

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
КАТЕДРА „ПРОПЕДЕВТИКА НА
ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ“**

Д-Р ЙОРДАНКА ГЕОРГИЕВА ДОНЕВА-КАШЛОВА

**КРЪВНИ НИВА НА ЦИРКУЛИРАЩИ
ДЪЛГОВЕРИЖНИ НЕКОДИРАЩИ
РИБОНУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ –
LncRNAs ПРИ СЪРДЕЧНОСЪДОВИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“

Научен ръководител:

Доц.д-р Веселин Добрев Вълков, д.м

Официални рецензенти:

Проф.д-р Жанета Георгиева Тянева , д.м

Проф д-р Христо Благоев Цеков , д.м.н

Варна, 2025 г.

Дисертационният труд е представен в обем 120 страници и съдържа 28 фигури и 21 таблици. Литературната справка включва 299 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на Катедра „Пропедевтика на Вътрешните болести“ при Медицински Университет „Проф.д-р Параскев Стоянов“ – Варна и е насрочен за публична защита пред научно жури в следния състав:

Председател:

Доц. д-р Атанас Ангелов, д.м

Членове:

Проф. д-р Жанета Георгиева, д.м

Проф. Арман Постаджиян, д.м

Проф. д-р Христо Цеков, д.м.н

Доц. д-р Елеонора Димитрова-Господинова, д.м

Резервни членове:

Доц. д-р Димитър Карастатов, д.м

Доц. д-р. Павлина Пенева, д.м

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 08.05.2025г отчаса в зала..... на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Медицински Университет „Проф.д-р П.Стоянов“ – Варна и в електронен вид на сайта на МУ-Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
ВЪВЕДЕНИЕ	7
I. ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И ХИПОТЕЗА	9
1. Цел	9
2. Задачи	9
3. Хипотези	9
II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	10
1. Време и място за провеждане на проучването	10
2. Предмет на проучването	10
3. Обект на проучването	10
4. Обхват и подбор на пациенти, включени в проучването	11
5. Лабораторни методи	12
6. Ехокардиографски методи	17
7. Статистически методи	18
III. РЕЗУЛТАТИ	19
1. Демографски характеристики на изследваните групи пациенти	19
2. Придружаващи заболявания в групата на пациентите със сърдечна недостатъчност	21
3. Придружаващи заболявания в групата на пациентите с остър миокарден инфаркт	22
4. Плазмена експресия на lncRNA Wisper при изследваните групи пациенти	24
5. Плазмена експресия на lncRNA Wisper при пациентите със сърдечна недостатъчност	26
6. Плазмена експресия на lncRNA Wisper при пациентите с остър миокарден инфаркт (STEMI)	30
7. Плазмена експресия на lncRNA NRF при изследваните групи пациенти	38

8.	Плазмена експресия на lncRNA NRF пациентите със сърдечна недостатъчност	40
9.	Плазмена експресия на lncRNA NRF пациентите с остър миокарден инфаркт (STEMI)	44
IV.	ДИСКУСИЯ	50
1.	Експресия на lncRNA Wisper при сърдечна недостатъчност .	50
2.	Експресия на LncWisper при миокарден инфаркт	53
3.	Експресия на lncRNA NRF при сърдечна недостатъчност . . .	56
4.	Експресия на lncRNA NRF при миокарден инфаркт	57
V.	ИЗВОДИ И ПРИНОСИ	59
1.	Изводи.	59
2.	Приноси	60
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	61
	НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА	62

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ССЗ	сърдечносъдови заболявания
СЗО	Световна здравна организация
РНК	рибонуклеинова киселина
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
ОКС	остър коронарен синдром
ЕКГ	електрокардиограма
СКАГ	селективна коронарна ангиография
ОМИ	остър миокарден инфаркт
МИ	миокарден инфаркт
СН	сърдечна недостатъчност
cTn	тропонин
hsTn	високочувствителен тропонин
СК	креатинкиназа
СК-МБ	креатинкиназа МБ фракция
ФИ	фракция на изтласкване
ЛК	лява камера
ИБС	ишемична болест на сърцето
САП	стабилна ангина пекторис
ФИ	фракция на изтласкване
ЗД	захарен диабет
ХБН	хронична бъбречна недостатъчност
lncRNAs	long non-coding ribonucleic acids
microRNAs/miRNAs	micro ribonucleic acids
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
mRNA	messenger ribonucleic acid
STEMI	ST elevation myocardial infarction
NSTEMI	non ST elevation myocardial infarction
NSTE-ACS	non ST elevation acute coronary syndrom
lncRNAANRIL	antisense long non-coding RNA in gene locus cyclin-dependent kinase inhibitors – INK4
lncRNA HOTAIR	HOX gene cluster antisense intergenic long non-coding RNA lnc
RNA NRF	long non coding RNA necrosis related factor

lncRNA MIAT	myocardial infarction-associated transcript
IL 6	interleukin 6
BNP	brain natriuretic peptide
TNF α	tumor necrosis factor alpha
ISR	in-stent restenosis
LAD	left anterior descending artery
lncRNA Wisper	Wisp2 – signaling pathway protein super enhancer– associated RNA
lncRNA HIF1A	AS2/endogenous hypoxia-inducible factor 1 α antisense RNA 2
lncRNA aHIF	hypoxia
I/R	ischemia reperfusion
RIPK1	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIPK3	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3

ВЪВЕДЕНИЕ

При изучаване на последователността на човешкия транскриптом са открити нов клас рибонуклеинови киселини, наречени дълги некодиращи рибонуклеинови киселини или long non-coding ribonucleic acids (lncRNAs).

Този клас рибонуклеинови киселини се различават от други некодиращи рибонуклеинови киселини като например микрорибонуклеиновите киселини – micro ribonucleic acids (micro RNAs/miRNAs) по техния размер, последователност и структура (Hennessy, 2022).

Дългите некодиращи рибонуклеинови киселини са хетерогенен клас рибонуклеинови киселини, като най-общо те представляват транскрипти с дължина повече от 200 нуклеотиди, които не съдържат протеин-кодираща последователност и не принадлежат към рибозомни, трансферни или малки ядрени рибонуклеинови киселини (Mattick et al., 2023). Тази група некодиращи рибонуклеинови киселини модулира транскрипцията на протеин-кодиращите гени. Те притежават способността да се свързват със съседни гени, което ги прави и потенциални таргетни молекули (Kohlmaier et al., 2023).

Множество проучвания са демонстрирали ролята на lncRNAs и участието им в патогенезата и развитието на сърдечносъдовите заболявания (Hennessy, 2022). Напоследък изследвания относно значението на lncRNAs в областта на сърдечносъдовата патология не се фокусират само върху анализи на клетъчно инвитро ниво, но изучават и задълбочено тяхната характеристика ин vivo (Kohlmaier et al., 2023).

Някои lncRNAs са описани като участници в ембрионалното развитие на сърцето, а други се експресират в кардиомиоцитите, в ендотелната мускулатура и модулират клетъчния растеж и диференциация.

При проучване на животински модели със сърдечносъдова патология се установява, че lncRNAs участват във физиологията и поддържането на хомеостазата на сърдечносъдовата система и патогенезата на различни сърдечносъдови заболявания като например атеросклероза и инфаркт на миокарда (Kohlmaier et al., 2023).

Докладвана е и ролята на lncRNAs в генезата и развитието на сърдечната недостатъчност, където чрез различни механизми те повлияват множество патофизиологични процеси (Li et al., 2024).

С напредъка в технологията за секвениране, геномното инженерство и РНК технологиите за количествен полимеразноверижан анализ непрекъснато се откриват нови lncRNAs в различни области на медицината, както и се прави задълбочен анализ върху вече установени такива.

Немалък е броят на lncRNAs и значението им за сърдечносъдовата система. Описани са множество lncRNAs специфично експресирани в сърдечната тъкан и изявени в различна степен при ССЗ.

Решаваща е ролята на тези молекули РНК при различни процеси в сърдечната тъкан като клетъчен растеж и диференциация, пролиферация, апоптоза, клетъчна автофагия и фиброза.

Открити са хиляди дълговерижни РНК молекули аберантно експресирани, някои от тях преобладават в сърдечната тъкан и в кардиомиоцитите при животински модели, докато други се експресират в телесни течностичовешка плазма и/или серум, урина. Специфичният им профил на експресия варира в зависимост от динамиката на развитието на заболяването.

Немалък е и броят на проучванията, които демонстрират участието на дълговерижните РНК в патогенезата и патофизиологията на социалнозначими заболявания като инфаркт на миокарда и сърдечна недостатъчност.

Така например някои РНК молекули са описани с повишена експресия в ранната фаза на миокарден инфаркт и сърдечна недостатъчност, докато други се асоциират с понижена такава. Установена е и корелация на дълговерижните РНК с различни лабораторни и клинични параметри. Този факт поражда широко поле за дискусия и ги прави идеални кандидати за отлични неинвазивни биомаркери за прецизната диагноза, прогнозата и стратификация на заболяванията в областта на сърдечносъдовата патология.

Разработването на нови подходи и задълбоченото анализиране на динамичната регулация на lncRNAs дава възможност за въвеждането и на нови терапевтични стратегии.

В този смисъл са необходими мащабни и високоспецифични проучвания за утвърждаване значението на lncRNAs като диагностични биомаркери и терапевтични таргети при ССЗ.

Всичко това ни мотивира за избор на темата на дисертационен труд.

1. ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И ХИПОТЕЗА

1. Цел

Цел на проучването е да изследва и анализира плазмената експресия на дълговерижните некодиращи рибонуклеинови киселини – lncRNA Wisper и lncRNA NRF, при болни със сърдечна недостатъчност (CH) и болни с остър миокарден инфаркт със ST елевация (STEMI).

2. Задачи

За постигане на целта са поставени следните задачи:

1. Да се изследват и сравнят нивата на плазмена експресия на lncRNA Wisper при болни със сърдечна недостатъчност спрямо контролната група.

2. Да се изследват и сравнят нивата на плазмена експресия на lncRNA Wisper при болни с остър миокарден инфаркт със ST елевация до 12 часа от началото на инфаркта спрямо контролната група.

3. Да се изследват и сравнят нивата на плазмена експресия на lncRNA NRF при болни със сърдечна недостатъчност спрямо контролната група.

4. Да се изследват и сравнят нивата на плазмена експресия на lncRNA NRF при болни с остър миокарден инфаркт със ST елевация до 12 часа от началото на инфаркта спрямо контролната група.

5. Да се проучи и анализира влиянието на допълнителни фактори като възраст, пол и коморбидитет върху плазмената експресия на lncRNA Wisper и lncRNA NRF при болните със сърдечна недостатъчност и остър миокарден инфаркт.

3. Хипотези

lncRNA Wisper и lncRNA NRF са с повишени нива на експресия в кръвната плазма на пациенти със CH и пациенти със STEMI.

Плазмената експресия на lncRNA Wisper и lncRNA NRF не се влияе от фактори като пол, възраст и придружаващи заболявания (захарен диабет, дислипидемия, хронична бъбречна недостатъчност).

II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Време и място за провеждане на проучването

Настоящото проучване е с ретроспективен характер. Биологичният материал (кръвни проби) е взет от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“, както следва в Клиника по вътрешни болести и Първа клиника по кардиология с интензивно кардиологично отделение в периода 2014 – 2016 година. Биологичният материал е съхраняван в материалната база на УМБАЛ „Св. Марина“ в съответствие с изискванията за съхранение на биологичен материал за изследване на РНК молекули при -80 градуса по Целзий. LncRNA Wisper и LncRNA NRF са изследвани в лаборатория на Катедра „Медицинска микробиология член кореспондент проф. д-р Иван Гербов Митов, д.м.н.“, съвместно с Катедра „Физиология и патофизиология“, Медицински факултет – Медицински университет, София.

Проучването е проведено след одобрение от Комисията по етика на научните изследвания на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна в съответствие с изискванията на Хелзинкската декларация. Участниците в него са включени след предварително подписване на информирано съгласие.

2. Предмет на проучването

Изследване на нивата на циркулиращи дълговерижни некодиращи РНК – LncRNA Wisper и LncRNA NRF в кръвната плазма на болни със сърдечна недостатъчност и на болни с остър миокарден инфаркт със ST елевация.

3. Обект на проучването

Пациентите са разпределени в три групи, както следва: Първа група – пациенти с остър миокарден инфаркт със ST елевация – $n = 37$; Втора група – пациенти с диагноза сърдечна недостатъчност NYHA клас III – IV – $n = 28$; Трета група – лица без сърдечносъдови заболявания, отговарящи на включващите и изключващите критерии, използвани като контролна група – $n = 15$.

4. Обхват и подбор на пациенти, включени в проучването

За целите на настоящото проучване е изследвана плазмената експресия на дълговерижни циркулиращи РНК молекули – lncRNA Wisper и lncRNA NRF чрез метода на real – time reverse transcription polymerase-chain reaction-RT-qPCR при общо 80 души.

Пациентите са подбрани по точно определени критерии за включване и изключване в проучването.

В първата група (n = 37) са включени хоспитализирани пациенти с остър миокарден инфаркт със ST елевация (STEMI). Венозна кръв за изследване е взета в първите 12 часа от началото на симптомите на ОМИ.

Втората група обхваща пациенти (n = 28), хоспитализирани по повод обострена сърдечна недостатъчност III-IV ф.к. по NYHA. При мнозинството от пациентите причината за СН е исхемична болест на сърцето – преживян миокарден инфаркт при 19 болни (67.9%), при 5 болни (17,9%) е идиопатична дилатативна кардиомиопатия. Сред останалите 4 болни (14,3%) причините са клапна патология или ритъмни нарушения. Средната фракция на изтласкване на групата със СН е 35.46% $\pm$ 7.48. От тях 4 (14,2%) са с NYHA функционален клас IV.

Третата група лица без сърдечносъдови заболявания, отговарящи на включващите и изключващите критерии, използвани като контролна група (n = 15) .

Включващи критерии за групата от пациенти със STEMI:

Лица, хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД, подписали общоболнична Декларация за информирано съгласие и Декларация за участие в проучването.

Пациенти на възраст над 18 години.

Пациенти с гръдна болка със сигнификантна (минимум 2 мм) елевация на ST сегмента в най-малко две съседни електрокардиографски отвеждания и/или сигнификантно увеличение на сърдечен тропонин (над 99-ия персентил на горната еталонна определена стойност (URL)); <12 часа от началото на симптомите до първична PCI.

Включващи критерии за групата от пациенти със СН:

Лица, хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД, подписали общоболнична Декларация за информирано съгласие и Декларация за участие в проучването.

Пациенти на възраст над 18 години.

Клинични и ехокардиографски (ФИ<40%) критерии за СН. Диагнозът сърдечна недостатъчност е поставена според препоръките на Европейското дружество по кардиология (Ronikowski et al., 2014) според които сърдечна недостатъчност се дефинира като клиничен синдром с типична клинична картина (диспнея, подуване на глезените, умора), придружена от налична физикална находка (шиен венозен застой, белодробен застой и периферни отоци), причинени от структурни сърдечни промени с последваща редукция на ударния обем и/или повишено преднатоварване, предварителен товар в покой или при физически усилия.

Включващи критерии за третата група:

Пациенти на възраст над 18 години.

Подписали Декларация за участие в проучването.

Лица без данни за сърдечносъдови заболявания.

Исключващи критерии за участие в проучването:

Лица под 18-годишна възраст

Клинични и лабораторни данни за активна инфекция. Възпалителни заболявания.

Онкологични заболявания.

5. Лабораторни методи

За целите на проучването е използвана съхраняваната периферна венозна кръв в материалната база на УМБАЛ „Св. Марина“ на –80 С от пациентите, разпределени в трите групи.

Количеството на всяка кръвна проба – 2 мл, е било разпределено във вакутейнери, които в рамките на 15 мин. са били центрифугирани на 2500 g за 20 мин, след което биологичният материал е съхраняван според изискванията за съхранение на РНК молекули – при –80°C до деня на анализ.

За целите на настоящото изследване пробите бяха транспортирани в специална хладилна чанта, снабдена със сух лед, до лаборатория „Медицинска микробиология член кореспондент проф. д-р Иван Гербов Митов, д.м.н.“, където съвместно с Катедра „Физиология и патофизиология“, Медицински факултет, Медицински университет, София

се осъществи и анализът на плазмената експресия на дълговерижните РНКи – lncRNA Wisper и lncRNA NRF чрез RT-qPCR. Методът включва следните етапи:

Изолиране на РНК от плазма

Материали

- Quick-DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research)
- Плазмени проби
- Микроцентрифужни епруветки (2 mL)
- Пипети и стерилни типчета
- Центрофуга
- Етанол (95-100%)
- РНКаза-свободна вода

Необходимо оборудване

- Микроцентрифуга
- Вортекс
- Термоблок

Метод

1. Предварителна подготовка
 - Добавяне на етанол към DNA/RNA Wash Buffer според инструкциите на производителя
 - Всички центрофугирания се извършват при стайна температура
2. Лизиране на пробата
 - Към 200 μL плазма се добавят 800 μL QIAzol Lysis Reagent
 - Вортексиране за 15 секунди
 - Инкубиране при стайна температура за 15-20 минути
3. Свързване на РНК
 - Прехвърляне на лизата в Zymo-Spin™ IC Column
 - Центрофугиране при $12,000 \times g$ за 1 минута
 - Изхвърляне на филтратата
4. Промиване
 - Добавяне на 400 μL DNA/RNA Prep Buffer
 - Центрофугиране при $12,000 \times g$ за 1 минута
 - Изхвърляне на филтратата
 - Добавяне на 400 μL DNA/RNA Wash Buffer
 - Повтаряне на промиването още веднъж

5. Елуиране на РНК

Прехвърляне на колоната в нова стерилна епруветка

Добавяне на 32 μL DNase/RNase-Free Water директно върху матрицата

Инкубиране за 1 минута при стайна температура

Центрофугиране при $12,000 \times g$ за 1 минута

Обратна транскрипция

Материали

- miScript II RT Kit (Qiagen)
- Изолирана РНК
- PCR епруветки (0.2 mL)
- Пипети и стерилни типчета
- РНКаза-свободна вода

Оборудване

- Термоблок
- Миницентрофуга
- Вортекс

Метод

1. Приготвяне на реакционната смес (за една реакция):
 - 4 μL 5x miScript HiSpec Buffer
 - 2 μL 10x miScript Nucleic Mix
 - 2 μL miScript Reverse Transcriptase Mix
 - Изолирана РНК (до 12 μL ; 100ng/ μL)
 - РНКаза-свободна вода до краен обем 20 μL
2. Провеждане на обратна транскрипция
 - Внимателно размесване чрез пипетиране
 - Кратко центрофугиране за събиране на течността
 - Инкубиране в термоблок при следните условия:
 - 37°C за 60 минути (синтез на кДНК)
 - 95°C за 5 минути (инактивиране на обратната транскриптаза)
 - Охлаждане до 4°C
3. Съхранение
 - Получената кДНК се съхранява при -20°C за кратък срок
 - За дългосрочно съхранение се препоръчва -80°C

Провеждане на RT-qPCR

Приготвяне на реакционна смес за RT-qPCR (за една реакция, общ обем 10 μL):

- 5 μL 2 $\times$ QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
- 0.5 μL прав праймер (крайна конц. 10 pM)
- 0.5 μL обратен праймер (крайна конц. 10 pM)
- 2 μL кДНК матрица
- 2 μL РНКаза-свободна вода

Подготовка на реакцията:

- Разпределяне на реакционната смес в ямките на 384-ямкова плака
- Включване на три технически повторения за всяка проба
- Поставяне на отрицателна контрола (вода вместо кДНК)
- Запечатване на плаката с оптично фолио
- Кратко центрофугиране за събиране на течността на дъното

Термален профил на RT-qPCR:

1. Начална денатурация и активация:

- 95°C за 15 минути

2. 45 цикъла на амплификация:

- Денатурация: 94°C за 15 секунди
- Анилинг: 55°C за 30 секунди
- Елонгация: 72°C за 30 секунди

Изолиране на РНК от плазма

За изолиране на РНК от плазмени проби беше използван Quick-DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research) според протокола на производителя със следните модификации. Към 200 μL плазма се добавят 800 μL QIAzol Lysis Reagent, след което сместа се хомогенизира чрез вортексиране за 15 секунди и се инкубира при стайна температура за 15-20 минути. Полученият лизат се прехвърля в Zymo-Spin™ IC Column и се центрофугира при $12,000 \times g$ за 1 минута. След отстраняване на филтратата РНК, свързана към колоната, се промива двукратно с по 700 μL DNA/RNA Wash Buffer чрез центрофугиране при $12,000 \times g$ за 1 минута. За елуиране на РНК колоната се прехвърля в нова стерилна епруветка и към колоната се добавят 32 μL DNase/RNase-Free Water. След едноминутна инкубация при стайна температура РНК се елуира чрез центрофугиране при $12,000 \times g$ за 1 минута.

Обратна транскрипция

За обратна транскрипция на изолираната РНК беше използван miScript II RT Kit (Qiagen). Реакционната смес с общ обем 20 μL съдържа 4 μL 5x miScript HiSpec Buffer, 2 μL 10x miScript Nucleics Mix, 2 μL miScript Reverse Transcriptase Mix и изолирана РНК (до 12 μL ; 100ng/ μL). При необходимост обемът се допълва до 20 μL с РНКаза-свободна вода. След внимателно размесване и кратко центрофугиране, реакционната смес се инкубира при 37°C за 60 минути за синтез на кДНК, последвано от 5-минутна инкубация при 95°C за инактивиране на обратната транскриптаза. Получената кДНК се съхранява при -20°C за кратък срок или при -80°C за дългосрочно съхранение.

Всички стъпки от процедурата се извършват при стриктно спазване на условията за работа с РНК, използвайки РНКаза-свободни консумативи и реагенти. Многократното замразяване и размразяване на пробите се избягва.

Провеждане на RT-qPCR

За RT-qPCR анализ беше използван QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Реакционната смес с общ обем 10 μL съдържа 5 μL 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, по 0.5 μL от прав и обратен праймер (с крайна концентрация 10 pM), 2 μL кДНК матрица и 2 μL РНКаза-свободна вода. Реакцията се провежда в 384-ямкови плаки, като всяка проба се анализира в три технически повторения. За отчитане на евентуална контаминация се включват отрицателни контроли, съдържащи вода вместо кДНК матрица.

PCR амплификацията се извършва на Real-Time PCR система на апарат 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) при следните условия: начална денатурация и активиране на полимеразата при 95°C за 15 минути, последвани от 45 цикъла, включващи денатурация при 94°C за 15 секунди, анилинг при 55°C за 30 секунди и елонгация при 72°C за 30 секунди.

Секвенция на използваните праймери

Наименование на праймера	Секвенция (5'→3')
lncNRF1_F	CACTCCATCCTCCACCTT
lncNRF1_R	GTGTATTCTCAGCCTGGGTGA
lncRNA_Wisper_F	TTCCTTTGGAGCATCTGGAC
lncRNA_Wisper_R	ACTGGCTTTCGGACTGGTG
GAPDH-201_F	TGGTCTCCTCTGACTTCAACAG
GAPDH-201_R	GCTTGACAAAGTGGTCGTTG

Като референтен ген (ендогенна контрола) при анализа на експресията на GAPDH гена.

Стойността RQ показва с колко пъти е променена експресията в сравнение с калибратора. Калибраторът има RQ стойност 1. Всички проби се сравняват с калибратора. RQ стойност 10 означава, че изследваната lncRNA е 10 пъти по-силно експресирена в дадената проба в сравнение с калибраторната проба. Стойност на RQ 0.1 означава, че изследваната lncRNA е с 10 пъти по-ниска експресия.

Приема се, че RQ е значима, когато стойността е > 2 или по-малко от 0.50. Пристойност на RQ над 2 означава, че има положителна промяна в експресията (повишение) на съответния изследвана lncRNA. При стойност на $RQ < 0.50$, промяната в експресията е с отрицателна стойност (понижение в експресията).

Плазмената експресия на посочените lncRNAs беше сравнена с концентрациите на тропонин I (ng/ml) (Immulite 2000, Siemens, Ерланген, Германия), както и с HMGB1 (ng/ml) (ELISApShino-Test Corporation, Канагава, Япония); RIPK3 (ng/ml) (ELISA CUSABIO, Ухан, Китай),

6. Ехокардиографски методи

Лявокамерната фракция на изтласкване бе оценена по метода на Симпсън, съгласно действащите препоръки за оценка сърдечните кухини, предложени и описани от European Association of Cardiovascular Imaging към *Европейското дружество по кардиология*.

7. Статистически методи

Статистическият анализ на изследването е извършен със SPSS Statistics V.23. По категории различните характеристики са обобщени в честота и проценти.

Използвани са следните статистически методи:

1. Дескриптивен анализ за определяне на статистически величини: средна стойност, стандартна грешка на средната, минимални и максимални стойности, медиана.
2. Тест на Kolmogorov–Smirnov Test/ тест на Shapiro Wilk: тест за проверка на нулевата хипотеза и определяне на типа на разпределение на стойностите/ разпределението на пробите за нормалност
3. Графичен метод – използвани са линейни и плоскостни графични изображения ,кръгови и кръгово – секторни диаграми , стереограми и символни диаграми
4. Статистическо изследване на зависимости чрез корелационен анализ: чрез определяне коефициент на Spearman (непараметричен анализ), при който се тества каква е наличната корелация права или обратнопропорционална между две величини.
5. Pairwise comparison – статистически метод , чрез който се сравнява взаимовръзката между осредни стойности в популацията, когато се правят групови сравнения
6. Mann Whitney U тест за сравнение на средни стойности
7. Специфичността и чувствителността на дълговерижните РНКи за отдиференциране на пациентите със СН , STEMI и здравите контролни индивиди са оценени чрез receiver operating curve (ROC) анализ. Диагностичната точност на биомаркерите се определи чрез получаване на възможно най-голяма площ под кривата (AUC) на ROC анализа.

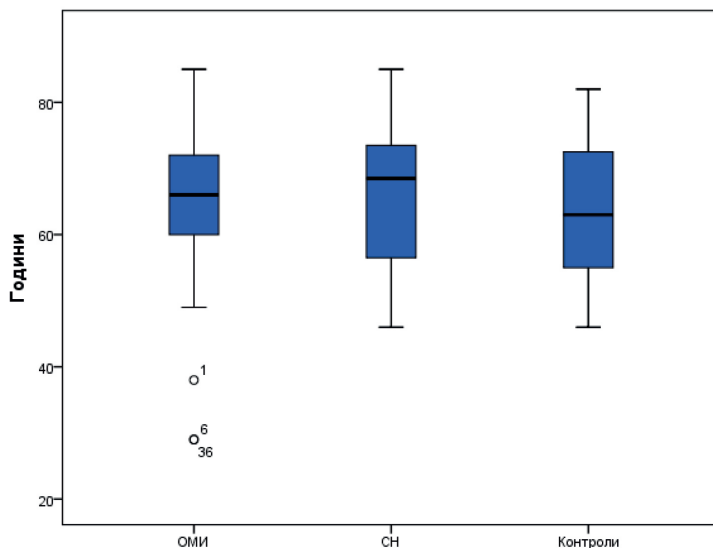
Представените стойности включват средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD). При обработка на данните за статистически сигнификантни са приемани разлики, при които $p \leq 0,05$.

III. РЕЗУЛТАТИ

1. Демографски характеристики на изследваните групи пациенти

➤ Разпределение на пациентите по възраст в изследваните групи

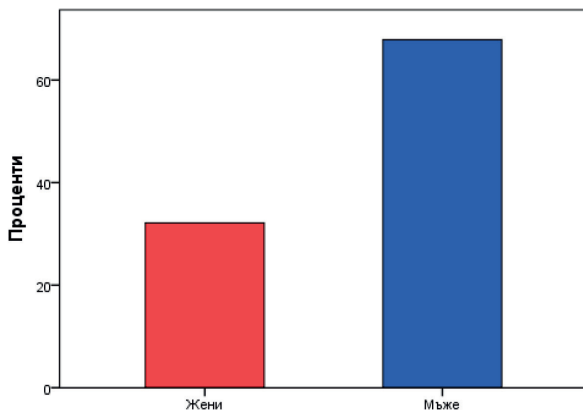
Анализът на възрастта на пациентите, включени в научното проучване, показва, че средната възраст на пациентите със СН е 66.2 ± 11 години, с минимална възраст 46 г. и максимална – 85 г. Средната възраст на пациентите със STEMI е 64 ± 13.2 години, с минимална възраст 29 г. и максимална – 85 г. Средната възраст на контролната група е 64.3 ± 11.3 години, с минимална 46 години и максимална 78 години. Не се отчете сигнификантна разлика във възрастта между пациентите с ОМИ със ST елевация и контролната група ($p = 0,769$), както и във възрастта на пациентите със СН и контролната група ($p = 0,515$) (фиг. 1).



Фигура 1. Разпределение на пациентите в изследваните групи според възрастта

➤ **Разпределение на пациентите със сърдечна недостатъчност според пола**

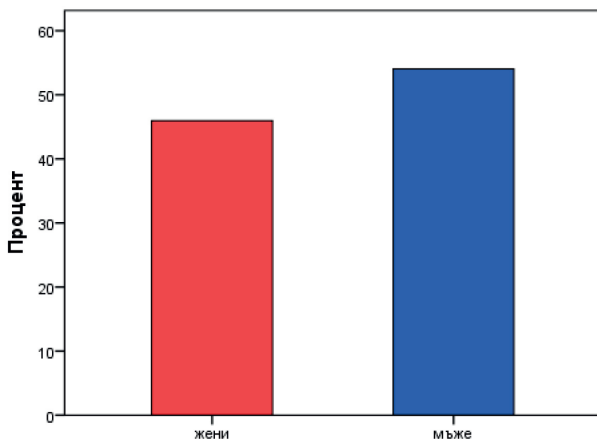
В групата на пациентите със СН преобладават мъжете с 67.9% спрямо жените, които са 32.1% (фиг. 2).



Фигура 2. Разпределение по пол в групата на пациентите със СН

➤ **Разпределение на пациентите с остър миокарден инфаркт според пола**

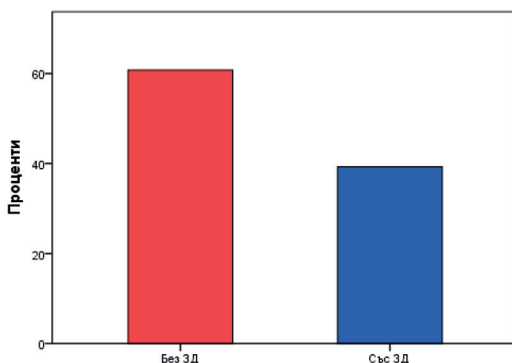
В групата на пациентите с ОМИ 45,9% са жени, а 54.1% мъже (фиг. 3).



Фигура 3. Разпределение по пол в групата на пациентите с ОМИ

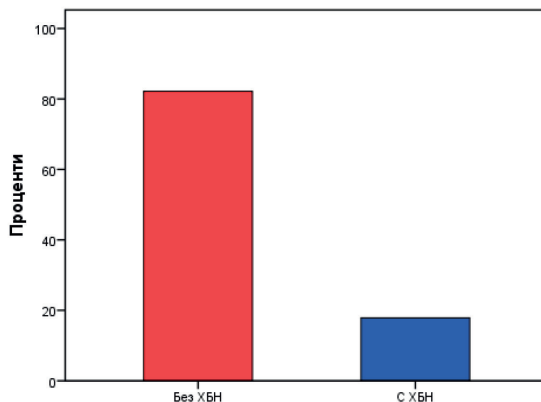
2. Придружаващи заболявания в групата на пациентите със сърдечна недостатъчност

1. Всички изследвани пациенти със СН са и с придружаваща артериална хипертония (АХ).
2. Приблизително една трета от болните със СН са диагностицирани и с придружаващо заболяване ЗД (39,3%) (фиг. 4).



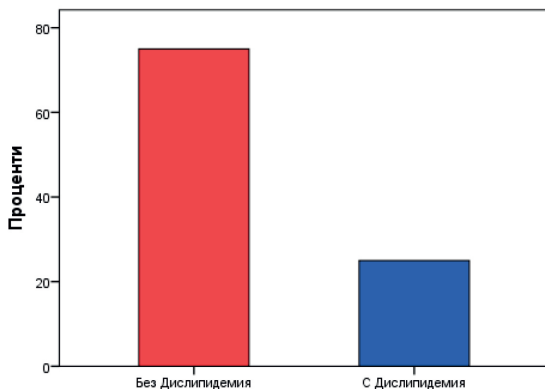
Фигура 4. Разпределение на пациентите със СН според честотата на захарен диабет

3. част от пациентите със СН са и с придружаваща хронична бъбречна недостатъчност (17.9%), докато при останалите 82.1% не е установена такава (фиг. 5).



Фигура 5. Разпределение на пациентите със СН според честотата на ХБН

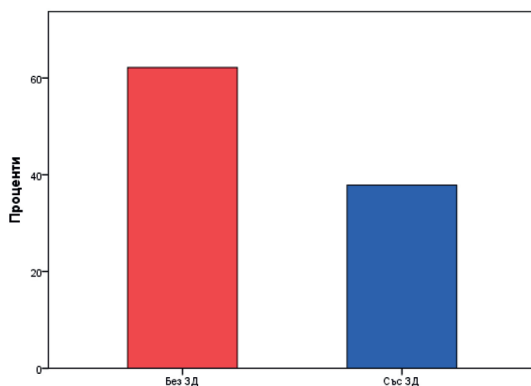
4. Анализът на резултатите показва, че една четвърт от изследваните болни със СН са с установена дислипидемия (25%) (фиг. 6).



Фигура 6. Разпределение на пациентите със СН според честотата на дислипидемия

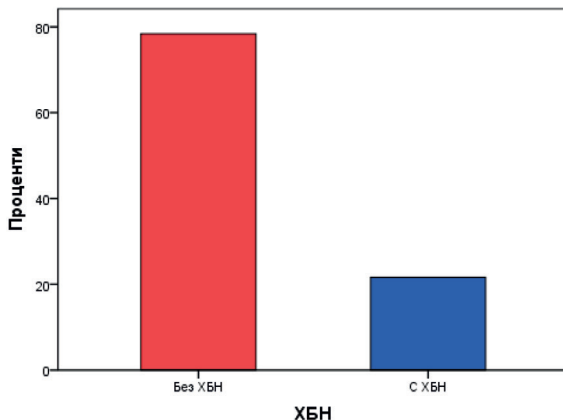
3. Придружаващи заболявания в групата на пациентите с остър миокарден инфаркт

1. Всички пациенти с ОМИ са с артериална хипертония (100%).
2. От пациентите с ОМИ, диагностицирани със ЗД са 37,8%, а при останалите 62,2% не е установен такъв (фиг. 7).



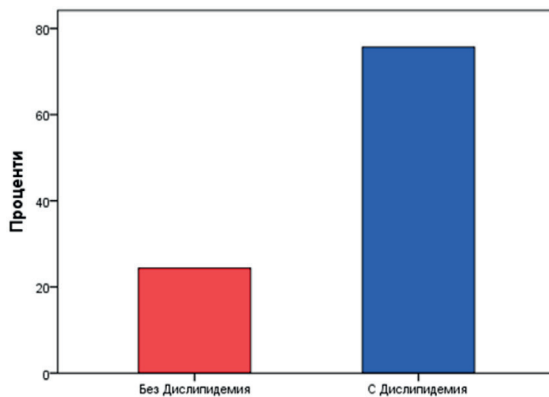
Фигура 7. Разпределение на пациентите с ОМИ според честотата на захарен диабет

3. Придружаваща хронична бъбречна недостатъчност (ХБН) е открита при 21.6% от болните с ОМИ (фиг. 8).



Фигура 8. Разпределение на пациентите с ОМИ според честотата на ХБН

От пациентите с ОМИ дислипидемия е установена при 75,7%, докато при останалите 24.3% не е доказана такава (фиг. 9).



Фигура 9. Разпределение на пациентите с ОМИ според честотата на дислипидемия

4. Плазмена експресия на lncRNA Wisper при изследваните групи пациенти

В рамките на дисертационния труд бе изследвано нивото на експресия на lncRNA Wisper в плазмата на 28 болни със СН III – IV ф.к. по NYHA, 37 болни с остър миокарден инфаркт със ST елевация (STEMI) и 15 пациенти, служещи за контролна група.

От извършения Шапиро-Уолк тест за аномалност е налице нееднородно разпределение на експресията на lncRNA Wisper сред изследваните групи ($p = 0,000$) (табл. 1).

Таблица 1. Разпределение на експресията на lnc RNAWisper в изследваните групи

lncRNA Wisper	Изследвана група	Брой	P
	ОМИ	37	,000
	СН	28	,000
	Контроли	15	,000

При последващ анализ се оцени и средната стойност (mean) и стандартната девиация (SD) на lncRNA Wisper при трите групи пациенти. Средната стойност в групата на пациентите с ОМИ е $\text{mean} = 101,6 \pm 529,92$, при пациентите със СН е $\text{mean} = 90,5 \pm 431,1$ и в контролната група – $\text{mean} = 25,2 \pm 63,8$ (табл. 2).

Таблица 2. Средни стойности на lncRNA Wisper в изследваните групи

Групи	Mean	SD
ОМИ	101,66382187345	529,9245120789274
СН	90,524439826586	431,1765401446110
Контроли	25,2760000000000	63,84884256657464

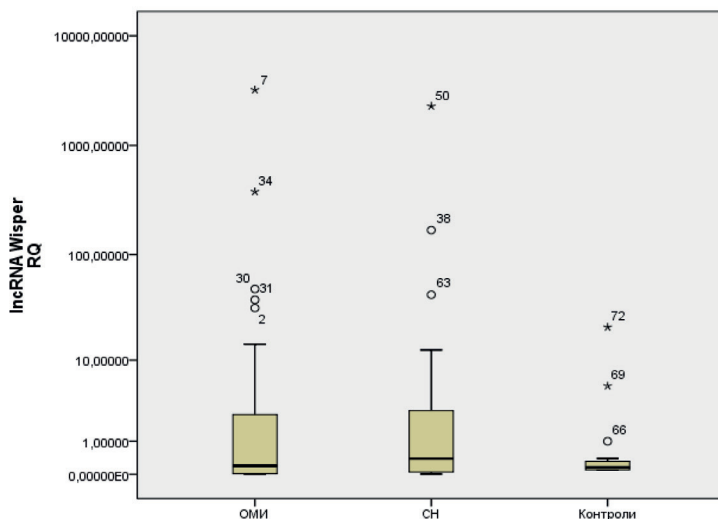
В групата на пациентите със STEMI нивата на експресия на lncRNA Wisper са сигнификантно по-високи спрямо контролната група ($p = 0.03$).

Отчита се и сигнификантна разлика в нивото на експресия на дългове-рижната РНК, сравнявайки групата на пациентите със СН и контролната група ($p = 0.021$). Не се установи значима разлика по отношение на експресията на *lncRNA Wisper* между пациентите със сърдечна недостатъчност и тези с остър миокарден инфаркт ($p = 1.0$) (табл. 3, фиг. 10).

Таблица 3. Сравнителен анализ на експресията на *lncRNA Wisper* в изследваните групи

	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	P
ОМИ-СН	-3,582	5,821	-,615	,538	1,000
ОМИ-Контроли	-23,656	7,113	-3,326	,001	,003
СН-Контроли	-20,074	7,435	-2,700	,007	,021

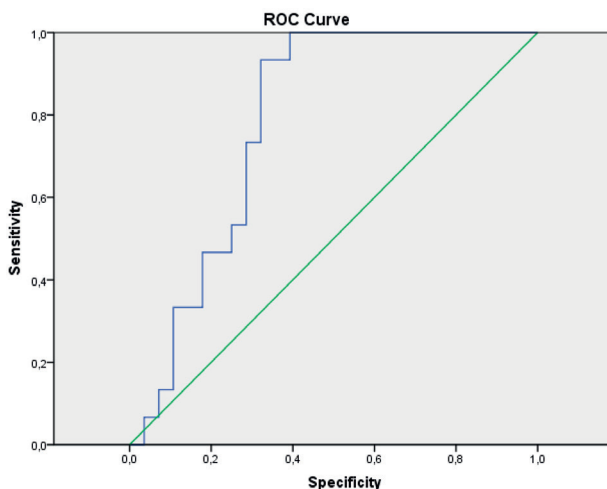
* Корелацията е сигнификантна при $p \leq 0,05$



Фигура 10. Плазмена експресия на *lncRNA Wisper* в изследваните групи

5. Плазмена експресия на lncRNA Wisper при пациентите със сърдечна недостатъчност

В рамките на проучването се извърши ROC curve анализ, според който плазмената експресия на lncRNA Wisper отдиференцира пациентите със СН спрямо контролната група с 80% сензитивност и 67% специфичност. Диагностичната акуратност на използвания маркер бе детерминирана, получавайки най-голямата площ под кривата – $AUC = 0.783$ (95% CI: 0.648–0.919, $p=0.002$, при оптималните cut – off стойности (фиг. 11).



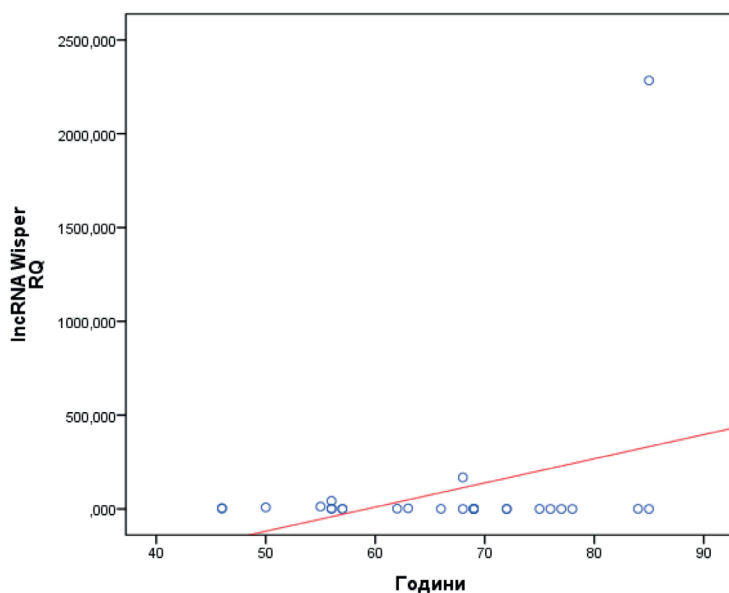
Фигура 11. Плазмени нива на експресия на lncRNA Wisper, диференциращи пациенти със сърдечна недостатъчност от контролната група

- Чрез Chi-Square анализ не се установи разлика в плазмената експресия на lncRNA Wisper според пола в групата на болните със СН ($p=0,358$).
- При последващ анализ на плазмената експресия на lncRNA Wisper при пациентите със СН се установи сигнификантна, но обратнопропорционална разлика в зависимост от възрастта на пациентите с коефициент на корелация ($\rho -0,452$) и ($p=0,016$) (табл. 4, фиг. 12).

Таблица 4. Корелационен анализ на експресията на lncRNA Whisper според възрастта в групата със СН

			lncRNA Whisper	Години
Spearman's	lncRNA Whisper	Коефициент на корелация (rho)	1,000	-,452*
		P-value	.	,016
	Години	Коефициент на корелация	-,452*	1,000
		P-value	,016	

* Корелацията е сигнификантна при $p \leq 0,05$



Фигура 12. Корелационен анализ на експресията на lncRNA Whisper според възрастта при пациенти със СН

➤ **Анализ на зависимостта на lncRNA Wisper с фракцията на изтласкване при пациентите със СН**

Не се установи връзка между експресията на lncRNA Wisper и фракцията на изтласкване ($p = 0.903$) (табл. 5).

Таблица 5. Корелационен анализ за връзката между експресията на lncRNA Wisper и фракцията на изтласкване

		lncRNA_Wisper RQ	ФИ%
lncRNA_Wisper RQ	Pearson корелация	1	-,024
	P		,903
ФИ%	Pearson корелация	-,024	1
	P	,903	

➤ **Плазмена експресия на lncRNA Wisper в групата на пациентите със сърдечна недостатъчност и коморбидитет (захарен диабет, дислипидемия, хронична бъбречна недостатъчност)**

В рамките на проучването бе направен анализ на връзката между плазмената експресия на lncRNA Wisper и най-често срещаните придружаващи заболявания при пациентите със СН.

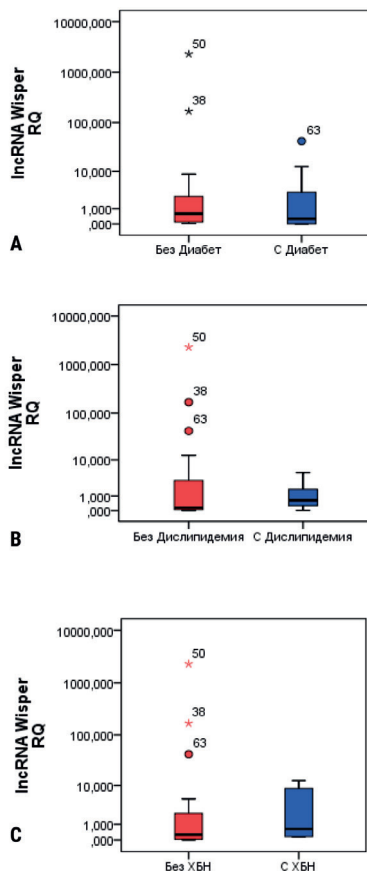
При приблизително една трета от изследваните болни (39,3%) СН е придружена от ЗД. Не се установи сигнификантна корелация между нивото на експресия на lncRNA Wisper и наличието на ЗД ($p=0,312$).

При една четвърт от изследваните болни със СН е налична и дислипидемия, като също не се установи сигнификантна разлика между нивото на експресия на lncRNA Wisper и наличието на дислипидемия ($p=0,730$).

Придружаваща ХБН е установена при 17,9% от пациентите със СН. Липсва значима разлика в експресията на lncRNA Wisper и наличната ХБН ($p=0,267$). Данните са представени в таблица 6 и фигура 13 (А, В, С).

Таблица 6. Разпределение на lncRNA Wisper по придружаващи заболявания при болните със СН

Mann-Whitney – придружаващи заболявания	стойност	P
ЗД	72,000a	,358
Дислипидемия	67,000a	,730
ХБН	39,000a	,267

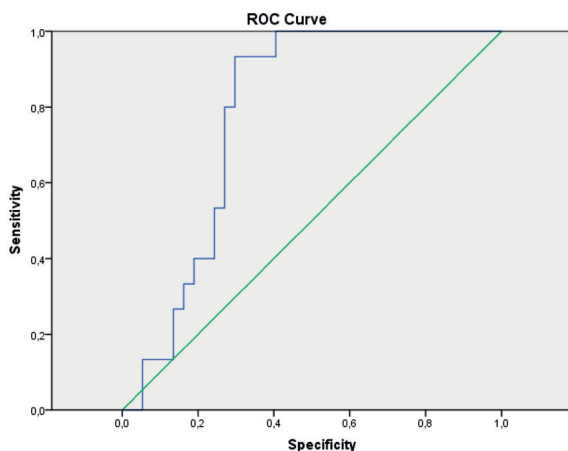


Фигура 13. Box plot анализ, показващ връзката между плазмената експресия на lncRNA Wisper и придружаващите заболявания при пациентите със СН

6. Плазмена експресия на lncRNA Wisper при пациентите с остър миокарден инфаркт (STEMI)

Нивата на експресия на lncRNA Wisper са сигнификантно по-високи сред групата пациенти с ОМИ (mean $101,663 \pm 87,119$) в сравнение с контролната група (mean $10,209 \pm 3,597$).

Плазмените нива на експресия на lncRNA Wisper отдиференцират пациентите със STEMI спрямо контролната група със сензитивност 80% и специфичност 71%. Диагностичната акуратност на биомаркерите бе детерминирана, получавайки най-голямата площ под кривата – AUC = 0.780 (95% CI: 0.658 – 0.903, $p = 0.002$), при съответните cut-off стойности (фиг. 14).



Фигура 14. Плазмени нива на експресия на lncRNA Wisper, диференциращи пациенти с остър миокарден инфаркт от контролната група

1. чрез прилагане на Chi-Square тест се установи, че няма разлика между мъже и жени спрямо експресията в плазмата на lncRNA Wisper ($P=0,469$).
2. При анализиране на плазмената експресия на lncRNA Wisper според възрастта на пациентите в групата със STEMI не се установи сигнификантна корелация ($p=0,612$) (табл. 7).

Таблица 7. Анализ на експресията на lncRNA Wisper в групата на болните с ОМИ според възрастта им

			lncRNA Wisper	Години
Spearman's rho	lncRNA Wisper	Коефициент на корелация	1,000	,086
		P	.	,612
	Години	Коефициент на корелация	,086	1,000
		P	,612	.

➤ **Плазмена експресия на lncRNA Wisper в групата на пациентите с остър миокарден инфаркт и коморбидитет (захарен диабет, дислипидемия, хронична бъбречна недостатъчност)**

За целите на изследването бе направен анализ на връзката на lncRNA Wisper с придружаващите заболявания на пациентите.

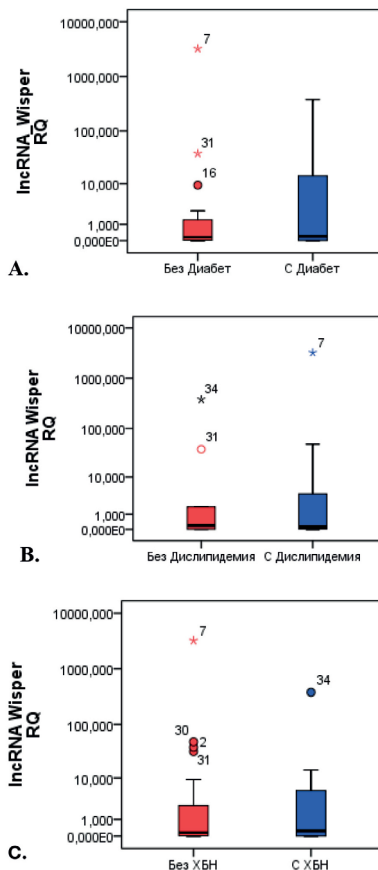
Приблизително една трета от болните (37,8%) със STEMI са със ЗД. Не се установи сигнификантна корелация между нивото на експресия на lncRNA Wisper и придружаващия захарен диабет ($p = 0,47$), т.е. получените резултати показаха, че захарният диабет не променя експресията на lncRNA Wisper при болните с ОМИ.

Значителна част от болните в групата с ОМИ са с дислипидемия (75.7%). При анализ на данните не се установява значима разлика между плазмените нива на lncRNA Wisper при болни със и тези без придружаваща дислипидемия ($p = 0.5$).

Част от пациентите с ОМИ, включени в проучването, са с ХБН (21.6%). Задълбоченият анализ на резултатите не показва наличието на сигнификантна разлика в експресията на lncRNA Wisper при болните с ОМИ, между подгрупите със и без ХБН ($p = 0,51$). Резултатите са представени на таблица 8 и фигура 15 (А, В, С).

Таблица 8. Разпределение на lncRNA Wisper по придружаващи заболявания при болните с ОМИ

Mann-Whitney – придружаващи заболявания	стойност	Р
ЗД	142,000a	,474
Дислипидемия	114,000a	,503
ХБН	113,500a	,514



Фигура 15. Box plot анализ, показващ връзката между плазмената експресия на lncRNA Wisper и придружаващите заболявания при пациентите с ОМИ

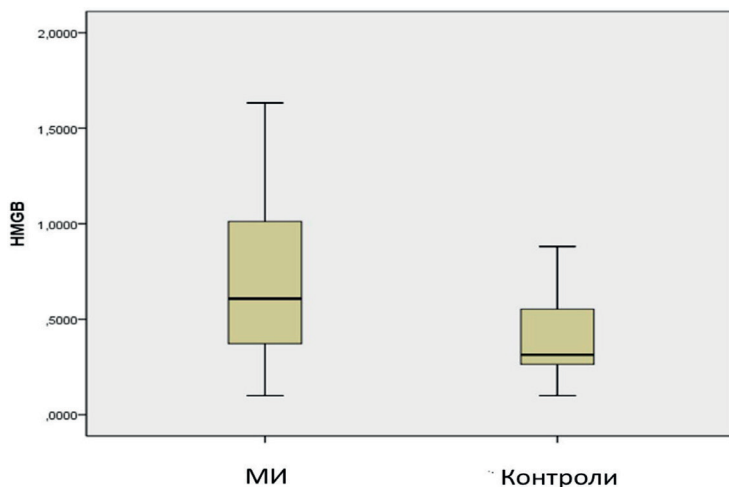
3. Сравнителен анализ на плазмената експресия на **lncRNA Wisper** с лабораторни показатели и фракцията на изтласкване при пациентите с остър миокарден инфаркт

LncRNA Wisper и HMGB1

В проведеното изследване бяха измерени нивата на HMGB1 при болните с ОМИ. Установените сигнификантно по-високи стойности на HMGB1 при ОМИ напълно съответстват на известните литературни данни и доказаната му стойност като биомаркер за тъканна некроза ($p=0.07$). Данните са представени в таблица 9 и визуализирани на фигура 16.

Таблица 9. Средни стойности на HMGB1 при болните с ОМИ, сравнени с контролната група

Групи:	HMGB	Std. Deviation	Std. Error Mean
HMGB1 МИ	,720162	,4374448	,0719155
контроли	,678933	,4238309	,1094327



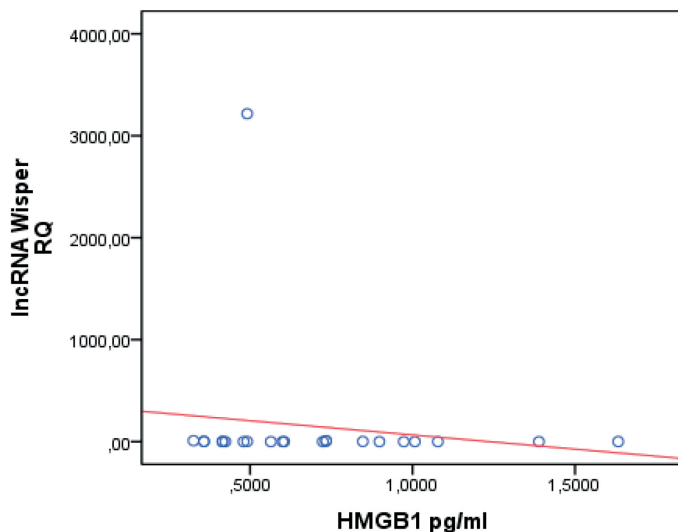
Фигура 16. Средни стойности на HMGB1 при болните с ОМИ, сравнени с контролната група

В групата на пациентите с миокарден инфаркт бе отчетена сигнификантна корелация между плазмените нива на експресия на lncRNA Wisper и кръвните нива на HMGB1, съответно ($\rho=0.385$, $p=0.019$). Представени са в табличен и графичен вид (табл. 10, фиг. 17).

Таблица 10. Сравнителен анализ на експресията на lncRNA Wisper и HMGB1 при болните с ОМИ

			lncRNA Wisper	HMGB1
Spearman's rho	lncRNA_Wisper	Корелац.коэффициент	1,000	,385*
		P-value	.	,019
	HMGB1	Корелац.коэффициент	,385*	1,000
		P-value	,019	.

* Корелацията е сигнификантна при $p \leq 0,05$

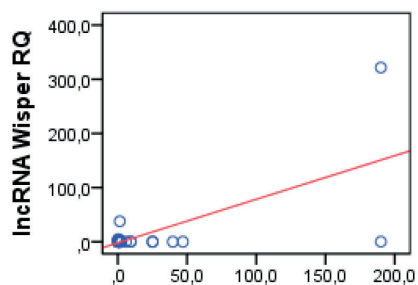


LncRNA Wisper и тропонин

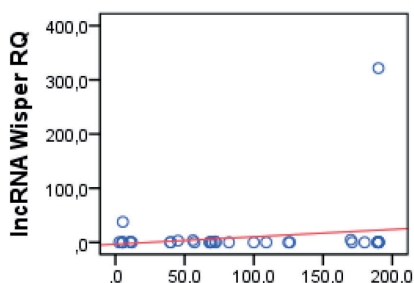
В рамките на изследването се отчете и отношението между нивото на експресия на lncRNA Wisper, анализирана в кръвна плазма до 12-я час от началото на симптомите на ОМИ, и нивото на тропонин, съответно изследван до 12-я час от началото на симптомите на ОМИ-начален ($p = 0,615$), максимално измерения тропонин ($p = 0,799$), както и тропонин между 24–48-я час от началото на симптомите на ОМИ ($p = 0,622$). Не се установи пряка зависимост между динамиката на измерения тропонин и плазмената експресия на lncRNA Wisper при пациентите с ОМИ (табл. 11, фиг. 18 А, В, С).

Таблица 11. Корелационен анализ на връзката между плазмената експресия на lncRNA Wisper и тропонин в динамика

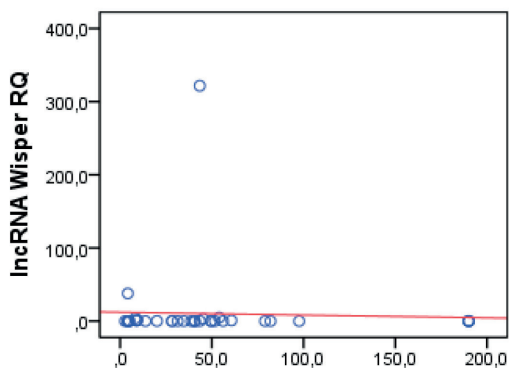
lncRNA_Wisper RQ	Тропонин до 12 час	Тропонин макс	Тропонин 24-48 час		
lncRNA_Wisper	Коефициент на корелация (rho)	1,000	-,086	,043	-,084
	P-value	.	,615	,799	,622
	Брой	37	37	37	37
Тропонин до 12 час	Коефициент на корелация-rho	-,086	1,000	,392*	,398*
	P-value	,615	.	,017	,015
	Брой	37	37	37	37
Тропонин макс	Коефициент на корелация	,043	,392*	1,000	,742**
	P-value	,799	,017	.	,000
	Брой	37	37	37	37
Тропонин 24-48час	Коефициент на корелация	-,084	,398*	,742**	1,000
	P-value	,622	,015	,000	.



A Начален тропонин (ng/ml)



B Максимален тропонин (ng/ml)



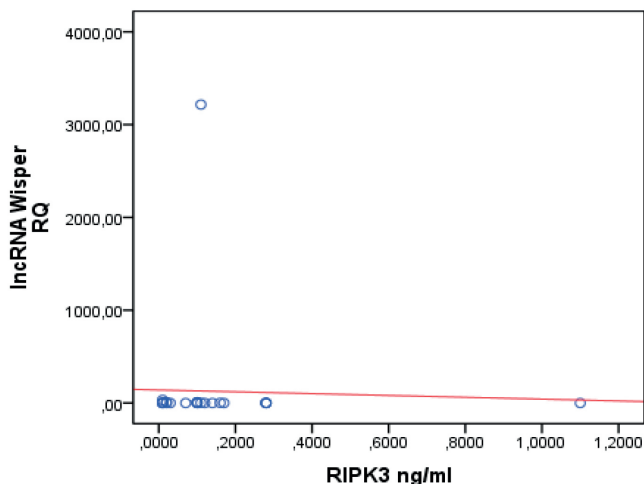
C Тропонин (ng/ml) 24-48 час

Фигура 18. Корелационен анализ на нивата на експресия на lncRNA Wisper и кръвните нива на тропонин

LncRNAWisper и RIPK3

В рамките на изследването се оцени и връзката между плазмената експресия на lncRNAWisper и маркера за некроптоза RIPK3.

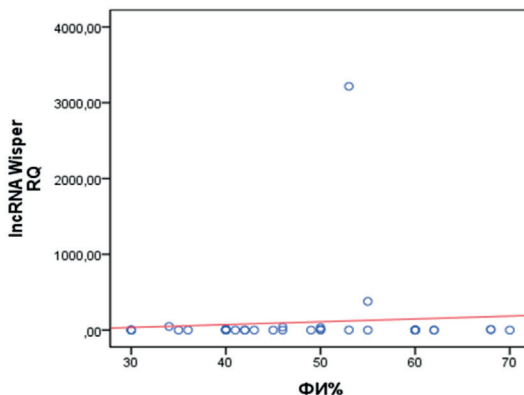
Наблюдава се обратнопропорционална ($\rho = -0.164$), но несигнификантна корелация между плазмената експресия на lncRNAWisper и кръвните нива на RIPK3 ($p = 0.425$) до 12-я час от началото на симптомите. Налице е тенденция високите нива на lncRNA Wisper да отдиференцират пациентите с ниски стойности на RIPK3 в групата на ОМИ (фиг. 19).



Фигура 19. Корелационен анализ за нивата на експресия на LncRNAWisper и RIPK3

LncRNA Wisper и ФИ %

От извършения корелационен тест на Спирмън не се установи корелация между плазмената експресия на lncRNA Wisper и фракцията на изтласкване – ФИ% ($p = 0.967$) сред пациентите с ОМИ (фиг. 20).



Фигура 20. Корелационен анализ за нивата на експресия на LncRNAWisper и ФИ%

7. Плазмена експресия на lncRNA NRF при изследваните групи пациенти

От извършения Шапиро-Уолк тест за нормалност е налице неравномерно разпределение на експресията на LncRNA NRF сред изследваните групи ($p = 0,000$) (табл. 12).

Таблица 12. Разпределение на експресията на lncRNA NRF при болни с ОМИ и болни със СН, сравнени с контролна група

		statistic	df	Sig.
lncRNA_NRF	ОМИ	,430	22	,000
	СН	,342	20	,000
	Контроли	,622	15	,000

За установяване на ролята и клиничното значение на циркулиращата lncRNA NRF при сърдечни заболявания бяха изследвани плазмените нива при болни със сърдечна недостатъчност и болни с остър миокарден инфаркт. Получените резултати категорично потвърждават, че плазмената експресия на lncRNA NRF е повишена както при СН, така и при ОМИ. Средната стойност е най-голяма в групата на пациентите с ОМИ ($\text{mean} = 901,3 \pm 2454,36$), следвана от тези със СН ($\text{mean} = 117,6 \pm 364,3$) и най-ниска в контролната група ($\text{mean} = 0,52 \pm 0,73$) (табл. 13).

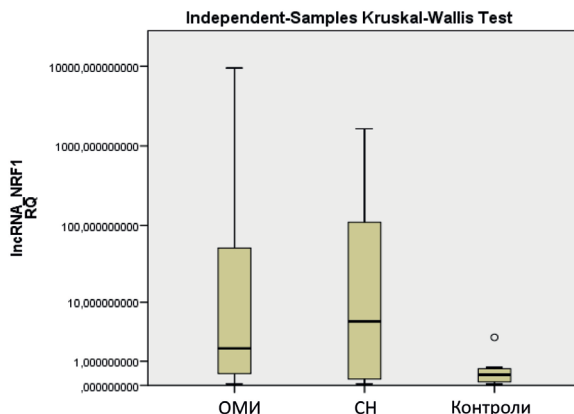
Таблица 13. Средни стойности на lncRNA NRF при пациенти с ОМИ, СН и контролна група

Групи	Mean	Std. Deviation
ОМИ	901,2663439	2454,361291
СН	117,5759681	364,1633650
Контрола	,5244469053	,7253748996

Проведеният Kruskal – Wallis анализ сред трите изследвани групи отчете наличие на сигнификантна разлика в измерената средна стойност на плазмената експресия на Lnc NRF ($p=0.013$). Резултатите са представени в табличен и графичен вид (табл. 14, фиг. 21).

Таблица 14. Kruskal – Wallis анализ на експресията на Lnc NRF сред трите изследвани групи (ОМИ, СН, контролна група)

Total N	57
Test Statistic	8,721a
Degree Of Freedom	2
P	,013



Фигура 21. Box plot анализ, показващ плазмената експресия на lncNRF в групата на пациентите с МИ, СН и контролната група

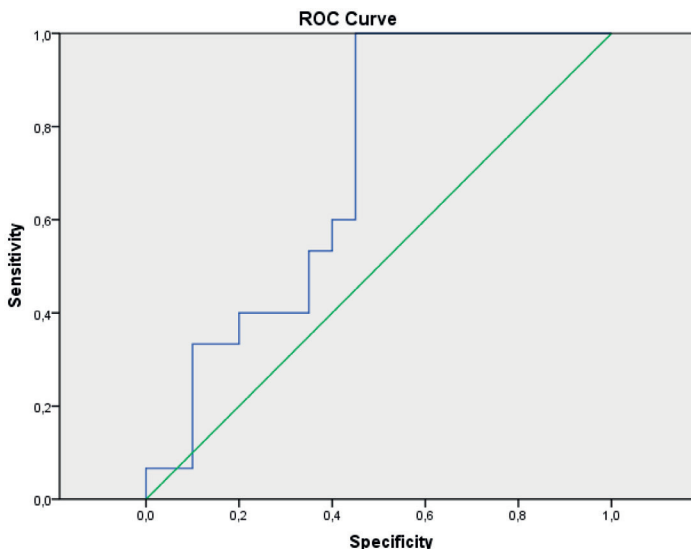
С подгрупов анализ се сравниха средните стойности на плазмената експресия на съответната РНК между отделните групи. Нивото на експресия на lnc RNA NRF е сигнификантно по-високо в групата на пациентите с ОМИ, сравнено с контролната група ($p = 0,012$). Налична е несигнификантна корелация в нивото на плазмената експресия на lncRNA NRF между групата от пациентите със СН и контролната група ($p = 0,077$). Не е отчетена сигнификантна разлика в експресията на изследваната РНК, сравнявайки групата от пациентите със СН и тази с ОМИ ($p = 1,0$).

Таблица 15. Сравнение на плазмената експресия на lncRNA NRF при болни с ОМИ, СН и контролна група

Групи	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	P
контроли-СН	12,650	5,669	2,231	,026	,077
контроли-ОМИ	15,964	5,557	2,873	,004	,012
СН-ОМИ	3,314	5,128	,646	,518	1,000

8. Плазмена експресия на lncRNA NRF пациентите със сърдечна недостатъчност

Според данните от извършения ROC анализ плазмените нива на експресия на lncRNA NRF диференцират пациентите със СН със 73% сензитивност и 55% специфичност спрямо контролната група. Диагностичната акуратност на биомаркерите бе детерминирана, получавайки най-голямата площ под кривата – $AUC = 0.783$ (95% CI: 0.532 – 0.881, $p=0.039$) при оптималните cut-off стойности (фиг. 22).



Фигура 22. Плазмени нива на експресия на lncRNA NRF, диференциращи пациенти със сърдечна недостатъчност от контролната група

- чрез прилагане на Chi-Square тест не се установи разлика в плазмената експресия на lncRNA NRF между мъже и жени ($p = 0,33$);
- сравнителният анализ на плазмената експресия на lncRNA NRF при пациентите със СН не показва сигнификантна разлика, зависеща от възрастта ($P = 0,13$) (табл. 16);

Таблица 16. Анализ на експресията на lncRNA NRF според възрастта в групата със СН

			Години	lncRNA NRF
Spearman's rho	Години	Корелационен коефициент	1,000	,350
		P	.	,130
	lncRNA NRF	Корелационен коефициент	,350	1,000
		P	,130	.

– в проучването се анализира и връзката на lncRNA NRF с ФИ% при пациентите със СН.

Установи се, че експресията на LncRNA NRF не се различава сигнификантно ($p=0.729$) спрямо ФИ% при пациентите със СН (табл. 17).

Таблица 17. Корелационен анализ за връзката между lncRNA NRF и ФИ%

		lncRNA NRF RQ	ФИ%
lncRNA NRF RQ	Pearson корелация P	1	-,083
			,729
ФИ%	Pearson корелация P	-,083	1
		,729	

➤ **Плазмена експресия на lncRNA NRF в групата на пациентите със сърдечна недостатъчност и коморбидитет (захарен диабет, дислипидемия, хронична бъбречна недостатъчност)**

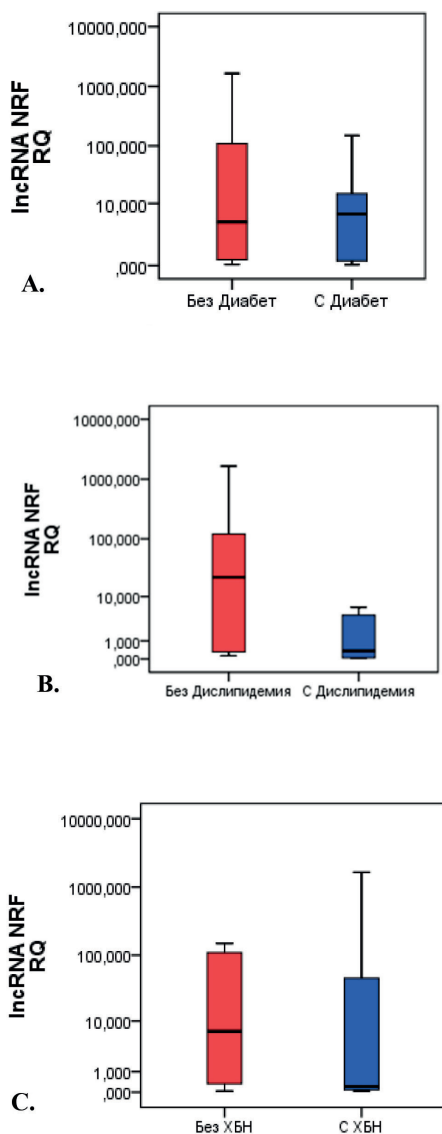
Приблизително една трета от пациентите със СН (39,3%) имат ЗД, като не се установява сигнификантна корелация между плазмената експресия на lncRNA NRF и захарния диабет ($p=0,45$).

При 25% от пациентите със СН, при които е установена дислипидемия, също не се отчете сигнификантна разлика в нивото на експресия на lncRNA NRF (0,503).

По отношение на ХБН, наблюдавана при 17,9% от пациентите със СН, също не се наблюдава значима разлика между плазмената експресия на lncRNA NRF и наличната ХБН ($p=0,33$). Резултатите са представени на таблица 18 и фигура 23 (А, В, С).

Таблица 18. Разпределение на lncRNA NRF по придружаващи заболявания при болните с ОМИ

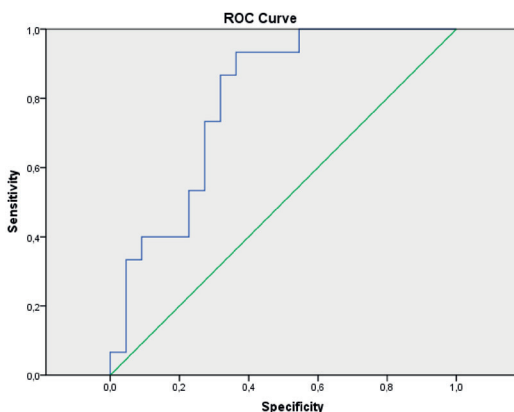
Mann-Whitney – придружаващи заболявания	стойност	P
ЗД	15,000a	,454
Дислипидемия	23,000a	,503
ХБН	44,000a	,331



Фигура 23. Box plot анализ, показващ връзката между плазмената експресия на lncRNA NRF и придружаващите заболявания при пациентите със СН

9. Плазмена експресия на lncRNA NRF пациентите с остър миокарден инфаркт (STEMI)

Според извършения ROC анализ плазмените нива на експресия на lnc RNA NRF отдиференцират пациентите със STEMI спрямо контролната група със сензитивност 73% и специфичност 68%. Диагностичната акуратност на биомаркерите бе детерминирана, получавайки най-голямата площ под кривата – $AUC = 0.794$ (95% CI: 0.650 – 0.938, $p = 0.003$) (фиг. 24), при оптималните cut-off стойности.



Фигура 24. Плазмени нива на експресия на lncRNA NRF, диференциращи пациентите с миокарден инфаркт от контролната група

– няма разлика в експресията на lncRNA NRF според пола ($p = 0,216$) (табл. 19);

Таблица 19. Ниво на експресията на lncRNA NRF според пола

		lncRNA NRF	Пол
lncRNA NRF	Корелация	1	,275
	P		,216
Пол	Корелация	,275	1
	P	,216	

- по отношение на възрастта и експресията на lncRNA NRF също не се наблюдава сигнификантна корелация ($p = 0,56$) при пациентите със STEMI (табл. 20).

Таблица 20. Анализ на експресията на lncRNA NRF според възрастта в групата с ОМИ

			Години	lncRNA NRF
Spearman's rho	Години	Корелационен коефициент	1,000	,131
		P	.	,560
	lncRNA NRF	Корелационен коефициент	,131	1,000
		P	,560	.

➤ **Плазмена експресия на lncRNA NRF в групата на пациентите с остър миокарден инфаркт и коморбидитет (захарен диабет, дислипидемия, хронична бъбречна недостатъчност)**

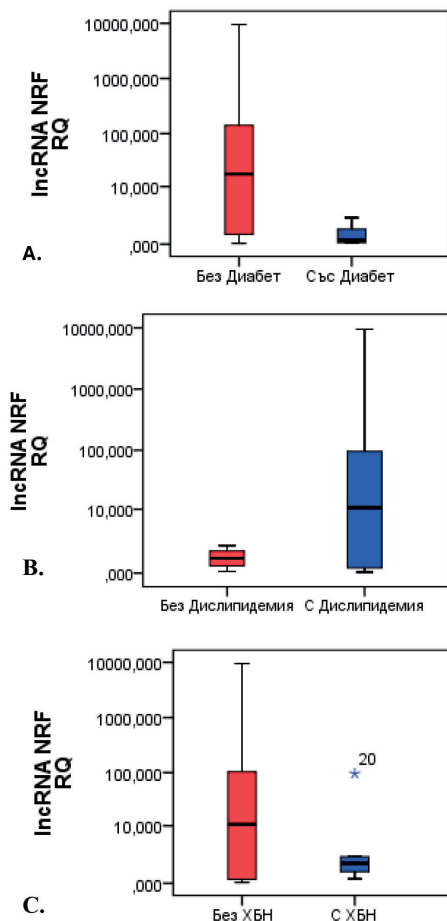
Приблизително една трета от пациентите със STEMI (37.8%) са диагностицирани със ЗД. Не бе установена обаче сигнификантна разлика между плазмената експресия на lncRNA NRF и наличния диабет ($p = 0,761$).

При пациентите в групата на STEMI, при които е установена дислипидемия (25%), също не се наблюдава пряка асоциация между плазмената експресия на lncRNA NRF и дислипидемията ($p = 0,043$).

При анализиране на пациентите с ХБН, които са 21,6% от групата със STEMI, не бе отчетена сигнификантна разлика между плазменото ниво на експресия на lncRNA NRF и ХБН ($p = 0,345$). Резултатите са представени на таблица 21 и фигура 25 (А, В, С).

Таблица 21. Разпределение на lncRNA NRF по придружаващи заболявания при болните с ОМИ

Mann-Whitney – придружаващи заболявания	стойност	P
ЗД	45,500a	,761
Дислипидемия	17,500a	,043
ХБН	22,000a	,345



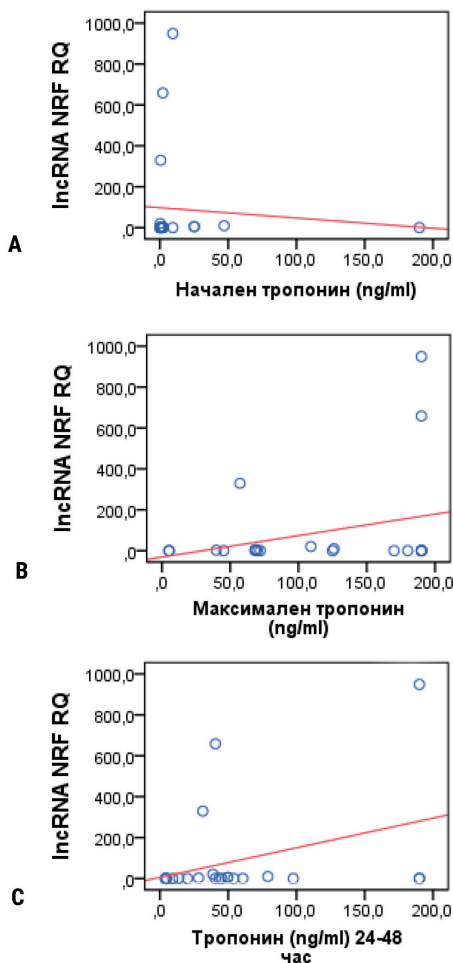
Фигура 25. Box plot анализ, показващ връзката между плазмената експресия на lncRNA NRF и придружаващите заболявания при пациентите с ОМИ

- **Сравнителен анализ на плазмената експресия на lncRNA NRF с лабораторни показатели и фракцията на изтласкване при пациентите с остър миокарден инфаркт**

lncRNA NRF и тропонин

За целите на проучването се потърси зависимост между нивата на експресия на lncRNA NRF, анализирана в кръвна плазма до 12-я час от

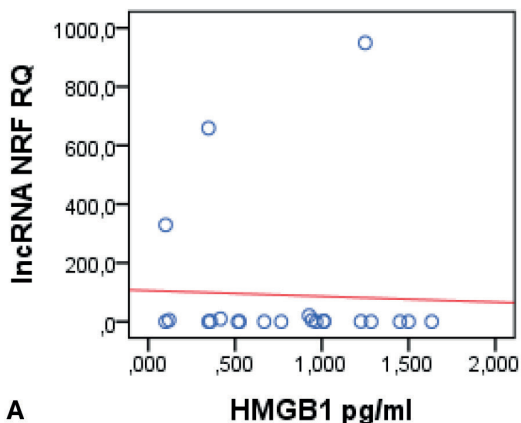
началото на симптомите на ОМИ, и кръвните нива на тропонин до 12-я час от началото на симптомите – начален ($p = 0,5$), максимално измерения тропонин ($p = 0,68$), както и тропонина на 24 – 48-мия час от началото на симптомите на ОМИ ($p = 0,43$), съответно фиг. 26 – А, В, С. Не се установи пряка зависимост между динамиката на измерения тропонин и плазмената експресия на lncRNA NRF при пациентите с ОМИ.



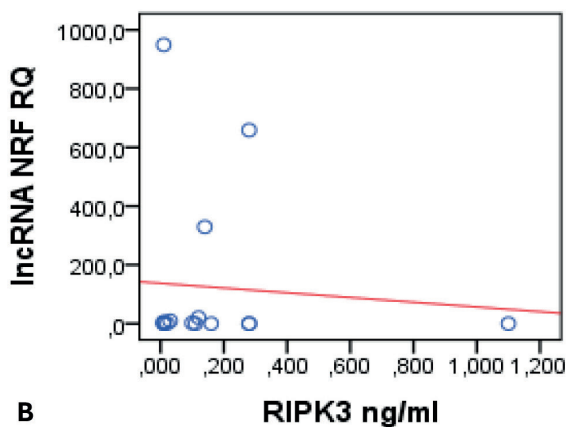
Фигура 26. Корелационен анализ на нивата на експресия на lncRNA NRF и кръвните нива на тропонин

LncRNA NRF и HMGB1, RIPK3

При последващ анализ с тест на Спирмън не се установи корелация между нивата на експресия на lncRNA NRF и кръвните нива на маркера за некроза HMGB1 ($p = 0,215$) и маркера за некроптоза RIPK3 ($p = 0,691$), съответно фиг. 27 А, В.



A

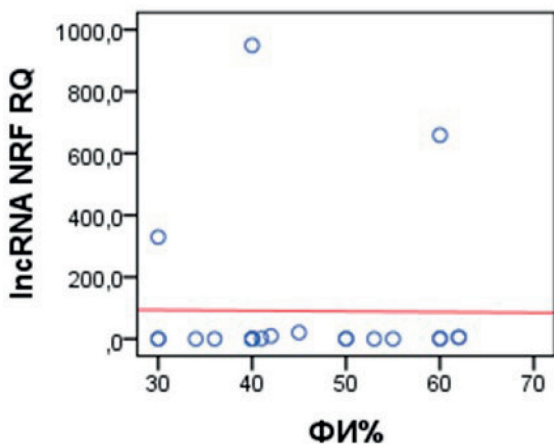


B

Фигура 27. Корелационен анализ на нивата на експресия на lncRNA NRF и HMGB1, RIPK3

LncRNA NRF и ФИ%

От извършения корелационен тест на Спирмън не се установи корелация между плазмената експресия на lncRNA NRF и фракцията на изтласкване – ФИ% ($p = 0,213$) при пациентите с ОМИ (фиг. 28).



Фигура 28. Корелационен анализ на нивата на експресия на lncRNA NRF и ФИ%

IV. ДИСКУСИЯ

1. Експресия на lncRNA Wisper при сърдечна недостатъчност

Развитието на СН е многоетапен процес, който прогресивно влошава качеството на живот. Високата заболяемост и смъртност са свързани със значими здравни разходи (Savarese et al., 2023). През последните десетилетия бяха постигнати съществени успехи както в превенцията, така и в лечението на СН (Shen et al., 2017). Въпреки това глобалната смъртност, дължаща се на СН продължава да расте (Ponikowski et al., 2014).

Прогресирането на СН е свързано с възникването на маладаптивни структурни промени в сърцето. Хипертрофията на кардиомиоцитите и развитието на фиброзна тъкан понижават контрактилитета. Невро-хормоналният отговор на пониженият сърдечен обем е активиране на РААС и симпатиковата нервна система. Всички тези фактори водят до вазоконстрикция, ретенция на течности и прогресия на СН (Yap et al., 2010). Познаването на патофизиологичните аспекти в развитието на СН би могло чрез задълбочен анализ да постави нови, специфични цели в лечението. За дефинирането на такива потенциални цели могат да имат роля дълговерижните некодиращи РНК (Boeckel et al., 2019).

lncRNAs представляват едни от най-забележителните, но малко проучени транскриптоми в сърцето. По време на процесите на растеж, диференциация и матурация на кардиомиоцитите се описани голям набор от молекули на дълговерижни РНКи (Beermann et al., 2018; Devaux et al., 2015; He et al., 2016).

Описани са различни lncRNAs в динамиката на СН, които контролират процеси като сърдечна хипертрофия, апоптоза и фиброза (Han et al., 2023).

Въпреки че не е известен екзактният произход и функция на lncRNAs в циркулацията, те се установяват вариабилно експресирани, със стабилни кръвни нива при пациенти с различни ССЗ и здрави индивиди. Това тяхно свойство определя и възможността за използването им като подходящи биомаркери за диагноза при сърдечносъдови забо-

лявания (Busch et al., 2016). При миокардна увреда те се освобождават в циркулацията, подобно на протеините (Araszkievicz et al., 2014).

В проучване, проведено през 2017 г., Micheletti et al. изследват lncRNA Wisper в сърдечните фибробласти на миши модели с експериментално предизвикан МИ (Micheletti et al., 2017). Освен това в същото проучване lncRNA Wisper е описана и в сърдечната тъкан на 26 пациенти с аортна стеноза, която се свързва с ексцесивно натрупване на фиброзна тъкан. Докладвано е, че експресията на lncRNA Wisper корелира с развитието на сърдечна фиброза както при мишите модели, така и при хора (Micheletti et al., 2017).

В нашето проучване анализирахме потенциалната роля на lncRNA Wisper като възможен маркер за диагнозата на пациенти със сърдечна недостатъчност.

За тази цел бе сравнено нивото на експресия на lncRNA Wisper в плазмата на пациенти със СН и контролна група, като се установиха сигнификантно по-високи нива на експресия на lncRNA Wisper при пациентите със сърдечна недостатъчност в сравнение с контролната група ($p=0.021$). Плазмените нива на експресия на lncRNA Wisper отдиференцират пациентите със СН спрямо контролната група с 80% сензитивност и 67% специфичност, съответно – $AUC = 0.783$ (95% CI: 0.648–0.919), $p=0.002$. Тези резултати показват потенциалната роля на изследваната РНК като чувствителен маркер за отграничаването на пациенти със сърдечна недостатъчност от контролната група.

Сърдечната фиброза се счита за един от основните патоморфологични процеси в развитието на СН (Frangogiannis and Kovacic, 2020).

В проучване (Puls et al., 2020) е установено, че миокардната фиброза е свързана с по-ниската фракция на изтласкаване, оценена при пациенти с аортна стеноза. Миокардната фиброза е значително по-изразена при пациентите с ФИ под 50%.

Освен това сърдечната фиброза корелира положително и със степента на патологичното ремоделиране на лявата камера, както и с клиничната проява на СН. Тя е по-тежко изразена и при пациенти с по-висок NYHA клас СН (Puls et al., 2020).

В нашето проучване са изследвани пациенти със СН с ниска фракция на изтласкване (ФИ<40%) с най-вероятно по-изразена миокардна фиброза. Тази теза е в корелация със световните литературни данни за връзката между lncRNA Wisper и степента на фиброза (Micheletti et

al., 2017). Предполагаме, че по-високите нива на експресия на lncRNA Wisper са свързани с ексцесивното развитие на фиброза, тъй като за тази lncRNA е известно, че регулира пролиферацията и растежа на фибробластите (Micheletti et al., 2017).

Изхождайки от тази теза и получението резултати, в настоящото проучване се демонстрира потенциалното прогностично значение на lncRNA Wisper като маркер за развитието на фиброза при СН.

В нашето проучване не се установи корелация между нивата на експресия на lncRNA Wisper и фракцията на изтласкване ($p = 0,68$). Вероятната причина за това отдаваме на изследваната пациентска популация. Всички изследвани пациенти със СН са с ниска фракция на изтласкване ($\text{ФИ} < 40\%$). При почти всички болни, участвали в нашето проучване, причина за СН е преживян МИ с ремоделиране на ЛК, развит фиброза и потисната систолна функция.

Нашето проучване установи, че придружаващи заболявания и състояния като ЗД, дислипидемия и ХБН не повлияват експресията на lncRNA Wisper в плазмата на изследваните болни. Съответно при захарен диабет ($p = 0,358$), дислипидемия ($p = 0,358$) и хронична бъбречна недостатъчност ($p = 0,358$). Като имаме предвид, че това са най-честите коморбидни състояния, този резултат подкрепя стойността на lncRNA Wisper като потенциален биомаркер за миокардна фиброза, независим от други придружаващи заболявания.

Особен интерес представляваше сравнението на плазмената експресия на lncRNA Wisper между мъже и жени. Известно е, че процесите на ремоделиране на ЛК при жените протичат по-благоприятно и те по-късно развиват клиничните прояви на СН. В получените от нас резултати не се установи разлика според пола на изследваните ($p = 0,469$). Това може да се дължи на факта, че всички включени в изследването болни са с вече напреднала СН и развита миокардна фиброза. От друга страна, тези данни отново потвърждават стойността на lncRNA Wisper като биомаркер, чиито резултати няма да се модулират според пола.

Изненадващи за нас бяха резултатите за плазменото ниво на експресия на lncRNA Wisper според възрастта на пациентите. Установена бе силна, но обратнопропорционална корелация ($p = 0,016$) с корелационен коефициент ($\rho -0,452$). Данните сочат, че по-възрастните пациенти, при които се очаква миокардната фиброза да е по-изразена, експресират lncRNA Wisper в по-малка степен в сравнение с по-младите

пациенти. Интерпретацията на този факт е трудна, особено при липсата на литературни данни. Вероятно това се дължи на развита вече фиброза или на клетъчни промени, свързани с възрастта.

Според наличните литературни данни в медицината досега не е изследвано нивото на експресия на lncRNA Wisper в човешка плазма. Единственото проучване при хора докладва повишена експресия на lncRNA Wisper в сърдечна тъкан при пациенти с аортна стеноза, която води до левокамерна дисфункция и натрупване на фиброзна тъкан. Експресията на тази дълговерижна РНК корелира с повишената синтеза на колаген, която се наблюдава при развитието на фиброза (Micheletti et al., 2017). В тази връзка необходими са допълнителни проучвания с голям брой пациенти за детайлно проучване ролята на lncRNA Wisper в патогенезата на миокардната фиброза, което би отворило нови терапевтични възможности.

За приложение в клиничната практика може да бъде от голямо значение фактът, че lncRNA Wisper се експресира в кръвната плазма, т.е. пробите за изследване се вземат лесно, без инвазивни методи. Интересно би било да се сравни по чувствителност и специфичност с образните методи на изследване като рутинната ехокардиография и все по-популярното ЯМР изследване. Възможно е lncRNA Wisper да има висока стойност като маркер за ранно установяване на процесите на remodelиране и фиброза, преди да са диагностицирани с образните методи на изследване.

2. Експресия на lncWisper при миокарден инфаркт

Въпреки безспорните успехи в лечението на миокардния инфаркт в ерата на интервенционалната кардиология, това заболяване продължава да бъде водеща причина за инвалидизация и смърт в развитите страни (Thiene and Basso, 2010).

Високата честота и социалноикономическите последствия насочват вниманието не само към ранната диагностика и лечение, но и към дългосрочните последици от преживения миокарден инфаркт (Li et al., 2020).

В няколко проучвания е оценена експресията на различни lncRNAs в кръвта и потенциалната им стойност на прогностичен биомаркер при ОМИ (Wang et al., 2019).

Така например в проучването на Wang et al. от 2019 г. е демонстрирана повишената експресия на три дълговерижни РНКи – lncRNA H19, MIAT, MALAT1, при болни с ОМИ (Wang et al., 2019) .

В кръвта на пациенти, преживели ОМИ, е оценен и биомаркерният потенциал на други 5 циркулиращи РНКи, а именно aHIF, ANRIL, KCNQLOT1, MIAT и MALAT1 (Vausort et al., 2014) .

В нашето проучване изследвахме нивата на експресия на lncRNA Wisper в кръвната плазма на болни с ОМИ. До този момент няма литературни данни за друго подобно проучване с lncRNA Wisper. Установихме сигнификантно по-високи стойности на lncRNA Wisper сред групата от пациенти с ОМИ, сравнени с контролната. Плазмената експресия на lncRNA Wisper отдиференцира пациентите със STEMI спрямо контролната група със значителна сензитивност 80% и специфичност 71%, $p=0.002$.

Получените резултати показват, че lncRNA Wisper се повишава през първите 12 часа от началото на ОМИ. Въпреки че може да бъде биомаркер за миокардна некроза, изглежда, че не следва динамиката на плазмените нива на тропонина. Характерната промяна в нивата на тропонина, корелацията му с площта на миокардната некроза, както и надеждността и достъпността на изследването му го правят незаменим биомаркер при ОМИ.

lncRNA Wisper на пръв поглед няма предимства за диагностиката на острия миокарден инфаркт, но може да има стойност в друг аспект. Има доказателства, че lncRNA Wisper е регулатор на фиброзата и има роля в активацията на фибробластите (Micheletti et al., 2017). Ако допуснем, че lncRNA Wisper стартира тези процеси на толкова ранен етап от началото на ОМИ, възможно е тя да има стойността на предиктор за развитие на фиброза и нейната степен в хроничната фаза на миокардния инфаркт със съответната клинична изява.

Независимо от ограничената група пациенти, при които е направено изследването, и необходимостта от по-голяма и по-еднородна група, от сегашните резултати може да се заключи, че Wisper се повишава в първите 12 часа от началото на STEMI.

В нашето проучване установихме интересна сигнификантна корелация ($p = 0.019$) между плазмената експресия на Lnc RNA Wisper и кръвните нива на HMGB1.

HMGB1 е ДНК свързващ протеин, който има роля в различни интра- и екстрацелуларни процеси. Дискутирано е участието на HMGB1 във възпалителни и регенераторни реакции (Klune et al., 2008). HMGB1 се освобождава пасивно от некротичните клетки или активно от клетките на възпалителния отговор и води до повишена продукция на проинфламаторни медиатори и свободни радикали. От друга страна, HMGB1 индуцира хипертрофия и апоптоза в кардиомиоцитите, стимулира активността на сърдечните фибробласти и насърчава пролиферацията и диференциацията на сърдечни стволови клетки, тоест освен вредни ефекти върху кардиомиоцитите, тази молекула притежава и известни регенераторни кардиомиоцитни възможности (Rauci et al., 2019).

Тази теза се потвърждава и в клинични проучвания. Така например няколко проучвания съобщават за потенциална връзка между HMGB1 и миокардната исхемия (Germani et al., 2007). Всички те демонстрират, че високите нива на HMGB1 в условията на миокардна исхемия са свързани с по-лоша прогноза. В проучване на Goldstein et al. от 2006 г. (Goldstein et al., 2006), кръвните нива на HMGB1 на 9 пациенти с остър коронарен синдром са значително по-високи от тези при контролна група доброволци. В друго проучване (Andrassy et al., 2008) се докладват високи плазмени нива на HMGB1 при пациенти със STEMI по време на хоспитализация

В проучването на Kohno et al. от 2009 г. (Kohno et al., 2009), включващо 35 пациенти със STEMI, нивата на HMGB1 в кръвта са били увеличени временно с максимална стойност на 12-я час в рамките на първите 7 дни след хоспитализация. От друга страна, прилагането на HMGB1 след миокарден инфаркт, предизвикан от трайно лигиране на коронарната артерия, подобрява сърдечната функция чрез стимулиране на тъканната регенерация. HMGB1 намалява контрактилитета, индуцира хипертрофия и апоптоза в кардиомиоцитите, стимулира активността на сърдечните фибробласти и насърчава пролиферацията и диференциацията на сърдечни стволови клетки. Интересно е, че поддържането на подходящи ядрени нива на HMGB1 защитава кардиомиоцитите от апоптоза чрез предотвратяване на оксидативния стрес върху ДНК (Kohno et al., 2009).

В клетъчни култури е докладвана връзка между HMGB1 и Lnc RNAs. Някой от РНК-те очевидно контролират синтеза на HMGB1 (Wang and Gan, 2022). Не е ясно последствието от този контрол и клиничното значение поради двойствената функция на HMGB1.

Потенциране на регенерацията или потискане на възпалителния отговор по оста Lnc RNA Wisper-HMGB1 е потенциална бъдеща терапевтична цел.

Както и в групата на пациентите със СН, така и при тези със STEMI нивата на експресия на lnc RNA Wisper също не се повлияват от пол, възраст и придружаващи заболявания като ЗД, ХБН и дислипидемия. Това прави lnc RNA Wisper надежден кандидат за потенциален биомаркер.

Въз основа на получените резултати и анализа на литературните източници можем да обобщим, че lnc RNA Wisper има повишена експресия в кръвната плазма при болни с миокардна фиброза и некроза. Необходимо са допълнителни задълбочени проучвания, които да докажат стойността ѝ на прогностичен биомаркер при ССЗ.

3. Експресия на lncRNA NRF при сърдечна недостатъчност

Анализът на плазмените нива на lncRNA NRF при болните със СН показва подчертана тенденция за повишаване, но не достига сигнификантна разлика спрямо контролната група ($p = 0,077$). Възможна причина за това е известният вече факт, че при различните ССЗ преобладава различен вид клетъчна смърт. Така например при миокарден инфаркт преобладава некроза (Guo et al., 2022) реализирането на която е известно от литературата, че пряко участва Lnc RNA NRF (Huang, 2018). При хронична сърдечна недостатъчност водещата форма на клетъчна смърт е апоптозата (van Empel et al., 2005).

В проучване на Yan, L., et al. (Yan et al., 2020) публикувано през 2020 г., са установени по-високи нива на експресия на lnc RNA NRF при болни със СН, която настъпва след преживян ОМИ, за разлика от СН с неischemична генеза. Повишената експресия на тази РНК в този случай се свързва с експесивната некроза, настъпила при ОМИ (Yan et al., 2020).

Както и при Lnc RNA Wisper, възрастта, пола и придружаващи заболявания – ЗД, ХБН и дислипидемия не повлияват плазмената експресия на lnc RNA NRF.

4. Експресия на lncRNA NRF при миокарден инфаркт

Настоящото проучване оцени и експресията на lncRNA NRF в плазмата на пациенти със STEMI. Най-високи нива на плазмена експресия на lncRNA NRF бяха отчетени в групата на болните със STEMI ($p=0,012$) при липса на корелация между пациентите със СН и ОМИ, както и слаба, но несигнификантна корелация между пациентите със СН и контролната група.

Плазмените нива на експресия на lnc RNA NRF отдиференцират пациентите със STEMI спрямо здравата контролна група със 73% сензитивност и 68% специфичност, $p = 0.003$. Така според извършения анализ повишената експресия на lnc RNA NRF се наблюдава само в групата на STEMI.

LncRNA NRF е описана като РНК, която увеличава степента на програмираната некроза в кардиомиоцити, подложени на исхемична увреда (Wang et al., 2016).

Програмираната некроза е вид клетъчна смърт, която преобладава, когато апоптотичните клетки са неактивни (Cho et al., 2010; Lamkanfi et al., 2007). Множество проучвания сочат, че програмираната некроза е една от основните видове клетъчна смърт по време на остра кардиомиоцитна увреда (Bryant et al., 1998; Kingma and Yellon, 1992; Lissoni et al., 1992).

Вероятното участие на LncRNA NRF в промотирането на този вид клетъчна смърт в условията на ОМИ е потвърдено и в проучването на Wang, K., et al. от 2016 г. при изследване на кардиомиоцити от миши модели. (Wang et al., 2016). Програмираната некроза или некроптозата се медира от специални рецепторни кинази: серин – треонин протеин киназа 1 и 2 (съответно RIPK1 и RIPK3) (Cho et al., 2009; Guerra et al., 1999). Като участник в тази комплексна регулаторна мрежа LncRNA NRF се свързва с miR 873, също регулатор на некрозата, повлиявайки оста miR 873 / RIPK1 RIPK3 със сумарен ефект стимулиране на некрозата. Увеличената експресия на Lnc RNA NRF корелира с големината на инфарктната зона и степента на некрозата, наблюдавана в сърдечната тъкан на миши модели с експериментално предизвикан ОМИ [194]. Обратно, потискането на експресията на lncRNA NRF предизвиква инхибиция на некрозата и намаляване големината на инфарктната зона (Wang et al., 2016).

Описаните резултати са показателни за предиктивната роля на lncRNA NRF в еволюцията на некроптозата.

През 2020 г. е публикувано интересно проучване на Yan, L., et al. (Yan et al., 2020), проведено при хора. В него авторите сравняват експресията на lnc RNA NRF в кръвта на пациенти с ОМИ, които развиват СН, и такива с ОМИ, но без СН. Нивото на експресия на lnc RNA

NRF е сигнификантно по-високо в групата на болните с изявена СН (по клинична симптоматика и ФИ%). Като причина за това се обсъжда по-обширната инфарктна зона, свързана и с по-ексцесивна некроза. В същото проучване се обръща внимание и на по-високите нива на експресия на lncRNA NRF в кръвта на болни с остър коронарен синдром в сравнение с пациенти с хронична коронарна болест (Yan et al., 2020).

Анализът на нашето проучване съвпада с публикуваните до момента проучвания. Нивата на плазмена експресия на lnc RNA NRF са сигнификантно по-високи при болни с ОМИ. Този резултат корелира с известните данни за участието на lnc RNA NRF в регулацията на некроптозата като основен патофизиологичен процес при ОМИ (Guo et al., 2022).

Според нашите резултати не бе установена пряка зависимост между нивото на експресия на lncNRF и наличните ЗД, дислипидемия, както и ХБН.

Лимитиращ фактор на проучването е малкият брой пациентска популация, липсата на проследяване на експресията на lncRNA NRF след провеждане на PCI.

V. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

1. Изводи

Въз основа на проведеното научно проучване можем да направим следните изводи:

1. Плазмената експресия на lncRNA Wisper се повишава значимо при болните със сърдечна недостатъчност III-IV ф.к по NYHA в сравнение с контролната група ($p = 0.021$).
2. Плазмената експресия на lncRNA Wisper се повишава значимо при болните със STEMI до 12-и час от началото на инфаркта, сравнени с контролната група ($p = 0.03$).
3. Възрастта е фактор повлияващ плазмената експресия на lnc RNA Wisper при болните със сърдечна недостатъчност. С повишаване на възрастта плазмената експресия на lnc RNA Wisper сигнификантно намалява ($p = 0.016$).
4. Плазмената експресия на lncRNA Wisper корелира сигнификантно с кръвните нива на HMGB1 при пациенти със STEMI ($p = 0.019$), но не следва динамиката на Troponin I при тези болни, както и тази на маркера за некроптоза RIPK3.
5. Плазмената експресия на lnc RNA NRF се повишава значимо при болните със STEMI до 12ти час от началото на инфаркта, сравнени с контролната група ($p = 0.012$). При болните със СН, обаче плазмената експресия на lnc RNA NRF не достига сигнификантна разлика спрямо контролната група ($p = 0.077$).
6. Фактори като пол и придружаващи заболявания (ЗД, Дислипидемия, ХБН) не повлияват плазмената експресия на двете изследвани дълговерижни РНКи (lnc RNA Wisper и lnc RNA NRF)

2. Приноси

Приноси с научно-теоретичен характер

1. За първи път в България се изследва експресията на lnc RNA Wisper и lncRNA NRF в човешка плазма на болни с остър миокарден инфаркт и болни със сърдечна недостатъчност и резултатите са сравнени с контролна група.
2. Установено е, че плазмената експресия на lncRNA Wisper се повишава при сърдечна недостатъчност, както и при остър миокарден инфаркт.
3. Разкри се, че възрастта влияе върху плазмената експресия на lncRNA Wisper.
4. За първи път в България се докладва потенциалната предиктивна стойност на lncRNA Wisper за развитието на фиброза при пациентите със СН
5. За първи път в България се докладва за наличието на сигнификантна корелация между плазмената експресия на lncRNA Wisper и HMGB1
6. Анализира се повишената експресия на lncRNA NRF при пациентите със STEMI в сравнение с контролна група.

Приноси с научно-практичен характер

1. Докладва се стойността на lncRNA Wisper като биомаркер за миокардна фиброза, който не се повлиява от допълнителни фактори като пол и най-честият коморбидитет придружаващ сърдечните заболявания.
2. Установи се потенциала на lncRNA NRF като биомаркер за остра миокардна некроза.
3. Установените закономерности са основа за бъдещи проучвания, проследяващи изследваните процеси.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Съвременните изследвания разкриват ролята на Lnc RNAs във физиологията и патофизиологията на сложните процеси в миокардната клетка. Регулаторните им функции на различни епигенетични нива и връзката им с генезата на сърдечните заболявания откриват нови, непознати възможности за диагностика и лечение.

Нашето проучване анализира плазмената експресия на две сравнително нови и малко проучени дълговерижни РНК молекули – lncRNA Wisper и lnc RNA NRF, при социалнозначими заболявания като остър миокарден инфаркт и сърдечна недостатъчност.

Установихме, че плазмената експресия на изследваните Lnc RNAs не само се променя при сърдечните заболявания, но има и специфични характеристики. lncRNA Wisper, която е свързана с активиране на фибробластите, е вероятен ранен предиктор за фиброза и е сигнификантно повишена при болните с ОМИ и пациентите със СН.

lncRNA NRF, регулираща некрозата, се експресира в значително по-голяма степен при пациентите със STEMI и наличие на остра миокардна увреда в сравнение с пациентите със СН.

При двете изследвани Lnc RNA беше потвърдено, че не се влияят от пол, възраст и някои придружаващи заболявания.

Аберантната експресия на lncRNA Wisper и lncRNA NRF в кръвната плазма на болни със ССЗ разкрива потенциалното значение на тези дълговерижни РНК молекули като маркери на остра или хронична миокардна увреда.

Тези резултати предлагат възможности за провеждане на по-задълбочени и специфични проучвания, които да докажат стойността им като биомаркери в клиничната практика. Допълнителната информация от проучвания сред по-голям брой болни и стандартизирани методи на изследване биха разкрили потенциала на изследваните от нас lncRNA Wisper и lncRNA NRF като прогностични маркери.

Това би подобрило не само прогнозата на ССЗ, но и едновременно с това ще осигури възможност за създаването на нови терапевтични стратегии.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА

1. Doneva Y, V Valkov, Y Kashlov, G. Mihaylova, A Angelov, M Radanova (2021). CIRCULAR RNA – miRNA MEDIATED INTERACTION IN MYOCARDIALINFARCTION. Journal of IMAV, vol. 27, issue2.
2. Донева Й (2023). ДЪЛГОВЕРИЖНИ НЕКОДИРАЩИ РНК – ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЯ ПРИ СЪРДЕЧНОСЪДОВИ ЗАБОЛЯВАНИЯ. Съречносъдовизаболявания/ Cardiovascular Diseases, Vol. 54, No. 1, 7–15 ref. 63 ref.