарушена хемопоеза, засилена клетъчна пролиферация и потисната апоптоза.

Текущото изследване се фокусира върху ролята на пет микроРНКи – miP-22, miP-144, miP-16, miP-451a и let-7a – в контекста на МДС. Чрез анализ на техните нива на експресия и корелацията им с клинични и лабораторни

характеристики на пациентите, се цели по-добро разбиране на тяхното значение като диагностични и прогностични биомаркери.

2. Анализ на нивата на експресия на микроРНКите при различни групи пациенти с МДС

2.1 МикроРНК-22

МиР-22 има ключова роля в регулирането на TET2, тумор-супресорен ген, който катализира преобразуването на 5-метилцитозин до 5-хидроксиметилцитозин, важна стъпка в процеса на ДНК деметилиране^[277]. Намалената активност на TET2, причинена от негативното му регулиране от миР-22, води до хиперметилиране на генома, нарушена диференциация на хематopoетичните стволови клетки и развитие на МДС^[170]. Смята се, че миР-22 играе важна роля в хемопоезата, като насърчава самообновяването на стволовите клетки и потиска тяхната диференциация.

Резултатите на Song и колектив показват, че високите нива на миР-22 в ХСК водят до значително намаляване на експресията на TET2 и глобалното ниво на 5-хидроксиметилцитозин, съпроводено с повишаване на 5-метилцитозин^[170]. Това води до увеличен капацитет за самообновяване и потисната диференциация на стволовите клетки, което предразполага към развитие на МДС и левкемия.

В нашето изследване не са установени статистически значими разлики в нивата на експресия на миР-22 между

пациентите с МДС и здравите контроли. Липсата на разлики е наблюдавана и при сравнение на пациентите с нисък и висок риск според R-IPSS, както и между различните подтипове на МДС. Въпреки че нивата на миР-22 не демонстрираха значими разлики при стратификацията по R-IPSS, размерът на ефекта показва умерена връзка, което предполага, че при по-голяма извадка тези разлики могат да станат значими. Също така, не се откриха съществени различия в нивата на миР-22 в зависимост от цитогенетичния риск.

Противно на нашите резултати, проучване на Ма и колектив показва, че нивата на миР-22 са значително по-високи в плазмата на пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли, като най-голямо увеличение се наблюдава при високорисковите форми на заболяването^[179]. Въпреки че в нашето изследване не е установена статистически значима разлика между ниския и високия риск, умереният ефект на анализа показва тенденция за възможна разлика в нивата на миР-22 при тези две групи. Същото проучване установява, че повишената експресия на миР-22 е свързана с напреднал стадии на МДС, особено при пациенти с ексцес на бласти.

Липсата на статистически значими разлики в нашето изследване може да се обясни с няколко фактора. Ограничената извадка и хетерогенността на изследваните групи могат да намалят статистическата мощ на анализа. Географските и етнически различия между изследваните популации също могат да играят роля. Тези различия подчертават необходимостта от провеждане на изследвания с по-големи кохорти от пациенти.

2.2 МикроРНК-144

МиР-144, заедно с миР-451а, е високо експресирана в еритроидните тъкани и играе значителна роля в хемопоезата. Според изследването на Qian и колектив, миР-144 регулира AKAP12, важен тумор-супресорен ген, който е ключов за ERK1/2 сигналния път^[278]. Потискането на AKAP12 от миР-144 води до повишена клетъчна пролиферация и намалена апоптоза, което е критично за патогенезата на МДС. Инхибирането на миР-144 активира ERK1/2 сигналния път и повишава апоптозата в клетките на МДС.

Нашето изследване установи значително по-ниски нива на миР-144 при пациенти с МДС (медиана 0.802) в сравнение със здрави контроли (медиана 1.933). Статистическият анализ показва значима разлика между двете групи ($p = 0.0003$), с изключително голям размер на ефекта ($r = -1.08$), което подчертава клиничната значимост на наблюдаваните разлики. Анализът на ROC кривата определи прагова стойност от 1.727 за разграничаване на двете групи, с висока чувствителност (92.5%) и специфичност (70%).

При разделяне на пациентите според цитогенетичния риск, нивата на миР-144 са значително по-ниски при пациентите с интермедиерен риск в сравнение с тези с добър риск ($p = 0.0287$, $r = -0.53$). Въпреки че при стратификацията по R-IPSS не се установиха статистически значими разлики, размерът на ефекта ($r = -0.51$) показва умерена тенденция към различие между пациентите с нисък и висок риск.

Анализът на подтиповете на МДС показва липса на статистически значими разлики в нивата на miP-144, но размерът на ефекта ($r = -0.319$) предполага възможност за значими разлики при по-големи извадки. Тези резултати подчертават диагностичната стойност на miP-144 и нейния потенциал като биомаркер за по-прецизно стратифициране на пациентите с МДС.

За разлика от нашите резултати, които показват по-ниски нива на miP-144 при пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли, изследването на Zuo и колектив установява, че нивата на miP-144 са повишени при пациенти с МДС^[225]. Освен това, те отбелязват, че нивата на miP-144 са по-високи при пациентите с изолирани аберации като del(7q), свързани с лоша прогноза, и по-ниски при тези с del(20q), които имат добра прогноза. Това е в противовес с нашите резултати, при които нивата на miP-144 са по-високи при пациенти с добър цитогенетичен риск. Разликите вероятно се дължат на методологични особености, например използваната технология NanoString за профилиране на микроРНК в изследването на Zuo и колектив, в сравнение с RT-qPCR в нашето изследване. Освен това, Zuo и съавтори се фокусират върху конкретни цитогенетични аберации, докато ние разглеждаме групирани цитогенетични рискове. Тези наблюдения подчертават необходимостта от допълнителни изследвания за валидиране на тези находки.

2.3 МикроРНК-16

МиР-16 е ключов регулатор на ангиогенезата в МДС чрез директно повлияване на васкуларния ендотелен растежен

фактор (VEGF)^[174]. VEGF е основен ангиогенен фактор, който играе централна роля в регулацията на хемopoетичните стволови клетки и е свързан с туморната пролиферация и ангиогенеза. Xiong и колектив установяват, че миР-16 директно взаимодейства с 3'-края на VEGF, потискайки неговата експресия^[173]. В експериментални модели, свръхекспресията на миР-16 намалява секрецията на VEGF и потиска миграцията и ангиогенезата, докато инхибирането на миР-16 има противоположен ефект. Тези данни предполагат тумор-супресивна роля на миР-16 в развитието на МДС чрез инхибиране на VEGF и модулиране на ангиогенезата. Освен това, миР-16 таргетира множество онкогени, включително BCL2 и MCL1, което подчертава нейната тумор-супресивна роля^[279]. Ниските нива на миР-16 могат да доведат до нарушен баланс между апоптозата и клетъчната пролиферация, което е основен механизъм в патогенезата на МДС.

В съответствие с тези данни, нашето изследване установи значително по-ниски нива на миР-16 при пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли. Медианата на нивата при пациентите с МДС е 0.7855, докато при здравите контроли тя е значително по-висока (1.764). Разликата е статистически значима ($p=0.0001$), което подчертава клиничната значимост на миР-16 като потенциален диагностичен биомаркер. Подобни резултати са получени и в проучванията на Zuo и съавтори, които потвърждават, че нивата на миР-16 са значително по-ниски при пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли^{[225][232]}. ROC анализът показва висока диагностична стойност на миР-16, с прагова стойност от 1.508, осигуряваща висока специфичност (80%) и чувствителност (82.5%).

При сравнение на нивата на миР-16 между различните подтипове на МДС, както и между пациентите с нисък и висок риск според R-IPSS, не са установени статистически значими разлики ($p > 0.05$). Размерът на ефекта при анализа на групите според R-IPSS е голям, което предполага, че при по-голяма извадка би могло да се установи значима разлика в нивата на миР-16 между пациентите с нисък и висок риск. Въпреки че в нашето изследване не се открива такава, Xiong и колектив установяват, че нивата на миР-16 са значително по-ниски при пациенти с висок риск МДС в сравнение с тези с нисък риск^[173]. Следва да се отбележи, че техният анализ е извършен върху CD34+ стволови клетки от костен мозък, като се наблюдава обратна зависимост между нивата на миР-16 и VEGF. По-ниските нива на миР-16 са свързани с повишена секреция на VEGF и засилена ангиогенеза, което подчертава значимостта на миР-16 в регулацията на ангиогенезата при високорисковите форми на МДС.

При анализа на цитогенетичния риск не се установяват статистически значими разлики в нивата на миР-16 между групите с добър и интермедиерен риск.

2.4 Let-7a

Let-7a е ключов регулатор в хомеостазата на ХСК чрез взаимодействие със сигналните пътища TGF- β и Wnt^[88]. Чрез потискане на рецепторите TGFBR1 и TGFBR2 и транскрипционните фактори SMAD2 и SMAD4, let-7a регулира негативно сигналния път на TGF- β , който е отговорен за инхибиране на пролиферацията и активиране на апоптозата. В същото време, чрез намаляване на нивата на APC, let-7a активира Wnt сигналния път,

стимулирайки пролиферацията и самовъзобновяването на ХСК, като предотвратява тяхната апоптоза^[88].

Дисрегулацията на let-7a, наблюдавана в контекста на МДС, може да наруши този баланс, което да доведе до нарушена хемопоеза и прогресия на заболяването. Потискането на TGF- β и аберантната активация на Wnt сигналния път чрез нарушена регулация на let-7a могат да допринесат за резистентност към апоптоза и нарушена диференциация, които са характерни за МДС.

Let-7a демонстрира значително по-ниски нива при пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли. Медианата на нивата при пациентите е 0.692, докато при здравите контроли е 1.669 ($p=0.0002$). Аналогични резултати са получени и в изследването на Zuo и колектив, където също се установява, че нивата на let-7a са значително по-ниски при пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли ($p < 0.001$). ROC анализът потвърди висока дискриминативна стойност на let-7a, с AUC 0.8615 ($p=0.0005$). Оптималният праг, определен на 0.9775, осигурява чувствителност от 71.79% и специфичност от 90.0%, което подчертава потенциала на let-7a като диагностичен биомаркер.

Сравнението на нивата на let-7a между подтиповете на МДС и групите според R-IPSS показва статистически значими разлики. Пациентите с мултилинейна дисплазия, ринг сидеробласти и del(5q) демонстрират значително по-ниски нива на let-7a в сравнение с тези с ексцес на бласти ($p=0.0250$). Подобно на тези резултати, пациентите с нисък риск според R-IPSS показват значително по-ниски нива на let-7a в сравнение с тези с висок риск ($p=0.0172$).

За разлика от нашите резултати, Vasilatou и колектив установяват, че нивата на let-7a са по-ниски в CD34+ стволови клетки от костен мозък на пациенти с интермедиерен и висок риск според IPSS, докато при пациенти с нисък риск нивата са по-високи^[280]. Те откриват и силна отрицателна корелация между експресията на let-7a и нивата на RAS протеините в CD34+ клетки. Намалените нива на let-7a се свързват с повишена експресия на RAS протеини, които активират онкогенни сигнални пътища и допринасят за прогресията на МДС и трансформацията към ОМЛ. Тези разлики, в получените резултати, могат да се обяснят с различния материал, използван за анализа – плазма в нашето изследване и стволови клетки от костен мозък в анализа на Vasilatou. Клетъчни селекционни механизми за освобождаване на микроРНКи могат да доведат до значителни разлики между екстрацелуларните и интрацелуларните нива на миР. Както е показано в проучването на Pigati и колектив, клетките избирателно секретират определени микроРНКи в екзосоми или по други механизми, което може да не отразява тяхното вътреклетъчно ниво^[281]. Това означава, че в контекста на МДС, може да се наблюдава дисрегулация в нивата на let-7a в ХСК, поради директни патогенетични механизми, като мутации или абнормна сигнализация. В плазмата обаче тези нива могат да бъдат отражение на системната реакция към заболяването, включително на повишена секреция на микроРНКи от засегнатите клетки¹.

При анализа на цитогенетичния риск не са установени статистически значими разлики в нивата на let-7a между групите с добър и интермедиерен риск ($p=0.8759$). Тези резултати показват минимална клинична значимост на

let-7a в разграничаването на цитогенетичните рискови групи. За разлика от това, в анализа на Vasilatou и колектив се наблюдава значително по-ниска експресия на let-7a в CD34+ стволови клетки от костен мозък при пациенти с интермедиерен и висок цитогенетичен риск в сравнение с тези с нисък риск ($p = 0.035$)^[280].

2.5 МикроРНК-451a

МиР-451a е ключов регулатор в еритропоезата, чиято експресия се контролира от транскрипционния фактор GATA-1^[99]. Тя е част от миР-144/451 локуса и е силно експресирана в еритроидната линия, играейки съществена роля в съзряването и оцеляването на еритроидните прекурсори. МиР-451a взаимодейства с множество таргетни иРНК, като потиска тяхната експресия и улеснява късните етапи на еритропоезата^[112]. Експериментални модели демонстрират, че дефицитът на миР-451a води до тежки нарушения в еритроидното съзряване, което подчертава критичната ѝ роля за нормалната хемопоеза^[99]. В контекста на МДС, нарушенията в еритропоезата са основен патогенетичен механизъм, водещ до анемия и свързаните с нея клинични прояви. Дисрегулацията на миР-451a може да допринесе за неефективната еритропоеза, характерна за МДС, чрез нарушаване на механизмите на съзряване и оцеляване на еритроидните клетки.

В съответствие с тези данни, миР-451a демонстрира значително по-ниски нива при пациенти с МДС (медиана 0.8215) в сравнение със здрави контроли (медиана 2.132). Разликата е статистически значима ($p < 0.0001$), което подчертава диагностичния потенциал на миР-451a. ROC

анализът показва висока дискриминативна стойност на миР-451а, с AUC 0.9175 ($p < 0.0001$). Оптималният праг от 1.161 осигурява чувствителност от 70.0% и специфичност от 100.0%, което е от съществено значение за минимизиране на фалшивите позитивни резултати.

При сравнение на подтиповете на МДС (мултилинейна дисплазия, ринг сидеробласти и del(5q) спрямо пациенти с ексцес на бласти), нивата на миР-451а не показват статистически значими разлики ($p > 0.05$). Въпреки това, при анализ на групите според R-IPSS, пациентите с нисък риск демонстрират значително по-ниски нива на миР-451а в сравнение с тези с висок риск ($p = 0.0449$), което подчертава клиничната значимост на миР-451а в стратификацията на риска.

Сравнението на нивата на миР-451а между групите с добър и интермедиерен цитогенетичен риск показва, че пациентите с интермедиерен риск имат значително по-ниски нива на миР-451а в сравнение с тези с добър риск ($p = 0.0481$). Тези резултати подчертават потенциалната роля на миР-451а като маркер за разграничаване на цитогенетичните рискови групи.

Подобно на нашите резултати, Merkerova и колектив също установяват по-ниски нива на миР-451а при пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли^[233]. В тяхното изследване обаче се наблюдават, по-ниски нива на миР-451а при висок риск според IPSS в сравнение с тези с нисък риск. Тази разлика може да се дължи както на използването на различни рискови скали – IPSS в тяхното изследване и R-IPSS в нашето – така и в ограничения брой участници. От друга страна, Zuo и колектив докладват

противоположни данни – по-високи нива на миР-451а при пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли^[225]. Причините за това несъответствие могат да включват разлики в използваните аналитични технологии, географските и демографските характеристики на изследваните популации.

По отношение на цитогенетичния риск, Zuo и съавтори установяват, че пациентите с изолирана аномалия del(7q)-7 (лош цитогенетичен риск) демонстрират по-високи нива на миР-451а, докато тези с изолирана аномалия del(20q) (добър цитогенетичен риск) имат по-ниски нива^[225]. За разлика от това, в нашето изследване пациентите с добър цитогенетичен риск показват по-високи нива на миР-451а в сравнение с тези с интермедиерен риск. Тези различия вероятно произтичат от разликите в анализираниите групи – в нашето проучване не са включени пациенти с лош цитогенетичен риск поради малкия им брой, докато Zuo и колектив се фокусират върху специфични цитогенетични аномалии.

Независимо от наблюдаваните различия, всички проучвания подчертават значението на миР-451а като диагностичен маркер при МДС. Това допълнително обосновава необходимостта от бъдещи изследвания върху по-големи кохорти от пациенти, за да се валидират тези находки и да се разкрие пълният потенциал на миР-451а в клиничната практика.

3. Корелации между микроРНКите и клинични параметри

Настоящото изследване анализира и корелационните връзки между петте микроРНКи (миР-22, миР-144, миР-16, let-7a и миР-451a) и тяхната връзка с хематологични и биохимични показатели при пациенти с МДС. Резултатите показват статистически значима положителна корелация между всички изследвани микроРНКи. Най-силните корелации са установени между миР-16 и миР-451a и между миР-16 и миР-144. Установени са също силни връзки между миР-144 и миР-451a и между миР-22 и миР-144 . Тези резултати подчертават потенциалната функционална свързаност между микроРНКите в рамките на ключови биологични процеси.

Силните корелации между миР-16, миР-144 и миР-451a вероятно се дължат на тяхната ключова роля в еритропоезата. МиР-16 участва в регулацията на рибозомната биогенеза и пролиферацията на еритроидните прекурсори^[282]. МиР-144, от друга страна, регулира оксидативния стрес, като влияе върху диференциацията на еритроидните клетки^[283]. МиР-451a е важен регулатор на GATA1 – ключов транскрипционен фактор за еритроидната диференциация, което допълнително подчертава общите механизми, в които тези микроРНКи участват^[99]. Функционалната им свързаност в контекста на еритропоезата вероятно допринася за установените силни корелации.

В допълнение, миР-144 и миР-451a споделят общ локус на дългото рамо на 17та хромозома (17q11.2), който е от съществено значение за регулирането на еритроидната

хомеостаза и терминалната еритропоеза^[283]. Съвместното действие на двете микроРНК осигурява стабилност и ефективност на процеса на еритропоеза, особено при условия на стрес. Установената силна корелация между миР-144 и миР-451а може да бъде обяснена със споделения им регулаторен механизъм и синергичното им действие върху гени, свързани с терминалната диференциация на еритроидни клетки. Липсата на тези микроРНК води до еритроидна хиперплазия и неефективна еритропоеза.

Силната корелация между миР-22 и миР-144 може да се обясни с тяхната споделена роля в регулацията на PTEN/PI3K/AKT сигналния път. PTEN е добре известен туморен супресор, който регулира PI3K/AKT сигналния път чрез дефосфориране на PIP3 до PIP2^[284]. Това води до инхибиране на активността на AKT, което ограничава клетъчната пролиферация и стимулира апоптозата. Нарушената функция на PTEN е свързана с различни миелоидни неоплазии, включително МДС и ОМЛ^[285]. МиР-22 и миР-144 са идентифицирани като регулатори на PTEN, които го подтискат чрез директно свързване към неговия 3'-край^{[156][286]}. Това намалява експресията на PTEN и води до повишена активност на AKT. МиР-22 образува регулаторна верига в сигналния път PTEN/AKT, която регулира активността на FoxO транскрипционните фактори, които са ключови за клетъчния цикъл и апоптозата^[156]. В същото време, е установено, че миР-144 директно инхибира PTEN, увеличавайки пролиферацията, миграцията и инвазията на туморни клетки чрез активиране на PI3K/AKT пътя^[286]. И двете микроРНК потискат експресията на PTEN, което води до повишена активност на AKT и стимулира клетъчния растеж и

пролиферация. Това взаимодействие е от критично значение за клетъчната хомеостаза и е свързано с развитието на миелоидните неоплазии.

Резултатите, от корелационния анализ между избраните микроРНКи, подчертават сложната мрежа от взаимодействия между тях, като отразяват тяхната споделена функционална роля в ключови биологични процеси. Бъдещи изследвания могат да потвърдят тези механизми и да разширят възможностите за тяхното клинично приложение.

Проведен е и корелационен анализ между избраните пет микроРНКи и специфични лабораторни показатели (хемоглобин, ретикулоцити, левкоцити, неутрофили, тромбоцити, ЛДХ, феритин, бета-2-микроглобулин и еритропоетин). Избраните показатели – представляват ключови маркери, отразяващи различни аспекти на хематологичния и метаболитния статус на пациентите с МДС. Включването на тези маркери в корелационния анализ с микроРНКите има за цел да изследва възможните връзки между нивата на микроРНКите и клиничните прояви на заболяването.

Резултатите показват липса на значими корелации между нивата на микроРНКите и лабораторните показатели в периферната кръв. Това съответства на данните от съществуващите проучвания. Например, Zhuo и колектив изследват нивата на miR-16 и let-7a в плазмата на пациенти с МДС и откриват, че техните нива не корелират значимо с параметри като хемоглобин, левкоцити и тромбоцити^[232].

Подобно на тези резултати, Merkerova и колектив установяват, че нивата на миР-451а, миР-144 и миР-16 се различават при пациенти с МДС и здрави контроли, но липсват ясни връзки между тези микроРНКи и специфични лабораторни показатели^[233]. Подобно на нашите резултати, Ма и колектив също установяват, че миР-22, макар и свързана с високорисковите форми на МДС, не показва пряка зависимост с рутинните лабораторни показатели в периферната кръв^[179]. Тези наблюдения предполагат, че плазмените микроРНКи може да отразяват системни или патогенетични процеси, които не се проявяват директно в лабораторните параметри на периферната кръв.

Сходствата между настоящите резултати и данните от литературата подчертават, че плазмените микроРНКи могат да имат потенциал като системни биомаркери за МДС. Въпреки това, тяхната липса на пряка корелация с лабораторните показатели в периферната кръв подчертава необходимостта от допълнителни функционални проучвания за разбиране на техния механизъм на действие.

Въпреки липсата на значими корелации между изследваните микроРНКи и стандартните лабораторни показатели в периферната кръв, нашето изследване разширява анализа, като включва параметри, свързани с активността на заболяването, еритроидния и желязния метаболизъм. Тази по-детайлна оценка разкри значими корелации между определени микроРНКи и ключови биохимични показатели.

Лактатдехидрогеназата (ЛДХ) е индикатор за клетъчния метаболизъм и тъканната увреда, която често е повишена при пациенти с МДС. В нашето изследване установяваме умерена корелация между нивата на ЛДХ и миР-22, миР-144 и let-7a.

МиР-22 играе ключова роля в регулирането на апоптозата чрез взаимодействието си с р53 сигналния път^[153]. Както се описва в статията на Tsuchiya и колектив, миР-22 е пряк таргет на р53 и модулира клетъчната съдба, като потиска експресията на р21 – ключов инхибитор на апоптозата. Това усилва р53-зависимата апоптоза, като насочва клетките към програмирана клетъчна смърт. Този механизъм е от значение в контекста на МДС, където клетъчната апоптоза и разрушаването на хемopoетичните клетки води до повишено освобождаване на ЛДХ в плазмата. Следователно, умерената положителна корелация между миР-22 и ЛДХ може да отразява тази връзка.

Установената корелация между let-7a, миР-144 и ЛДХ в настоящото изследване може да се обясни с тяхната роля в регулирането на гликолизата чрез GLUT транспортерите. Let-7a потиска експресията на GLUT12, което води до намаляване на глюкозния транспорт, продукцията на лактат и активността на гликолизата^[287]. МиР-144 модулира гликолизата чрез потискане на експресията на GLUT1, основен транспортер на глюкоза^[288]. При ракови клетки това води до намалено усвояване на глюкоза и лактатна продукция.

Феритинът е основен маркер за натоварването с желязо в организма и играе важна роля в патогенезата на МДС.

Повишените нива на феритин често се свързват с трансфузионна зависимост, неефективна еритропоеза и повишено натрупване на желязо в тъканите. Проучванията подчертават, че нивата на феритин над 1000 ng/mL са независим прогностичен фактор за по-ниска обща преживяемост при пациенти с МДС, независимо на броя трансфузии^[289]. Освен това, желязното натоварване влошава костно-мозъчната функция, като повишава оксидативния стрес и геномната нестабилност. Тези ефекти са особено вредни за еритроидните прекурсори, които са уязвими на увреждане от реактивни кислородни радикали (ROS)^[290]. В допълнение, желязното натоварване може да наруши микросредата на костния мозък и да потисне хемопоезата, което да доведе до неефективна еритропоеза и задълбочаване на анемията.

В настоящото изследване са установени умерени положителни корелации между нивата на феритин и три от изследваните микроРНК: миР-144, миР-16 и миР-451а. МиР-16, миР-144 и миР-451а имат доказана роля в регулирането на еритроидната диференциация, като влияят върху узряването и функционалността на еритроидните прекурсори. Тази обща връзка с еритропоезата може да обясни корелацията им с феритина, който е пряко свързан със състоянието на желязния метаболизъм и еритропоезата при МДС. Корелациите между феритина и микроРНКите подчертават тяхната потенциална роля като молекулярни маркери за оценка на натоварването с желязо и свързаните с него увреждания. Ролята на феритина като маркер за натоварването с желязо и неговата връзка с микроРНКите предоставят ценна информация за разбирането на молекулярните механизми при МДС.

В нашето изследване е установена умерена положителна корелация между миР-22 и нивата на еритропоетин. Тази връзка може да бъде обяснена с ролята на миР-22 като модулатор на сигналните пътища, стимулирани от еритропоетин, които подпомагат узряването и диференциацията на еритроидните клетки^[219]. МиР-22 е идентифицирана като ключов регулатор в съзряването на еритроидните клетки. Проучване върху еритроидни култури от CD34+ клетки, извлечени от човешка пъпна връв, показва, че нивата на миР-22 са силно свързани с появата на еритроидни повърхностни антигени (като CD71 и CD235a) и синтеза на хемоглобин. МиР-22 вероятно играе критична роля в прехода от ранни еритроидни прекурсори към напълно диференцирани еритроцити, като регулира посттранскрипционно ключови гени, свързани с еритропоезата. Нейното увеличение по време на еритроидната диференциация подсказва, че миР-22 може да участва в подобряване на отговора на клетките към еритропоетинова стимулация. Повишените нива на миР-22 може също да отразяват активирането на еритропоезата в отговор на високи нива на еритропоетин при пациенти с анемия, характерна за МДС.

За по-дълбоко разбиране на връзките между микроРНКите и лабораторните показатели, е проведен допълнителен анализ чрез еднофакторна линейна регресия. Целта на този анализ е да се оцени дали е възможно да се изгради надежден модел за предсказване на лабораторните показатели, като ЛДХ, феритин и еритропоетин, въз основа на нивата на изследваните микроРНКи. Въпреки статистически значимите корелации, резултатите от регресионния анализ показват, че такива модели не могат да бъдат надеждно изградени. Това вероятно се дължи на

индиректното действие на микроРНКите, които функционират като посттранскрипционни регулатори на генната експресия. Тяхното въздействие върху лабораторните показатели може да бъде модулирано от множество допълнителни фактори, като възпалителни процеси, оксидативен стрес или сложни клетъчни взаимодействия, които не са включени в настоящия анализ. Освен това, специфичната биология на тези показатели, като например тяхната чувствителност към различни системни влияния, допълнително усложнява възможността за директно прогнозиране чрез микроРНКите. Резултатите от регресионния анализ подчертават, че докато микроРНКите могат да бъдат ценни биомаркери за оценка на биологични процеси при МДС, тяхната способност за директна интерпретация на лабораторни показатели е ограничена. Това подчертава необходимостта от бъдещи изследвания, които да използват по-комплексни модели и да включват допълнителни молекулярни и клинични маркери, за да се разберат по-добре тези взаимоотношения и тяхната клинична значимост.

За оценка на връзката между нивата на микроРНКи и процента бласти в костния мозък е проведен корелационен анализ, който разкрива статистически значима, умерена положителна корелация между нивата на let-7a и процента бласти. За останалите изследвани микроРНКи (миР-22, миР-144, миР-16 и миР-451a) не са наблюдавани значими връзки.

Резултатите за let-7a са в съответствие с публикуваните данни, които показват, че нивата на let-7a са свързани с патологични характеристики на МДС. В изследване на Zuo

и колектив е показано, че let-7a, наред с други микроРНКи, е с понижена експресия при пациенти с висок риск МДС и повишен процент на бласти^[232]. За разлика от let-7a, останалите микроРНКи в нашето изследване не показват значима връзка с процента на бласти. Това е в съответствие с данните от проучвания, като това на Merkerova и колектив, които също не установяват значими корелации между други изследвани микроРНКи (вкл. miR-16, miR-144, miR-451a) и процента бласти^[233].

Установената връзка между let-7a и процента бласти в костния мозък подчертава потенциалната роля на тази микроРНК като биомаркер за оценка на прогресията на заболяването при МДС. Въпреки това, простата линейна регресия показва ограничена предсказваща стойност на модела, което подчертава необходимостта от по-задълбочени изследвания.

4. Предиктивната стойност на микроРНКите при МДС

4.1 Диагностичен потенциал на микроРНКите

В настоящото изследване е проведен задълбочен анализ на предиктивната диагностична стойност на петте микроРНКи при разграничаването на пациенти с МДС от здрави контроли. Изследването се основава на еднофакторен и многофакторен логистичен регресионен анализ, както и на LASSO регресионен метод, с цел да се идентифицират най-силните биомаркери и да се оцени тяхната комбинирана ефективност.

Първоначалните резултати от еднофакторния логистичен регресионен анализ показват, че и четирите микроРНКи с

установени различия между групите – миР-16, миР-144, миР-451а и let-7а – са статистически значими предиктори. Най-висока предиктивна стойност е демонстрирана от миР-451а, която обяснява 42% от вариацията в модела ($\text{Pseudo-R}^2 = 0.4193$) и показва изключителна дискриминационна способност. МиР-16 и миР-144 също показват умерена предиктивна стойност (Pseudo-R^2 съответно 0.2428 и 0.2552), докато let-7а има най-ниска стойност сред четирите изследвани микроРНКи ($\text{Pseudo-R}^2 = 0.2048$).

След провеждането на еднофакторния логистичен регресионен анализ за оценка на диагностичната стойност на отделните микроРНКи, е извършен LASSO анализ, за да се идентифицират най-силните предиктори и да се оцени как те взаимодействат помежду си в рамките на модела. LASSO анализът позволява да се справим с мултиколинеарността, често срещана при високо корелирани микроРНКи, като същевременно елиминира по-слабо значимите променливи. Това осигурява по-прецизен, интерпретируем и стабилен диагностичен модел, който отчита комплексните взаимоотношения между различните микроРНКи. LASSO анализа, идентифицира миР-22 и миР-451а като най-значимите биомаркери. Тези две микроРНКи са включени в опростен модел, който демонстрира отлична дискриминационна способност ($\text{AUC} = 0.994$) и висока точност (95.92%). Тези резултати потвърждават ключовата роля на миР-22 и миР-451а като надеждни предиктори за разграничаване на пациентите с МДС от здрави контроли.

Допълнително, многофакторен логистичен анализ, базиран на миР-22 и миР-451а, потвърждава техния

съвместен предиктивен ефект, с минимална мултиколинеарност ($VIF \approx 1.18$) и значително подобрени показатели за представяне на модела ($AUC = 0.995$, $AIC = 13.73$). Тези резултати демонстрират, че комбинираната употреба на тези две микроРНК може да предложи надеждно средство за диагностика на МДС, като същевременно осигурява стабилност и точност на модела.

Въпреки че миР-22 не показва статистически значими различия в нивата между пациентите с МДС и здравите контроли, тя е включена в LASSO анализа поради потенциалния ѝ принос за подобряване на диагностичния модел. Това решение е обосновано от принципите на LASSO регресията, която цели да идентифицира най-значимите предиктори чрез минимизиране на сложността на модела и елиминиране на променливи с незначителен принос.

миР-22 е свързана с регулацията на епигенетични механизми и хематопоезичната диференциация, като повишените ѝ нива се свързват с прогресията на заболяването и висок риск МДС. Това предполага, че дори без значителни разлики в нивата ѝ между пациентите и здравите контроли, миР-22 може да взаимодейства синергично с други микроРНК (като миР-451а), за да допринесе за по-добра дискриминационна способност на модела.

LASSO анализът позволява да се отчете този комплексен принос, като взема предвид не само индивидуалния ефект на всяка микроРНК, но и нейната роля в контекста на други предиктори. Включването на миР-22 в модела води до намаляване на AIC стойността и увеличаване на

точността, което показва, че тя подобрява цялостното представяне на модела. Това вероятно се дължи на нейния капацитет да допълва информацията, предоставяна от други микроРНКи, като миР-451а, и да улавя допълнителни аспекти на патофизиологията на МДС, които не се отразяват напълно от други маркери.

Следователно, резултатите от LASSO анализа демонстрират, че миР-22, въпреки първоначалната ѝ липса на диагностична стойност, играе значима роля в подобряването на модела, като подчертава важността на комбинирания подход при анализа на биомаркери. Това подчертава потенциала на интегративните методи като LASSO да идентифицират скрити взаимовръзки, които иначе биха останали незабелязани.

Настоящите резултати подчертават значимостта на избраните микроРНКи като потенциални диагностични биомаркери за МДС, като миР-451а изпъква като водещ маркер, а миР-22 допълнително подсилва диагностичната стойност на модела.

В допълнение към диагностичния анализ, в настоящото изследване е оценена и предиктивната стойност на избраните микроРНКи спрямо риска според R-IPSS и подтиповете на МДС. За тази цел отново е приложен LASSO анализ, който идентифицира *let-7a* като най-силен предиктор за стратификацията на риска и разграничаването на подтиповете. Тази микроРНК показва значима връзка с принадлежността към високорисковата група според R-IPSS, както и с групата на пациентите с висок процент бласти.

Резултатите от еднофакторния логистичен регресионен анализ допълнително потвърждават значението на let-7a. Той показва, че повишените нива на let-7a са свързани с увеличени шансове за принадлежност към високорисковата група. Въпреки че дискриминационната способност на модела ($AUC \approx 0.71-0.74$) остава умерена, тези резултати подчертават потенциала на let-7a като биомаркер за рискова стратификация.

При разграничаването на подтипове на МДС, LASSO анализът отново идентифицира let-7a като единствен значим предиктор. По-високите нива на let-7a са свързани с принадлежност към подтиповете с висок процент бласти. Еднофакторният логистичен анализ потвърждава тези резултати, като моделът показва добра дискриминационна способност с $AUC = 0.7219$.

Доколкото ни е известно, в публикуваната до момента литература липсват проучвания, които да използват директно еднофакторен и многофакторен логистичен регресионен анализ за оценка на диагностичната стойност на подбраните микроРНК при пациенти с МДС. Макар че предишни изследвания, като тези на Zuo и колектив^[232] и Merkerova и колектив^[233], използват ROC анализи за оценка на дискриминационната способност на микроРНКите, нашият подход се отличава с интегрирането на логистична регресия за изчисляване на коефициенти на регресия (β), съотношението на шансовете (Odds Ratio (OR)) и коефициента на детерминация (Pseudo- R^2). Това позволява не само да се оцени диагностичната точност, но и да се определи относителният принос на всяка микроРНК към модела.

Нашите резултати подчертават предимствата на този подход, като идентифицират miP-22 и miP-451a като ключови биомаркери с висока дискриминационна способност и стабилност на модела. Това предполага, че използването на логистична регресия може да предложи по-задълбочено разбиране на ролята на микроРНКите в диагностиката на МДС, което да допълни съществуващите данни. Настоящото изследване подчертава потенциала на miP-22 и miP-451a като неинвазивни биомаркери за диагностика на МДС. Тъй като тези микроРНКи са изследвани в плазмени проби, това предлага алтернатива на инвазивните диагностични процедури като костно-мозъчна биопсия и аспирация, които понастоящем са необходими за поставяне на диагнозата. Въпреки това, микроРНКите не могат да заменят съществуващите алгоритми за диагностика, но могат значително да ги подпомогнат, особено в случаите, когато морфологичните характеристики на костния мозък са дискретни или неубедителни. В тези случаи наличието на допълнителни диагностични инструменти като молекулярно-генетични и цитогенетични изследвания, в комбинация с микроРНКи, може да играе ключова роля за потвърждаване на диагнозата.

Ограниченията на настоящото изследване включват сравнително малкия размер на изследваната кохорта и липсата на външна валидация на резултатите в независими групи от пациенти. Бъдещи изследвания с по-големи популации и дългосрочно проследяване ще бъдат необходими, за да се потвърди приложимостта на тези микроРНКи в клиничната практика.

4.2 Прогностична стойност спрямо преживяемостта

В настоящото проучване е проведен и анализ, който има за цел да оцени прогностичната стойност на петте микроРНК спрямо преживяемостта на пациентите с МДС чрез Cox proportional hazards анализ. Резултатите показват, че всички изследвани микроРНК демонстрират коефициенти на риска (HR) над 1, което предполага тенденция към повишен риск от събитие при увеличение на нивата им. Въпреки това, доверителните интервали на HR обхващат 1 за всички микроРНК, което показва липса на статистическа значимост. Сред изследваните микроРНК най-ниска стойност на AIC беше отчетена за модела с let-7a (AIC = 103.8), което може да предполага известен потенциал за тази микроРНК като прогностичен маркер.

След еднофакторния анализ е проведен и комбиниран модел за miP-144 и miP-16 с цел да се оцени тяхната съвместна прогностична стойност върху преживяемостта на пациентите с МДС. Тези две микроРНК са избрани въз основа на индивидуалните резултати от Cox proportional hazards анализа, които показват тенденция към повишен риск от събитие при увеличение на нивата им ($HR > 1$). Освен това, и двете микроРНК демонстрират по-ниски стойности на AIC в сравнение с празния модел, което подсказва, че те могат да добавят прогностична стойност. Чрез комбиниране на тези две микроРНК, анализът има за цел да изследва тяхната независимост и потенциален синергичен ефект върху прогностичния модел. Въпреки че и двете микроРНК демонстрират тенденция към повишен

риск в индивидуалния анализ, техният комбиниран ефект не е статистически значим.

Въпреки тези ограничения, наблюдаваните тенденции при miP-144, miP-16 и let-7a подсказват, че тези микроРНКи могат да имат прогностична стойност в по-големи кохорти или когато се използват в комбинация с други клинични и молекулярни показатели. Допълнителни изследвания с по-големи размери на извадката и мултивариантни модели са необходими, за да се потвърди потенциалната роля на тези микроРНКи като биомаркери за прогноза при пациенти с МДС. Наблюдаваните тенденции за повишен риск при miP-144, miP-16 и let-7a са в съответствие с литературните данни, които подчертават потенциалната им роля в прогнозата на МДС.

Проучване на Ma и колектив, анализира проби от 45 пациента с МДС, разделени в групи с нисък и висок риск според R-IPSS, както и 20 здрави контроли. Kaplan-Meier анализ разкрива, че повишените нива на miP-22 са свързани с по-ниска обща преживяемост^[179]. Авторите обясняват тези резултати с ролята на miP-22 в инхибирането на TET2, което води до хиперметилация и нарушена диференциация на хематопоеичните клетки. Нашите резултати също показват тенденция към повишен риск при високи нива на miP-22, което е в съответствие с докладваните наблюдения.

Zuo и колектив изследват плазмени нива на miP-16 и let-7a при 50 пациента с МДС и 76 здрави контроли^[232]. Те установяват, че по-ниските нива на двете микроРНКи са свързани с по-ниска обща преживяемост и преживяемост без прогресия ($p < 0.001$). В друго проучване, включващо 72 пациента с нормална цитогенетика, по-високите нива на

let-7a и miP-16, като част от прогностичен комбиниран модел със седем miPНКи, предсказват по-лоша преживяемост^[225]. Разликите в резултатите вероятно се дължат на различия в изследваните популации и използваните подходи. В нашето изследване се наблюдава тенденция към повишен риск при високи нива на let-7a и miP-16, което съответства на резултатите от Zuo и колектив^[225].

MiP-144 и miP-451a също са включени в комбинирания модел в изследването на Zuo и колектив^[225]. Специално за miP-451a, многофакторният анализ показва, че ниските ѝ нива са независим предиктор за по-кратка преживяемост без прогресия (HR = 0.072, p = 0.006). Това е в съответствие с резултатите на Merkerova и колектив, които също идентифицират miP-451a като прогностичен маркер^[233]. В тяхното изследване ниските нива на miP-451a в плазмата са свързани с неблагоприятна прогноза, като Kaplan-Meier анализ показва значимо по-кратка преживяемост без прогресия, при пациенти с ниски нива на miP-451a. За miP-144, в изследването на Zuo и колектив, е установено, че по-високите нива на miR-144 са свързани с по-лоша обща преживяемост^[225]. В нашето проучване също се наблюдава тенденция за повишен риск при високи нива на miP-144 и miP-451a, но без статистическа значимост.

Резултатите от нашето изследване показват тенденции към повишен риск от събитие при увеличени нива на изследваните микроPНКи, въпреки че липсва статистическа значимост. Данните от литературата допълват нашите наблюдения, като подчертават потенциала на miP-22, miP-144, miP-16, let-7a и miP-451a

като прогностични биомаркери при МДС. В бъдеще са необходими изследвания с по-големи кохорти, които да потвърдят тези находки и да изяснят ролята на микроРНКите като прогностични биомаркери при МДС.

5. Заключение

Като обобщение, настоящото изследване разширява познанията за ролята на микроРНКите като диагностични и прогностични биомаркери при миелодиспластичен синдром (МДС). Чрез задълбочен анализ на пет микроРНКи – миР-22, миР-144, миР-16, let-7a и миР-451a – са установени значими различия в нивата им между пациенти с МДС и здрави контроли, което подчертава техния диагностичен потенциал. Сред изследваните микроРНКи миР-451a демонстрира най-висока дискриминационна способност, като и останалите микроРНКи показват значими връзки с клиничните характеристики на заболяването.

Освен диагностичния потенциал, анализите разкриват и специфични корелации между микроРНКите и лабораторните показатели, както и техните взаимовръзки с биологични процеси, свързани с патогенезата на МДС. Липсата на значими корелации с някои клинични параметри обаче подсказва, че тези молекули играят по-скоро индиректна роля в патофизиологията на заболяването. Въпреки че прогностичната стойност на микроРНКите не беше категорично установена, наблюдаваните тенденции предполагат възможен потенциал за тяхното използване в прогностични модели.

Резултатите от изследването показват, че микроРНКите могат да бъдат използвани като неинвазивни молекулярни биомаркери, които допълват традиционните диагностични методи и подпомагат стратификацията на риска при пациенти с МДС. Използването на мултивариабилни подходи като LASSO анализа позволи идентифицирането на miP-22 и miP-451a като ключови елементи в диагностичния модел с висока точност и стабилност. Ограниченията на настоящото изследване, свързани с размера на извадката и липсата на външна валидация, подчертават необходимостта от бъдещи проучвания върху по-големи кохорти, които да потвърдят тези находки и да разкрият пълния потенциал на микроРНКите в клиничната практика.

Заклученията от настоящото изследване затвърждават значимостта на микроРНКите като биомаркери за МДС, като предлагат нови възможности за подобряване на диагностиката, прогностиката и индивидуализирането на терапевтичните стратегии при това хетерогенно заболяване.

Изводи:

1. Пациентите с МДС имат значително по-ниски нива на miP-451a, miP-144, miP-16 и let-7a в сравнение със здрави контроли.
2. Повишените нива на let-7a са свързани с по-висок процент на бласти в костния мозък и по-висок риск според R-IPSS.
3. По-ниските нива на miP-144 и miP-451a са свързани с интермедиерен цитогенетичен риск при пациенти с МДС.

4. Нивата на miP-22, miP-144 и let-7a демонстрират умерена положителна корелация с ЛДХ, отразявайки тяхната роля в клетъчния метаболизъм и апоптозата.
5. Високите нива на miP-144, miP-16 и miP-451a корелират с повишените нива на феритин, което предполага тяхната връзка с желязния метаболизъм.
6. MiP-22 и miP-451a са идентифицирани като най-силни биомаркери в диагностичен модел.

VI. Приноси:

1. За първи път в България е проведено изследване на плазмени микроРНК (миР-16, миР-144, миР-22, миР-451а и let-7a) при пациенти с миелодиспластичен синдром (МДС), което допълва традиционните диагностични методи и дава възможност за нови перспективи в оценката на заболяването.
2. За първи път е анализирана връзката между нивата на специфични микроРНК (миР-16, миР-144, миР-451а и др.) и ключови биохимични показатели (феритин, еритропоетин, ЛДХ), отразяващи еритропоезата и желязния метаболизъм при МДС. Тези корелации подчертават потенциала на микроРНКите да дадат допълнителна информация за патологичните процеси в костния мозък.
3. За първи път е приложен интегриран статистически подход (еднофакторна и многофакторна логистична регресия, LASSO анализ, ROC анализ), който позволява да се оцени както индивидуалната, така и комбинираната предиктивна стойност на изследваните микроРНК за диагнозата и рисковата стратификация при МДС.
4. Потвърди се, че нивата на миР-16, миР-144, миР-451а и let-7a са значимо по-ниски при пациенти с МДС в сравнение със здрави контроли, което е в съответствие с международни данни за ролята им като потенциални диагностични маркери.
5. Потвърди се, че let-7a корелира с процента на бласти и R-IPSS риска, което подкрепя литературни

данни за ролята му в прогресията на МДС и потенциалната му роля в рисковата стратификация.

6. Разработен е диагностичен модел, базиран на LASSO регресия и комбинирането на няколко микроРНК (миР-22 и миР-451а), който показва изключително висока чувствителност и специфичност при разграничаване на пациенти с МДС от здрави контроли.
7. Потенциалната неинвазивност на плазмените микроРНК подчертава ролята им като допълнителен инструмент към стандартните диагностични методи (морфологична оценка, цитогенетика, молекулярни тестове), особено при случаи със затруднена хистопатологична оценка.

VII. Научни публикации по темата

1. Атанасова С., Мичева И. Нарушения в метилирането при миелодиспластичен синдром – терапевтични възможности. MEDINFO. 2022;4
2. Атанасова С., Мичева И. Епигенетични механизми при миелодиспластичен синдром. Медицински преглед. 2022
3. Micheva, I. D., & Atanasova, S. A. MicroRNA dysregulation in myelodysplastic syndromes: implications for diagnosis, prognosis, and therapeutic response. *Frontiers in oncology*, 14, 2024

VIII. Благодарности

Настоящата дисертация е резултат от дългогодишни усилия, които не биха били възможни без подкрепата, насоките и помощта на редица хора, на които съм дълбоко признателна:

- Изказвам искрената си благодарност към научния ми ръководител проф. д-р Илина Мичева за нейното търпение, професионализъм и ценни насоки по време на изследователската работа.
- Специални благодарности на доц. д-р Трифон Червенков и Мария Тенева, без чиито усилия в съхранението и обработката на пробите това изследване нямаше да бъде възможно.
- Благодаря на целия екип на Клиника по Хематология за предоставените условия и подкрепа в хода на изследването.
- Благодаря на всички пациенти и здрави доброволци, които взеха участие в това проучване. Вашето съдействие беше безценно и допринесе за научния напредък в тази област.
- Изказвам своята дълбока благодарност на семейството си за тяхната безусловна подкрепа, разбиране и търпение през целия процес. Вашето насърчение и вяра в мен бяха неизменен източник на мотивация.