



**Медицински университет - Варна  
„Проф. Д-р Параскев Стоянов”**

---

**Факултет „Медицина”  
Катедра „Анатомия и клетъчна биология“**

**СЕРУМНА ЕКСПРЕСИЯ НА  
МИКРОРИБОНУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ  
ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНИ  
ВЪЗПАЛИТЕЛНИ БОЛЕСТИ НА ЧЕРВАТА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане

на научна степен

**„Доктор на науките“**

**Доц. д-р Антония Йорданова Атанасова, д.м.**

**Област на висшето образование: 7. Здравеопазване и спорт,**

**Професионално направление: 7.1. Медицина, Научна специалност:**

**„Гастроентерология“**

**Варна 2021 г.**

Дисертационният труд съдържа 223 стандартни страници и е онагледен с 59 таблици и 55 фигури. Литературната справка включва 574 литературни източника, от които 8 на кирилица и 566 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедрата по Анатомия и клетъчна биология при МУ "Проф. Д-р Параскев Стоянов" – Варна на 21.04.2021

Научно жури:

Проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н

Проф. д-р Людмила Бончева Ангелова, д.м.

Проф. д-р Валерия Игнатова Калева, д.м.

Проф. д-р Борислав Георгиев Владимиров, д.м.

Проф. д-р Красимир Антонов Антонов, д.м.н.

Проф. д-р Деян Тонев Желев, д.м.н.

Проф. д-р Ваня Александрова Герова – Нанкова, д.м.

Резервни членове:

Доц. д-р Миглена Димитрова Георгиева, д.м.

Проф. д-р Ивайло Петров Въжаров, д.м.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на..... от ..... часа в.....на открито заседание на Научното жури.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ - Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ - Варна.

Забележка: В автореферата номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

|   |            |
|---|------------|
| <b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ</b>                          | <b>4</b>   |
| <b>I. УВОД</b>  | <b>7</b>   |
| <b>II. ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И ХИПОТЕЗА</b>                     | <b>8</b>   |
| <b>III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ</b>                         | <b>9</b>   |
| <b>IV. РЕЗУЛТАТИ</b>                                  | <b>14</b>  |
| <b>V. ДИСКУСИЯ</b>                                    | <b>76</b>  |
| <b>VI. ИЗВОДИ</b>                                     | <b>113</b> |
| <b>VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>                                | <b>115</b> |
| <b>VIII. ПРИНОСИ</b>                                  | <b>118</b> |
| <b>IX. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> | <b>119</b> |

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

|                |  |
|----------------|--|
| <b>АДА</b>     | Адалимумаб                                       |
| <b>АЗА</b>     | Азатиоприн                                       |
| <b>БК</b>      | Болест на Крон                                   |
| <b>ГИТ</b>     | Гастро-интестиналният тракт                      |
| <b>ГК</b>      | Глюкокортикоидите                                |
| <b>ГКОЕи</b>   | Глюкокортикоидни отговорни елементи              |
| <b>ГКР</b>     | Глюкокортикоидният рецептор                      |
| <b>ДНК</b>     | Дезоксирибонуклеинови киселини                   |
| <b>ЕИП</b>     | Екстраинтестинални прояви                        |
| <b>ЕМП</b>     | Епително-мезенхимен преход                       |
| <b>ЕЦМ</b>     | Екстрацелуларен матрикс                          |
| <b>иRNA</b>    | Информационни RNA                                |
| <b>ИТМ</b>     | Индекс на телесна маса                           |
| <b>ИУ</b>      | Интестинални усложнения                          |
| <b>КАК</b>     | Колит-асоцииран карцином                         |
| <b>КРК</b>     | Колоректален карцином                            |
| <b>НКР</b>     | Некодирани региони                               |
| <b>ПМН</b>     | Полиморфонуклеарни клетки                        |
| <b>pRNA</b>    | Рибозомни RNA                                    |
| <b>СУЕ</b>     | Скоростта на утаяване на еритроцитите            |
| <b>ТЖСК</b>    | Тотален желязосвързващ капацитет                 |
| <b>tRNA</b>    | Транспортни RNA                                  |
| <b>5-ACA</b>   | 5-аминосалициловата киселина                     |
| <b>ASCAs</b>   | Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies         |
| <b>ATG16L1</b> | Autophagy-related protein 16-1                   |
| <b>AUC</b>     | Area under the Roc curve                         |
| <b>BMP2K</b>   | Bone morphogenetic protein 2 inducible kinase    |
| <b>CARD15</b>  | Caspase recruitment domain-containing protein 15 |
| <b>CDAI</b>    | Crohn's Disease Activity Index                   |
| <b>CLDN</b>    | Claudin  |
| <b>COL4A1</b>  | Collagen type IV alpha 1                         |
| <b>CRP</b>     | C reactive protein                               |
| <b>CT</b>      | Cycle Threshold                                  |
| <b>DAMP</b>    | Damage-associated molecular patterns             |
| <b>ECCO</b>    | European Crohn's Colitis Organization            |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>FBN1</b>                    | Fibrillin 1  |
| <b>FC</b>                      | Fold Change  |
| <b>FCP</b>                     | Fecal calprotectin   |
| <b>FOXO3a</b>                  | Forkhead box O3a   |
| <b>GWAS</b>                    | Genome-wide association study  |
| <b>IBD</b>                     | Inflammatory bowel disease   |
| <b>IBS</b>                     | Irritable bowel syndrome   |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Interferon gamma   |
| <b>IL-1</b>                    | Interleukin 1  |
| <b>IRAK4</b>                   | Interleukin-1 receptor-associated kinase 1   |
| <b>IRGM</b>                    | Immunity-related GTP-ase family M protein  |
| <b>I2 antigen</b>              | Antibody to <i>Pseudomonas fluorescens</i> - associated sequence I2  |
| <b>JAK</b>                     | Janus kinases  |
| <b>miRNAs</b>                  | microribonucleic acids (Зрялата miRNA се означава с главна буква R в miR, а с mir съответния ген и първичния транскрипт, поради което в текста ще се използва само miRNAs) |
| <b>MMPs</b>                    | Matrix metalloproteinases  |
| <b>ncRNA</b>                   | non-coding RNA   |
| <b>NF-AB</b>                   | Nuclear factor kappa-beta of activated B-lymphocytes   |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | Nuclear factor kappa B   |
| <b>NOD2</b>                    | Nucleotide binding oligomerization domain containing 2   |
| <b>NPV</b>                     | Negative predictive value  |
| <b>NR3C1</b>                   | Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 1 (Glucocorticoid Receptor)  |
| <b>OmpC</b>                    | Outer membrane protein C   |
| <b>PAMP</b>                    | Pathogen-associated molecular patterns   |
| <b>pANCAs</b>                  | Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies  |
| <b>PPAR</b>                    | Peroxisome proliferator-activated receptor   |
| <b>PPV</b>                     | Positive predictive value  |
| <b>RT-qPCR</b>                 | Quantitative reverse transcription PCR   |
| <b>PI3K</b>                    | Phosphoinositide 3-kinase  |
| <b>pre-miRNA</b>               | Precursor-miRNAs   |
| <b>RISC</b>                    | RNA-induced silencing complex  |
| <b>RNAi</b>                    | RNA interference   |

|  |  |
|--|--|
| <b>scRNA</b>                               | Small cytoplasmic RNA                              |
| <b>SEMFs</b>                               | Subepithelial myofibroblasts                       |
| <b>SES-CD</b>                              | Simple Endoscopic Score for Crohn Disease          |
| <b>SHIP1</b>                               | SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase 1      |
| <b>siRNAs</b>                              | Small interfering RNAs                             |
| <b>snoRNA</b>                              | Малки ядръцевни RNA                                |
| <b>SNPs</b>                                | Single-nucleotide polymorphism                     |
| <b>SOCS1</b>                               | Suppressor of cytokine signaling-1                 |
| <b>STAT</b>                                | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| <b>Tf%</b>                                 | Transferrin saturation                             |
| <b>TGF</b>                                 | Transforming growth factor                         |
| <b>Th (Th1, Th2, Th3, Th17, Tfh, Treg)</b> | T helper   |
| <b>TIMPs</b>                               | Tissue inhibitors of metalloproteinases            |
| <b>TLR</b>                                 | Toll-like receptors                                |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>             | Tumour necrosis factor $\alpha$                    |
| <b>Treg cells</b>                          | Regulatory T cells                                 |
| <b>UCEIS</b>                               | Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity    |
| <b>VDR</b>                                 | Vitamin D receptor                                 |
| <b>ZO-1</b>                                | Zonula occludens-1                                 |
| <b>25(OH)D</b>                             | Vitamin D  |

## I. УВОД

Възпалителните болести на червата (Inflammatory bowel disease - IBD) са сложни заболявания с неясна патогенеза. В основата на IBD стои хронично възпаление и променени имунни реакции.

Традиционно мониторирането на пациенти с IBD е усложнено до известна степен поради необходимостта от прилагане на повтарящи се инвазивни методи (ендоскопски процедури с биопсии).

Микрорибонуклеиновите киселини (microribonucleic acids – miRNAs) са малки 21-24 нуклеотидни двуверижни RNA молекули, които с помощта на комплекс от белтъци могат да предизвикат нарязване на определени информационни RNAs (иRNAs) молекули, които се явяват техни мишени. Този процес предизвика RNA заглушаване (RNAsilencing) на съответните гени. Тези малки некодиращи белтъци RNAs в клетките се наричат микрорибонуклеинови киселини.

Множество проучвания разкриват, че miRNAs играят съществена роля във всеки един етап от възпалението.

Те участват в диференциацията, регулирането и клетъчната сигнализация на вродената и придобита имунна система, контрола на бариерната функция на ентероцитите, негативната обратна връзка върху различни сигнални пътища, свързани с възпалението, контрола на процесите на апоптоза и автофагия, дисплазия, клетъчна смърт, делене и ангиогенеза.

Данните от литературата остават доста противоречиви поради различните източници на miRNAs (мукоза на колон, илеум, периферна кръв, изпражнения, слюнка), пациентите, от които са взети съответните проби са в стадий на активност или ремисия, с различна давност на заболяването и терапевтични режими.

Като се имат предвид всички тези особености, както и възможностите, които предоставят изследванията в областта на експресията на miRNAs при пациенти с IBD, възникна необходимостта от изследването им сред група от пациенти с болест на Крон (БК) и язвен колит (ЯК) за да се определи ролята на експресията им при диагностика, проследяване и лечение.

## **II. ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И ХИПОТЕЗА**

### **2.1. Цел**

Да се изследва и оцени серумната експресия на някои miRNAs при пациенти с хронични възпалителни болести на червата.

### **2.2. Задачи**

#### **1. Да се изследва серумната експресия на съответните miRNAs:**

\*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 **при пациенти с болест на Крон.**

#### **2. Да се изследва серумната експресия на съответните miRNAs:**

\*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 **при пациенти с язвен колит.**

#### **3. Да се съпоставят данните от експресията на съответните miRNAs:**

\*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 **при пациенти с болест на Крон и при пациенти с язвен колит в различните стадии на болестта.**

#### **4. Да се изготви профил на пациентите с възпалителни болести на червата, който да отразява основните характеристики на болестта според серумната експресия на съответните miRNAs:**

\*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1.



## **5. Да се изследва серумната експресия на съответните miRNAs:**

\*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 **при пациенти с IBD и се сравни със серумните нива на Витамин D.**

### **2.3. Хипотеза**

Серумната експресия на определени miRNAs има връзка с разграничаването на всяка от възпалителни болести на червата - БК и ЯК и може да послужи като неинвазивен биомаркер за оценка на активността на съответното заболяване, мониториране на възпалението и ефективността на избрания терапевтичен подход.

## **III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

### **3.1. Предмет на проучването.**

Изследвани са miRNAs в серум при пациенти с доказани IBD - БК и ЯК в стадий на активност на болестта и в стадий на ремисия, постигната с медикаменти.

### **3.2. Обект на изследване.**

Седемдесет пациенти с IBD, разделени на 2 групи от 35 пациенти, съответно с БК 35 (20 с активна БК и 15 в ремисия) и с ЯК 35 (20 с активен ЯК и 15 в ремисия), преминали през Клиниката по гастроентерология от 04.2019 до 10.2019 г.

В клиничното проучване участват и 30 здрави доброволци на възраст от 18 до 42 години, които нямат анамнеза за заболявания, не приемат никакви медикаменти, и след запознаване с условията за участие в клинично проучване, са подписали информирано съгласие за участие в клиничното изследване.

#### **3.2.1. Конкретни проучвания**

При всички участници е изследвано нивото на серумната експресия на miRNAs: \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2;

\*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контроли: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1

Използваният материал за изследване на miRNAs е кръвен серум. Кръвният серум е получен чрез венепункция със затворена система BD Vacutainer™ SST™ II Advance 5 ml (Becton Dickinson, САЩ), като след пробовземането кръвта е оставена да се съсири на стайна температура за 30 минути, след което е центрофугирана при 1500×g за 15 минути на стайна температура. Серумът е отделен, разпределен на порции от 500 µl и съхранен до извършване на анализа при температура –80 °C.

Изолирането на miRNAs е извършено от 200 µl серум чрез готов търговски набор miRNeasy Serum/Plasma Kit (50), каталожен №217184 (QIAGEN, Германия) според протокола на производителя, като за нормализационен контрол към всяка серумна проба е прибавена 3.5 µl ( $1.6 \times 10^8$  копия на µl) контролна miRNA *C. elegans* miR-39: miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control, каталожен №219610 (QIAGEN, Германия), и пробите са елуирани в 14 µl свободна от RNA-ази вода.

След това всяка от пробите е подложена на обратна транскрипция чрез готов търговски набор miScript II RT Kit (50), каталожен №218161 (QIAGEN, Германия) според протокола на производителя от 2.5 µl елуирана микроRNA в краен обем 10 µl с HiFlex буфер и инкубация при температура 37° C за 60 минути и инактивиране на ензима при температура 95° C за 5 минути.

След това всяка от пробите е подложена на количествена полимеразна реакция в реално време (RealTime PCR) чрез готов търговски набор miScript SYBR Green PCR Kit (200), каталожен номер №218073 (QIAGEN, Германия) и готови праймери miScript Primer Assay (100), каталожен №218300 (QIAGEN, Германия) според протокола на производителя: 1 µl комплементарна ДНК (cDNA) в 10 µl реакции в трикратни повторения за 15 таргетни miRNAs в 384 кладенчеви плаки. Използваните праймери miScript Primer Assay (100), каталожен №218300 (QIAGEN, Германия) са както следва (в скоби е посочен референтния номер): Hs\_miR-28\_1 (MS00003255), Hs\_miR-29c\_1 (MS00003269), Hs\_miR-96\_1 (MS00003360), Hs\_miR-191\_1 (MS00003682), Hs\_miR-451\_1 (MS00004242), Hs\_miR-142-5p\_1 (MS00006671), Hs\_miR-199a\_1 (MS00006741), Hs\_miR-363\_1 (MS00009576), Ce\_miR-39\_1 (MS00019789), Hs\_miR-144\_4 (MS00020328), Hs\_miR-142-3p\_2 (MS00031451), Hs\_miR-155\_2 (MS00031486), Hs\_miR-16\_2 (MS00031493), Hs\_RNU6-2\_11 (MS00033740), Hs\_miR-1228-3p\_1 (MS00042385). Използваните

температурни параметри са както следва: задържане за 15 минути при 95° C за активиране на ензима; 40 цикъла от 15 секунди при 94° C; 30 секунди при 70° 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 55° C за 60 секунди и повишаване до 95° C със скорост +0.05° C за секунда и флуоресцентно отчитане. Анализът е извършен на инструмент QuantStudio Dx на фирмата Applied Biosystems (USA) и е отчетен прагов цикъл (Ct) за всяка проба. Пробите от всички участници IBD пациенти и здрави доброволци са получили идентификационен номер, който не съдържа чувствителни данни за пациента.

За постигане на научно-изследователската цел и за решаване на предварително формулираните задачи, са проучени и анализирани данните от пациенти с IBD, на които са извършени изследвания по стандартния клиничен подход: анамнеза на болестта и съпътстващите заболявания, физикален преглед, абдоминална ехоскопия, КТ ентерография или МР-ентерография (за пациенти с БК и при началото на IBD), илеоколоноскопия, с оглед оценка на ендоскопската активност и морфологично изследване. Въз основа на тези данни е поставена диагнозата БК или ЯК и тези пациенти получават терапия с месалазин, кортикостероиди, азатиоприн или биологично лечение.

Тези 70 IBD пациенти се изследвани **проспективно** в период на активност или ремисия за нива на серумна експресия на miRNA-и:

\*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контроли: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1

Всяка група от изследваните пациенти е детайлизирана по пол, възраст, активност на болестта и прилаганото лечение, наличие на интестинални усложнения (ИУ –субилеус, илеус, фистулизация, абсцедиране, стеноза) и екстраинтестинални прояви (ЕИП –артропатия, стеатоза, хепатит, холелитиаза, желязо дефицитна анемия, дефицит на В12, малабсорбция, еритема нодозум, пиодерма гангренозум, афтозен стоматит, очни прояви). При всички пациенти заболяването е доказано чрез клинични, ендоскопски, образни (трансверзални- абдоминална ехоскопия и/или КТ ентерография, МР-ентерография) и морфологични критерии. Разпределението според локализация (L/E) е извършено чрез Монреалската класификация. Оценка на активността при пациентите с БК

е извършена чрез Crohn's Disease Activity Index (CDAI), при пациентите с ЯК чрез Монреалската класификация за тежест (severity, S) и Partial Mayo score (Ендоскопски Mayo score).

### **3.3. Методи, приложени за реализиране на целта и задачите на изследването:**

#### **3.3.1. Клинико-лабораторни изследвания**

Извършено бе количествено измерване на ниво на серумна експресия на miRNA-и:

\*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_1; Ce\_miR-39\_1 при IBD пациенти с болест на Крон в активност и ремисия, при язвен колит в активност и ремисия и при здрави доброволци.

**3.3.2.** Успоредно с вземането на кръвна проба (по точка А3.1.) са събрани за анализ и съпоставка данните от извършени в рамките на същата седмица от вземането на кръвна проба, стандартни клинико-лабораторни изследвания като: пълна кръвна картина, йонограма, CRP, фекален калпротектин FCP - количествен тест, албумини, серумно желязо, феритин, тотален желязосвързващ капацитет (ТЖСК), трансферинова сатурация (Тf%), ниво на витамин В 12, ниво на витамин D, Clostridium difficile токсин А, В и антиген, антитела спрямо Campilobacter jeuni, антитела спрямо Yersinia enterocolica IgG, IgA; илеоколоноскопия с колоноскоп Olympus CF-H 180 AL Exera II, абдоминална ехоскопия и/или КТ ентерография/МР-ентерография с оглед оценка на обхвата на промените по хода на гастроинтестиналния тракт; хистоморфологично изследване с оглед установяване на степента на морфологичната активност или ремисия, постигната в хода на провежданото лечение.

#### **3.3.3. Статистически методи**

- Дисперсионен анализ (ANOVA)
- Вариационен анализ
- Корелационен анализ
- Регресионен анализ
- Анализ за оценка на риска
- ROC curve анализ

- Прогностичен анализ – prognostic value
- Сравнителен анализ (оценка на хипотези)
- Графичен и табличен метод на изобразяване на получените резултати

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост  $p < 0.05$  при доверителен интервал 95%.

Относителната генна експресия на изследваните таргетни микроRNAи е изчислена чрез  $\Delta\Delta Ct$  метод спрямо референтна микроRNA – нормализационен контрол *C. elegans* miR-39 спрямо референтна проба, представена от средноаритметична стойност на Ct на всички индивиди от контролната група е изчислена чрез Microsoft Office Excel 2016 и е представена като отношение спрямо референтна проба.

$$\Delta Ct = Ct - Ct_0 \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{control}} \quad FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**Където: Ct - Cycle Threshold**

**FC - Fold Change**

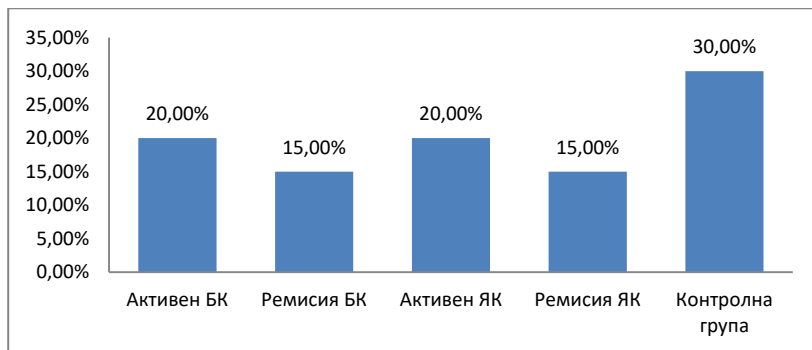
Данните са обработени с SPSS v. 20.0 за Windows.

Клиничното проучване е проведено след получено разрешение от Комисията по етика на научните изследвания при МУ-Варна - **протокол/решение №82, заседание на 28.03.2019 г.** Всички участници в изследването са подписали информирано съгласие.

## IV.РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Характеристика на изследваните групи и опереляне на праговете стойности на miRNAs

За периода април – октомври 2019 г. са проведени изследвания с тринадесет miRNAs и 2 контролни miRNAs при 100 лица, които са разпределени в пет групи (Фиг. 1).



**Фиг. 1. Разпределение на групите, участващи в проучването**

На табл. 1 е представена характеристиката на изследваните пациенти и контролна група от здрави лица. Установена е съществена разлика в моментната възраст при пациентите в изследваните групи ( $p < 0.0001$ ), като пациентите с активна болест са по-млади от тези в ремисия.

Установена е сигнификантна разлика между локализацията на БК в активна фаза и ремисия ( $p < 0.001$ ), като е намерена и силна зависимост между тънкочревната локализация (L1) и активността БК ( $r = 0.826$ ;  $p < 0.001$ ), като тънкочревната локализация в 68.20 % от случаите се свързва с изразена активност на заболяването.

При пациенти с БК установихме статистически значима разлика между формата на протичане и активността на заболяването ( $p < 0.001$ ), като стриктуриращата форма има силна зависимост с активността на БК ( $r = 0.720$ ;  $p < 0.001$ ) и стриктуриращата форма на протичане в 51.8 % от случаите се установява при висока активност на заболяването. Намерена бе съществена разлика в лечебния план на пациентите в активна фаза и

ремисия, както при БК, така и при ЯК ( $p=0.004$ ). При анализа на резултатите установихме, че мъжкият пол носи значително по-висок риск за активна болест в сравнение с жените (OR 3.71 (0.91-15.26)). Установена е умерена зависимост между пола и активността на БК ( $r=0.352$ ;  $p<0.05$ ), като в 12,40 % от случаите активността на БК зависи от пола на пациента.

**Табл. 1. Обща характеристика на изследваните лица**

| Показател                            |                           | Активен БК<br>(n=20)             | Ремисия БК<br>(n=15)           | Активен ЯК<br>(n=20)               | Ремисия ЯК<br>(n=15)                | Контроли<br>(здрaви<br>лица)<br>(n=30) |
|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Възраст, год.<br>(mean±SD,<br>range) | <b>Моментна</b>           | <b>41.1±12.9<br/>(18-71)</b>     | <b>42.1±14.8<br/>(23-75)</b>   | <b>37.9±13.8<br/>(19-73)</b>       | <b>46.4±16.1<br/>(18-71)</b>        | <b>26.2±6.2<br/>(18-42)</b>            |
|                                      | Начало на<br>оплакванията | 32.7±12.0<br>(11-54)             | 35.6±15.4<br>(19-75)           | 29.5±12.1<br>(15-47)               | 42.0                                | -                                      |
|                                      | Поставяне на<br>диагноза  | 35.5±11.6<br>(14-56)             | 36.8±15.1<br>(19-75)           | 30.8±11.5<br>(15-53)               | 35.3±14.3<br>(17-62)                | -                                      |
| Пол                                  | Мъже                      | 13/65.0%                         | 5/33.3%                        | 7/35.0%                            | 8/53.3%                             | 15/50.0%                               |
|                                      | Жени                      | 7/35.0%                          | 10/66.7%                       | 13/65.0%                           | 7/46.7%                             | 15/50.0%                               |
| Локализация БК/ЯК *                  | L1/E1                     | <b>13/65.0%</b>                  | <b>6/40.0%</b>                 | -                                  | 1/6.7 %                             | -                                      |
|                                      | L2/E2                     | -                                | <b>5/33.3%</b>                 | 8/40.0%                            | 3/20.0 %                            | -                                      |
|                                      | L3/E3                     | <b>7/35.0%</b>                   | <b>4/26.7%</b>                 | 12/60.0%                           | 11/73.3 %                           | -                                      |
| Форма на<br>протичане *              | B1                        | <b>5/25.0%</b>                   | <b>12/80.0%</b>                | -                                  | -                                   | -                                      |
|                                      | B2                        | <b>9/45.0%</b>                   | <b>2/13.3%</b>                 | -                                  | -                                   | -                                      |
|                                      | B3                        | <b>5/25.0%</b>                   | <b>1/6.7%</b>                  | -                                  | -                                   | -                                      |
|                                      | B2-B3                     | <b>1/5.0%</b>                    | -                              | -                                  | -                                   | -                                      |
|                                      | Хронично<br>рецидивираща  | -                                | -                              | 13/65.0%                           | 15/100 %                            | -                                      |
|                                      | Хронично<br>персистираща  | -                                | -                              | 7/35.0%                            | -                                   | -                                      |
| Давност на<br>IBD, мес.              | (mean±SD, range)          | 67.4±66.4<br>(3-204)             | 66.3±51.6<br>(3-156)           | 84.7±97.3<br>(1-336)               | 150.8±137.6<br>(12-492)             | -                                      |
| CDAI                                 | Ремисия                   | -                                | <b>15/100.00%</b>              | -                                  | -                                   | -                                      |
|                                      | Лека активност            | <b>9/45.00%</b>                  | -                              | -                                  | -                                   | -                                      |
|                                      | Умерена активност         | <b>11/55.00%</b>                 | -                              | -                                  | -                                   | -                                      |
| S (severity) *                       | Ремисия                   | -                                | -                              | -                                  | <b>15/100%</b>                      | -                                      |
|                                      | Лека активност            | -                                | -                              | <b>7/35.00%</b>                    | -                                   | -                                      |
|                                      | Умерена активност         | -                                | -                              | <b>4/20.00%</b>                    | -                                   | -                                      |
|                                      | Тежка активност           | -                                | -                              | <b>9/45.00%</b>                    | -                                   | -                                      |
| Mayo score<br>Ендоскопски            | Ремисия                   | -                                | -                              | -                                  | <b>15/100%</b>                      | -                                      |
|                                      | Лека активност            | -                                | -                              | <b>3/15.00%</b>                    | -                                   | -                                      |
|                                      | Умерена активност         | -                                | -                              | <b>8/40.00%</b>                    | -                                   | -                                      |
|                                      | Тежка активност           | -                                | -                              | <b>9/45.00%</b>                    | -                                   | -                                      |
| CRP                                  | (mean±SD, range)          | <b>39.2±45.2<br/>(0.2-160.)</b>  | <b>1.8±4.6<br/>(01-8.3)</b>    | <b>22.5±29.8<br/>(0.5-91.9)</b>    | <b>2.3±2.1<br/>(0.1-6.9)</b>        | -                                      |
|                                      | < 5 mg/l                  | <b>5/25.0%</b>                   | <b>11/73.3%</b>                | <b>6/30.0%</b>                     | <b>10/76.9%</b>                     | -                                      |
|                                      | > 5 mg/l                  | <b>15/75.0%</b>                  | <b>4/26.7%</b>                 | <b>14/70.0%</b>                    | <b>3/23.1%</b>                      | -                                      |
| FCP                                  | (mean±SD, range)          | <b>449.1±339.8<br/>(110-910)</b> | <b>112.9±194.5<br/>(2-648)</b> | <b>1054.9±413.7<br/>(300-1800)</b> | <b>198.1±268.7<br/>(12.5-759.0)</b> | -                                      |
|                                      | < 50µg/g                  | <b>7/100%</b>                    | <b>6/60.0%</b>                 | -                                  | <b>4/57.1%</b>                      | -                                      |
|                                      | > 50µg/g                  | -                                | <b>4/40.0%</b>                 | <b>9/100%</b>                      | <b>3/42.9%</b>                      | -                                      |
| Витамин B12                          | (mean±SD, range)          | 193.2±98.9<br>(81-408)           | 228.7±103.9<br>(72-412)        | 334.1±230.6<br>(56-918)            | 282.4±118.7<br>(146-464)            | -                                      |
|                                      | < 156 ng/L                | 7/43.8%                          | 1/14.3%                        | 1/7.7%                             | 1/20.0%                             | -                                      |
|                                      | ≥ 156 ng/L                | 9/56.2%                          | 6/85.7%                        | 12/92.3%                           | 4/80.0%                             | -                                      |

|                           |                        |                                   |                                  |                                  |                                  |   |
|---------------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| Витамин D                 | (mean±SD, range)       | <b>39.5±15.6<br/>(2.76-71.14)</b> | <b>53.0±16.7<br/>(26.4-73.2)</b> | <b>40.3±15.4<br/>(25.7-77.0)</b> | <b>55.2±21.1<br/>(26.4-90.6)</b> | - |
|                           | < 50 nmol/L            | <b>15/75.0%</b>                   | <b>2/28.6%</b>                   | <b>11/73.3%</b>                  | <b>3/37.5%</b>                   | - |
|                           | ≥ 50 nmol/L            | <b>5/25.0%</b>                    | <b>5/71.4%</b>                   | <b>4/26.7%</b>                   | <b>5/62.5%</b>                   | - |
| ИТМ                       | (mean±SD, range)       | 24.1±4.1<br>(16.6-28.9)           | 25.5±6.2<br>(19.1±44.1)          | 24.8±3.6<br>(20.9-34.7)          | 23.9±4.3<br>(16.9-29.6)          | - |
|                           | < 25kg/m <sup>2</sup>  | 10/52.6%                          | 7/50.0%                          | 8/66.7%                          | 5/55.6%                          | - |
|                           | > 25 kg/m <sup>2</sup> | 9/47.4%                           | 7/50.0%                          | 4/33.3%                          | 4/44.4%                          | - |
| Интестинални усложнения   | <b>15/75.00%</b>       | <b>2/13.30%</b>                   | <b>9/45.00%</b>                  | <b>9/60.00%</b>                  | -                                |   |
| Екстраинтестинални прояви | <b>19/95.00%</b>       | <b>8/53.30%</b>                   | <b>19/95.00%</b>                 | <b>9/60.00%</b>                  | -                                |   |
| Лечение                   | 5-ACA                  | <b>1/5.0%</b>                     | <b>1/6.7%</b>                    | <b>7/35.0%</b>                   | -                                | - |
|                           | КС                     | <b>6/30.0%</b>                    | <b>1/6.7%</b>                    | <b>8/40.0%</b>                   | <b>5/33.3%</b>                   | - |
|                           | Имуномодулатори        | <b>1/5.0%</b>                     | <b>1/6.7%</b>                    | <b>2/10.0%</b>                   | <b>9/60.0%</b>                   | - |
|                           | Биологично лечение     | <b>12/60.0%</b>                   | <b>12/80.0%</b>                  | <b>3/15.0%</b>                   | <b>1/6.7%</b>                    | - |

С удебелен шрифт е представено  $p < 0.05$

\*Монреалска класификация

Беше утановена съществена разлика в серумните нива на CRP при пациентите с БК в активност и ремисия ( $p < 0.001$ ). CRP корелира силно правопрпорционално с активността на БК измерена чрез CDAI ( $r = 0.567$ ;  $p < 0.001$ ), като в 29.3% от случаите активността на заболяването се свързва с повишени нива на CRP. Серумните нива на CRP > 5mg/l носят 11 пъти по-висок риск от активност на БК над 150 CDAI (OR=11 (1.895-63.856);  $p = 0.004$ ).

При пациентите с ЯК също се доказва положителна силна зависимост между серумните нива на CRP и активността на заболяването измерена чрез S (severity) ( $r = 0.787$ ;  $p < 0.001$ ) и Ендоскопия Мейо скор ( $r = 0.652$ ;  $p < 0.001$ ).

Анализът на серумните нива на FCP при пациентите с БК и ЯК показва, че има съществена разлика между нивата на FCP при пациентите в активност и тези в ремисия ( $p < 0.001$ ). Беше установена положителна силна зависимост между серумните нива на FCP и CDAI ( $r = 0.728$ ;  $p < 0.001$ ) при пациентите с БК и много силна зависимост с S (severity) ( $r = 0.909$ ;  $p < 0.001$ ) и Ендоскопия Мейо скор ( $r = 0.824$ ;  $p < 0.001$ ) при пациентите с ЯК.

Тъй като липсват валидирани прагови стойности на miRNAs при здрави контроли, такива бяха изчислени за нуждите на настоящото изследване. На табл. 2 са представени праговите стойности (Cut-off) на експресията на изследваните miRNAs за разграничаване на пациенти с IBD от здрави контроли. На тази таблица също така е представена чувствителността и специфичността на съответната miRNAs, както и положителната предсказваща стойност (positive predictive value-PPV) и негативна предсказваща стойност (negative predictive value-NPV).



**Табл. 2. Прагова стойност на miRNAs при здрави индивиди**

| miRNAs        | Cut-off | AUC 95% CI             | P value    | Чувствителност/ Специфичност | PPV    | NPV    |
|---------------|---------|------------------------|------------|------------------------------|--------|--------|
| miR-16_2      | 1.63    | 0.701<br>(0.585-0.817) | 0.001      | 62.9%/63.3%                  | 81.8 % | 55.5 % |
| miR-28_1      | 1,17    | 0.625<br>(0.500-0.749) | 0.049      | 60%/60%                      | 78.6 % | 59.1 % |
| miR-29c_1     | 1.07    | 0.622<br>(0.493-0.751) | 0.054      | 61.4%/63.3%                  | 79.6 % | 58.7 % |
| miR-96_1      | 1.03    | 0.565<br>(0.421-0.708) | 0.308      | 52.9%/53.3%                  | 72.5%  | 67.3 % |
| miR-142-5p_1  | 1.17    | 0.671<br>(0.556-0.785) | 0.007      | 62.9%/63.3%                  | 81.5 % | 56.5 % |
| miR-142-3p_2  | 1.32    | 0.716<br>(0.609-0.823) | 0.001      | 65.7%/66.7%                  | 82.1 % | 54.5 % |
| miR-144_4     | 1.59    | 0.745<br>(0.632-0.858) | <<br>0.001 | 70 %/70%                     | 84.5 % | 50.0 % |
| miR-155_2     | 1.37    | 0.620<br>(0.497-0.742) | 0.059      | 61.4%/63.3%                  | 79.6 % | 58.7 % |
| miR-191_1     | 1.11    | 0.645<br>(0.520-0.771) | 0.022      | 62.9%/63.3%                  | 79.6 % | 58.7 % |
| miR-199a_1    | 0.96    | 0.574<br>(0.444-0.705) | 0.241      | 60%/60%                      | 77.3 % | 61.7 % |
| miR-363_1     | 1.53    | 0.690<br>(0.573-0.808) | 0.003      | 62.9%/63.3%                  | 81.5 % | 56.5 % |
| miR-451_1     | 1.53    | 0.644<br>(0.514-0.774) | 0.023      | 60%/60%                      | 77.7 % | 60.8 % |
| miR-1228-3p_1 | 0.96    | 0.535<br>(0.416-0.654) | 0.575      | 52.9%/53.3%                  | 72.0 % | 68.0 % |

В сиво е представено  $p < 0.05$

**4.2. Изследване на серумната експресия на съответните miRNAs: \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 пациенти с болест на Крон (Задача 1)**

На табл. 3 е представена експресията на изследваните miRNAs при болестта на Крон, като стойностите са сравнени с праговата стойност на експресията, установена при здрави индивиди. Резултатите показват, че всички miRNAs са с повишена експресия, като само при miR-29c\_1 разликата в експресията не е сигнификантна.

**Табл. 3. Експресия на miRNA при пациенти с БК спрямо праговата стойност на контролната група**

| miRNAs        | Прагова стойност | Експресия при БК (mean±SD) | P value | Експресия Повишена/понижена (брой пациенти) |
|---------------|------------------|----------------------------|---------|---|
| miR-16_2      | 1.63             | 3.07±2.11                  | 0.004   | 28↑/7↓                                      |
| miR-28_1      | 1.17             | 5.09±13.9                  | 0.043   | 26↑/9↓                                      |
| miR-29c_1     | 1.07             | 1.69±0.92                  | 0.198   | 25↑/10↓                                     |
| miR-96_1      | 1.03             | 2.54±3.41                  | 0.035   | 20↑/15↓                                     |
| miR-142-5p_1  | 1.17             | 2.42±2.08                  | 0.004   | 24↑/11↓                                     |
| miR-142-3p_2  | 1.32             | 2.69±1.96                  | <0.001  | 24↑/11↓                                     |
| miR-144_4     | 1.59             | 2.86±1.74                  | 0.012   | 26↑/9↓                                      |
| miR-155_2     | 1.37             | 2.66±2.76                  | 0.031   | 24↑/11↓                                     |
| miR-191_1     | 1.11             | 2.16±1.68                  | 0.007   | 24↑/11↓                                     |
| miR-199a_1    | 0.96             | 2.39±3.91                  | 0.025   | 25↑/10↓                                     |
| miR-363_1     | 1.53             | 2.39±1.52                  | 0.048   | 23↑/12↓                                     |
| miR-451_1     | 1.53             | 2.37±1.63                  | 0.031   | 22↑/13↓                                     |
| miR-1228-3p_1 | 0.96             | 1.91±2.20                  | 0.037   | 19↑/16↓                                     |

В сиво е представено  $p < 0.05$

↑ повишена експресия спрямо праговата стойност

↓ понижена експресия спрямо праговата стойност

На табл. 4 е представен сравнителен анализ на средните стойности на експресията на изследваните miRNAs при пациенти с активна БК и пациенти в ремисия, както и промяната в експресията спрямо праговете стойности.

Резултатите от експресията на miR-16\_2 показват, че при активност на БК експресията на miRNA е сигнификантно по-висока от тази в ремисия ( $p=0.022$ ), а от гледна точка праговата стойност се наблюдава по-голям брой на пациентите с повишена експресия, както в активност, така и в ремисия.

При анализ на експресията на miR-28\_1 се наблюдава съществено по-висока експресия при пациентите в ремисия (съответно 6.97 към 3.69,  $p=0.010$ ), но спрямо праговете стойности и в двете групи се наблюдава повишена експресия на miRNA-ата. В стадия на активност броят на пациентите с повишена експресия спрямо тези с понижена е 4:1, а при постигане на ремисия съотношението е 2:1.

**Табл. 4. Експресия на miRNA при пациенти с активна БК спрямо пациенти с БК в ремисия (mean±SD)**

| miRNAs        | Активна БК | Ремисия БК | P value | Експресия Активна БК | Експресия Ремисия БК |
|---------------|------------|------------|---------|----------------------|----------------------|
| miR-16_2      | 3.77±2.38  | 2.14±1.24  | 0.022   | ↑19/1↓               | ↑9/6↓                |
| miR-28_1      | 3.69±5.82  | 6.97±20.43 | 0.010   | ↑16/4↓               | ↑10/5↓               |
| miR-29c_1     | 1.96±1.06  | 1.34±0.50  | 0.044   | ↑15/5↓               | ↑10/5↓               |
| miR-96_1      | 3.40±4.24  | 1.39±1.19  | 0.018   | ↑13/7↓               | ↑7/8↓                |
| miR-142-5p_1  | 2.56±2.01  | 2.22±2.23  | 0.641   | ↑14/6↓               | ↑10/5↓               |
| miR-142-3p_2  | 3.37±2.01  | 1.79±1.53  | 0.017   | ↑17/3↓               | ↑7/8↓                |
| miR-144_4     | 3.15±1.84  | 2.47±1.58  | 0.266   | ↑17/3↓               | ↑9/6↓                |
| miR-155_2     | 2.59±2.02  | 2.75±3.59  | 0.190   | ↑18/2↓               | ↑6/9↓                |
| miR-191_1     | 2.41±1.36  | 1.85±2.04  | 0.034   | ↑14/6↓               | ↑10/5↓               |
| miR-199a_1    | 2.26±1.85  | 2.58±5.67  | 0.221   | ↑16/4↓               | ↑9/6↓                |
| miR-363_1     | 2.68±1.66  | 2.01±1.26  | 0.541   | ↑15/5↓               | ↑8/7↓                |
| miR-451_1     | 2.72±1.79  | 1.92±1.31  | 0.015   | ↑16/4↓               | ↑6/9↓                |
| miR-1228-3p_1 | 2.14±2.47  | 1.61±1.82  | 0.331   | ↑12/8↓               | ↑7/8↓                |

В сиво е представено  $p < 0.05$

↑ повишена експресия спрямо праговата стойност

↓ понижена експресия спрямо праговата стойност

Експресията на miR-29c\_1 при пациенти с активност на БК е сигнификантно по-висока от тези в ремисия (съответно 1.96 към 1.34,  $p=0.044$ ). При сравняване на експресията на miRNAaта според намерената прагова стойност при здрави индивиди се установи, че има съответно 3 пъти и 2 пъти по висока експресия в активност и ремисия.

По отношение на miR-96\_1 също бе намерена по-висока експресия в активната фаза на заболяването сравнена с ремисията ( $p=0.018$ ), но спрямо праговата стойност, при постигната ремисия няма разлика между броя на пациентите в повишена и понижена експресия, а в стадий на активност пациентите с повишена експресия са значително повече от тези с понижена.

Подобни резултати се отчитат и по отношение на експресията на miR-142-3p\_2, където средната стойност е значително по-висока при пациенти с активност на БК. От гледна точка на праговата стойност, броят на лицата с повишена експресия в тази група е приблизително 6 пъти по-голям от тези с понижена експресия.

Експресията на miR-191\_1 е по-висока при пациентите с активност на БК. По отношение на праговата стойност както в активност,

така и в ремисия, броят на пациентите с повишена експресия е 2 пъти по-висок от тези с понижена експресия.

Резултатите от анализа на експресията на miR-451\_1 показват, че тя е повишена при пациентите в активност. По отношение на праговата стойност, броят на пациентите с повишена експресия е 4 пъти по-висок от тези с понижена, докато при пациентите в ремисия преобладава броят на пациентите с понижена експресия.

**Табл. 5. Експресия на miRNAs при пациенти с БК в зависимост от локализацията според Монреалската класификация (mean±SD)**

| miRNAs        | Тънко черво (L1) | Дебело черво (L2) | Тънко и дебело черво (L3) | P value | Експресия |
|---------------|------------------|-------------------|---------------------------|---------|-----------|
| miR-16_2      | 3.54±2.33        | 2.65±0.91         | 2.45±2.02                 | 0.365   | -         |
| miR-28_1      | 8.05±18.57       | 1.27±0.30         | 1.74±1.17                 | 0.041   | ↑L1       |
| miR-29c_1     | 1.92±0.98        | 1.44±0.30         | 1.44±0.92                 | 0.311   | -         |
| miR-96_1      | 1.85±2.00        | 1.24±1.36         | 4.32±5.13                 | 0.010   | ↑L3       |
| miR-142-5p_1  | 3.08±2.54        | 1.78±0.59         | 1.54±1.05                 | 0.011   | ↑L1       |
| miR-142-3p_2  | 3.06±1.93        | 1.73±0.88         | 2.48±2.29                 | 0.378   | -         |
| miR-144_4     | 2.51±1.15        | 3.26±2.09         | 3.26±2.39                 | 0.461   | -         |
| miR-155_2     | 2.51±2.49        | 3.51±5.22         | 2.54±1.84                 | 0.772   | ↑L2       |
| miR-191_1     | 2.63±2.08        | 1.54±0.24         | 1.65±0.98                 | 0.021   | ↑L1       |
| miR-199a_1    | 3.49±5.07        | 0.93±0.12         | 1.16±0.55                 | 0.019   | ↑L1       |
| miR-363_1     | 2.72±1.78        | 2.21±0.90         | 1.93±1.18                 | 0.392   | -         |
| miR-451_1     | 2.49±1.84        | 2.51±1.59         | 2.11±1.36                 | 0.819   | -         |
| miR-1228-3p_1 | 1.97±2.32        | 2.50±2.97         | 1.54±1.74                 | 0.719   | ↑L2       |

В сиво е представено  $p < 0.05$       ↑ повишена експресия

Повишената експресия на miR-28\_1, miR-142-5p\_1, miR-191\_1 и miR-199a\_1 корелира с тънкочревната локализация на БК. С дебелочревната локализация на БК корелират miR-155\_2 и miR-1228-3p\_1. Само при една miRNA (miR-96\_1) високата експресия показва зависимост едновременно с разпространена локализация: тънко и дебело черво (Табл. 5).

Повишената експресия на четири от изследваните miRNAs корелира с формата на протичане на болестта на Крон, като при една miRNA формата на протичане на заболяването се свързва с понижена експресия (Табл. 6). Изявена повишена експресия на miR-142-5p\_1, miR-142-3p\_2 и miR-1228-3p\_1 има при пенетриращата форма на протичане, а

повишената експресия на miR-28\_1 корелира със стриктуриращата форма на заболяването. От друга страна понижената експресия на miR-16\_2 корелира с възпалителната форма на протичане.

**Табл. 6. Експресия на miRNAs при пациенти с БК в зависимост от формата на протичане според Монреалската класификация (mean±SD)**

| miRNAs        | Възпалителна (B1) | Стриктурираща (B2) | Пенетрираща (B3) | P value | Експресия |
|---------------|-------------------|--------------------|------------------|---------|-----------|
| miR-16_2      | 2.43±1.13         | 3.27±2.49          | 3.51±2.14        | 0.01    | ↓B1       |
| miR-28_1      | 1.88±1.49         | 9.49±23.68         | 2.42±0.97        | 0.018   | ↑B2       |
| miR-29c_1     | 1.37±0.52         | 1.92±1.18          | 2.11±1.11        | 0.218   | -         |
| miR-96_1      | 2.26±2.13         | 2.41±2.32          | 3.96±7.07        | 0.679   | -         |
| miR-142-5p_1  | 2.05±2.12         | 2.33±1.90          | 3.67±2.35        | 0.443   | ↑B3       |
| miR-142-3p_2  | 2.03±1.47         | 2.92±1.74          | 3.82±3.05        | 0.016   | ↑B3       |
| miR-144_4     | 3.09±2.19         | 2.26±0.94          | 3.06±1.42        | 0.523   | -         |
| miR-155_2     | 2.87±3.36         | 2.89±2.55          | 1.86±1.06        | 0.848   | -         |
| miR-191_1     | 1.91±1.89         | 2.05±1.62          | 2.90±1.15        | 0.564   | -         |
| miR-199a_1    | 2.40±5.33         | 2.40±2.29          | 2.47±1.32        | 0.999   | -         |
| miR-363_1     | 2.22±1.21         | 2.35±2.01          | 2.52±1.18        | 0.309   | -         |
| miR-451_1     | 2.22±1.26         | 2.08±1.15          | 2.24±1.19        | 0.796   | -         |
| miR-1228-3p_1 | 1.62±1.71         | 1.69±1.44          | 3.34±4.06        | 0.038   | ↑B3       |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

При пет miRNAs се наблюдава връзка между експресията и наличието на интестинални усложнения и екстраинтестинални прояви (Табл. 7). При интестиналните усложнения се наблюдава повишаване на експресията на miR-16\_2 и miR-142-3p\_2 и понишаване на експресията на miR-28\_1. При екстраинтестинални прояви се установи повишаване на експресията на miR-28\_1 и miR-199a\_1 и понижаване на експресията на miR-16\_2, miR-96\_1 и miR-142-3p\_2.

Изследването на зависимостта между CDAI и експресията на miRNAs показва, че този индекс на активност на БК корелира умерено с няколко miRNAs:

- miR-191\_1 - правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.330$ ;  $p < 0.05$ ), която показва, че в 10.89 % от случаите експресията на miR-191\_1 се наблюдава при активност на БК.
- miR-199a\_1 - правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.343$ ;  $p < 0.05$ ), която показва, че в 11.76 % от случаите експресията на miR-

199a\_1 може да се свърже с активност на БК.

- miR-142-3p\_2 - правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.435$ ;  $p=0.01$ ), която показва, че в 18.9 % от случаите експресията на miR-142-3p\_2 може да се свърже с активност на БК.

**Табл. 7. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо наличието на интестинални усложнения и екстраинтестинални прояви (mean±SD)**

| miRNAs        | ИУ        | P value | ЕИП        | P value | Експресия |
|---------------|-----------|---------|------------|---------|-----------|
| miR-16_2      | 3.75±2.72 | 0.008   | 2.85±1.85  | 0.05    | ↑ИУ ↓ЕИП  |
| miR-28_1      | 3.70±6.42 | 0.05    | 6.16±17.63 | 0.006   | ↓ИУ ↑ЕИП  |
| miR-29c_1     | 1.98±0.97 | 0.09    | 1.64±0.86  | 0.67    | -         |
| miR-96_1      | 3.08±4.52 | 0.39    | 2.14±2.13  | 0.04    | ↓ЕИП      |
| miR-142-5p_1  | 2.62±2.15 | 0.59    | 2.30±2.21  | 0.72    | -         |
| miR-142-3p_2  | 3.17±2.11 | 0.02    | 2.40±1.64  | 0.03    | ↑ИУ ↓ЕИП  |
| miR-144_4     | 2.69±1.20 | 0.62    | 2.98±1.97  | 0.62    | -         |
| miR-155_2     | 2.46±2.11 | 0.69    | 2.67±2.91  | 0.98    | -         |
| miR-191_1     | 2.33±1.36 | 0.61    | 2.26±2.01  | 0.68    | -         |
| miR-199a_1    | 2.12±1.46 | 0.71    | 2.83±5.02  | 0.05    | ↑ЕИП      |
| miR-363_1     | 2.23±1.16 | 0.57    | 2.44±1.71  | 0.85    | -         |
| miR-451_1     | 2.38±1.98 | 0.96    | 2.31±1.27  | 0.80    | -         |
| miR-1228-3p_1 | 1.63±1.82 | 0.49    | 1.76±1.84  | 0.63    | -         |

В сиво е представено  $p < 0.05$     ↑ повишена експресия    ↓ понижена експресия

Повишените стойности на експресията на miR-16\_2, miR-96\_1, miR-142-3p\_2 и miR-363\_1 корелират с умерената активност на болестта, измерена чрез CDAI (Табл. 8). В стадий на лека активност само при една miRNA (miR-28\_1) е с понижена експресия, а повишена експресия се наблюдава при miR-142-5p\_1 и miR-155\_2.

Друг показател за оценка на активността на заболяването е CRP. На табл. 9 е предствен сравнителен анализ на средните стойности на серумната експресия на разглежданите miRNAs според нивата на CRP. Резултатите показват, че съществена разлика се установява при три miRNAs, като при две miRNAs повишената серумна експресия корелира с повишени нива на CRP (miR-16\_2 и miR-96\_1), докато при miR-28\_1 повишената експресия се свързва с нормални стойности на CRP. Високата експресия на miR-16\_2 и miR-96\_1 се явява рисков фактор за повишени нива на CRP и съответно активност на БК.

**Табл. 8. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо CDAI (mean±SD)**

| miRNAs        | Ремисия (P) | Лека активност (Л) | Умерена активност (У) | P value | Експресия |
|---------------|-------------|--------------------|-----------------------|---------|-----------|
| miR-16_2      | 2.29±1.17   | 2.39±1.06          | 4.27±3.00             | 0.048   | ↑ У       |
| miR-28_1      | 5.59±17.25  | 2.21±1.45          | 4.65±7.80             | 0.847   | ↓ Л       |
| miR-29c_1     | 1.46±0.67   | 1.43±0.87          | 1.98±1.21             | 0.380   | -         |
| miR-96_1      | 1.83±1.63   | 2.57±2.35          | 4.34±5.36             | 0.011   | ↑ У       |
| miR-142-5p_1  | 2.07±1.92   | 3.06±3.02          | 2.51±1.82             | 0.619   | ↑ Л       |
| miR-142-3p_2  | 1.96±1.49   | 2.94±1.32          | 3.64±2.40             | 0.007   | ↑ У       |
| miR-144_4     | 2.56±1.58   | 3.15±2.92          | 3.08±1.37             | 0.795   | -         |
| miR-155_2     | 2.91±3.44   | 6.08±5.12          | 2.11±1.07             | 0.009   | ↑ Л       |
| miR-191_1     | 1.83±1.79   | 2.07±1.24          | 2.61±1.55             | 0.558   | -         |
| miR-199a_1    | 2.33±4.82   | 1.80±1.32          | 2.14±1.89             | 0.929   | -         |
| miR-363_1     | 2.04±1.11   | 1.71±1.17          | 3.00±2.12             | 0.023   | ↑ У       |
| miR-451_1     | 2.08±1.23   | 1.79±1.12          | 2.86±2.32             | 0.439   | -         |
| miR-1228-3p_1 | 1.47±1.57   | 2.83±2.86          | 2.83±3.16             | 0.093   | -         |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

**Табл. 9. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо CRP (mean±SD)**

| miRNAs        | CRP < 5mg/l | CRP > 5mg/l | P value | Експресия     | OR (95% CI)            |
|---------------|-------------|-------------|---------|---------------|------------------------|
| miR-16_2      | 2.72±1.26   | 3.37±2.63   | 0.034   | ↑ CRP > 5mg/l | 1.78<br>(0.333-9.478)  |
| miR-28_1      | 7.05±19.68  | 3.46±6.06   | 0.015   | ↑ CRP < 5mg/l | 0.50<br>(0.102-2.439)  |
| miR-29c_1     | 1.62±0.77   | 1.77±1.03   | 0.130   | -             | -                      |
| miR-96_1      | 1.17±0.98   | 3.70±4.25   | 0.009   | ↑ CRP > 5mg/l | 2.78<br>(0.699-11.101) |
| miR-142-5p_1  | 2.70±2.55   | 2.17±1.62   | 0.451   | -             | -                      |
| miR-142-3p_2  | 2.65±1.81   | 2.73±2.14   | 0.532   | -             | -                      |
| miR-144_4     | 2.67±1.68   | 3.01±1.82   | 0.577   | -             | -                      |
| miR-155_2     | 3.05±3.37   | 2.34±2.18   | 0.137   | -             | -                      |
| miR-191_1     | 2.24±2.02   | 2.10±1.40   | 0.750   | -             | -                      |
| miR-199a_1    | 2.83±5.46   | 2.03±1.89   | 0.235   | -             | -                      |
| miR-363_1     | 2.26±1.28   | 2.51±1.72   | 0.636   | -             | -                      |
| miR-451_1     | 2.37±1.33   | 2.38±1.89   | 0.782   | -             | -                      |
| miR-1228-3p_1 | 2.33±2.70   | 1.57±1.68   | 0.288   | -             | -                      |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия

**Табл. 10. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо серумните нива на желязо (mean±SD)**

| miRNAs        | Fe дефицит | Fe норма  | P value | Експресия    | OR (95% CI)            |
|---------------|------------|-----------|---------|--------------|------------------------|
| miR-16_2      | 3.47±2.05  | 2.88±2.48 | 0.047   | ↑ Fe дефицит | 7.20<br>(0.738-70.200) |
| miR-28_1      | 2.08±1.11  | 2.38±2.27 | 0.080   | -            | -                      |
| miR-29c_1     | 1.75±0.91  | 1.53±0.83 | 0.258   | -            | -                      |
| miR-96_1      | 2.16±2.45  | 2.47±4.36 | 0.735   | -            | -                      |
| miR-142-5p_1  | 2.66±2.38  | 2.18±2.21 | 0.379   | -            | -                      |
| miR-142-3p_2  | 3.23±1.66  | 2.29±2.35 | 0.029   | ↑ Fe дефицит | 7.07<br>(1.167-42.846) |
| miR-144_4     | 2.89±2.15  | 2.86±1.49 | 0.964   | -            | -                      |
| miR-155_2     | 3.07±3.57  | 1.65±0.81 | 0.006   | ↑ Fe дефицит | 1.54<br>(0.867-2.730)  |
| miR-191_1     | 2.24±1.31  | 1.96±2.09 | 0.530   | -            | -                      |
| miR-199a_1    | 1.86±1.58  | 2.59±5.48 | 0.307   | -            | -                      |
| miR-363_1     | 2.23±0.99  | 2.38±1.44 | 0.148   | -            | -                      |
| miR-451_1     | 2.07±0.98  | 2.55±2.11 | 0.102   | -            | -                      |
| miR-1228-3p_1 | 2.83±3.06  | 1.55±1.45 | 0.020   | ↑ Fe дефицит | 1.38 (0.753-2.547)     |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия

За оценка на анемията при пациентите с БК са използвани серумните нива на желязото и витамин В12. Пациентите с БК в ремисия ( $13.29 \pm 4.64$ ) имат сигнификантно по-високи серумни нива на желязото спрямо пациентите в активност ( $8.67 \pm 4.66$ ) ( $p = 0.012$ ). На табл. 10 е предстен сравнителен анализ на средните стойности на серумната експресия на разглежданите miRNAs според нивата на желязо.

При изследване на серумното ниво на желязо при пациенти с БК се установи, че има увеличена експресия на miR-16\_2 при дефицит ( $p = 0.047$ ), като е намерена обратнопропорционална умерена зависимост ( $r = -0.346$ ;  $p = 0.044$ ), показваща, че в 11.9% от случаите при повишена експресия на miR-16\_2 има дефицит на серумно желязо при пациенти с това заболяване. Високата експресия на miR-16\_2 се явява рисков фактор за дефицит на желязо при пациенти с БК ( $OR = 7.200$  ( $0.738-70.200$ );  $p < 0.05$ ).

При изследване на серумното ниво на желязо при пациенти с БК се установи, че повишената експресията на miR-142-3p\_2 се свързва с дефицит ( $p = 0.029$ ), като е намерена обратнопропорционална умерена зависимост ( $r = -0.419$ ;  $p = 0.024$ ). При 17.5% от при пациенти с БК, повишената експресия на miR-142-3p\_2 се наблюдава при дефицит на желязо. Високата експресия на miR-142-3p\_2 се явява рисков фактор за



дефицит на серумно желязо при пациенти с БК (OR=7.071 (1.167-42.846);  $p < 0.05$ ).

При изследване на серумното ниво на желязо при пациенти с БК се установи, че повишената експресията на miR-155\_2 се свързва дефицит на желязо ( $p=0.006$ ), като е намерена обратнопропорционална умерена зависимост ( $r=-0.307$ ;  $p < 0.01$ ). При 9.4% от при пациенти с БК, повишената експресия на miR-155\_2 се наблюдава при дефицит на желязо. Високата експресия на miR-155\_2 се явява рисков фактор за дефицит на серумно желязо при пациенти с БК (OR=1.54 (0.867-2.730);  $p < 0.05$ ).

При изследване на серумното ниво на желязо при пациенти с БК се установи, че повишената експресията на miR-1228-3p\_1 се свързва с дефицит ( $p=0.020$ ), като е намерена обратнопропорционална слаба зависимост ( $r=-0.205$ ;  $p < 0.05$ ). При 4.2% от при пациенти с БК, повишената експресия на miR-1228-3p\_1 се наблюдава при дефицит на желязо. Високата експресия на miR-1228-3p\_1 се явява рисков фактор за дефицит на серумно желязо при пациенти с БК (OR=1.38 (0.753-2.547);  $p < 0.05$ ).

**Табл. 11. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо серумните нива на витамин B12 (mean±SD)**

| miRNAs        | < 156 ng/l | > 156 ng/l | P value | Експресия    | OR (95% CI)             |
|---------------|------------|------------|---------|--------------|-------------------------|
| miR-16_2      | 3.51±2.65  | 3.78±2.10  | 0.491   | -            | -                       |
| miR-28_1      | 1.58±1.05  | 2.48±1.47  | 0.142   | -            | -                       |
| miR-29c_1     | 1.65±0.71  | 1.89±0.96  | 0.310   | -            | -                       |
| miR-96_1      | 3.08±2.94  | 2.32±4.49  | 0.672   | -            | -                       |
| miR-142-5p_1  | 1.64±1.28  | 3.23±2.76  | 0.044   | ↑ > 156 ng/l | -                       |
| miR-142-3p_2  | 2.25±1.53  | 3.62±2.31  | 0.194   | -            | -                       |
| miR-144_4     | 2.90±1.21  | 3.33±2.04  | 0.314   | -            | -                       |
| miR-155_2     | 1.28±0.46  | 3.52±3.40  | 0.016   | ↑ > 156 ng/l | -                       |
| miR-191_1     | 1.63±0.95  | 2.76±2.15  | 0.163   | -            | -                       |
| miR-199a_1    | 1.66±1.79  | 3.16±5.55  | 0.035   | ↑ > 156 ng/l | 8.40<br>(0.701-100.595) |
| miR-363_1     | 2.45±1.25  | 2.65±1.19  | 0.589   | -            | -                       |
| miR-451_1     | 2.93±2.47  | 2.52±1.31  | 0.500   | -            | -                       |
| miR-1228-3p_1 | 0.88±0.28  | 2.97±3.03  | 0.002   | ↑ > 156 ng/l | 2.50<br>(0.428-14.607)  |

В сиво е представено  $p < 0.05$     ↑ повишена експресия

На табл. 11. е предствен сравнителен анализ на средните

стойности на серумната експресия на разглежданите miRNAs според нивата на витамин В12.

При изследване на серумното ниво на витамин В12 при пациенти с БК се установи, че при увеличена експресия на miR-142-5p\_1 има серумни нива на витамин В12 > 156 ng/l. При 7.4% от при пациенти с БК, при понижена експресия на miR-142-5p\_1 се наблюдава при дефицит на витамин В12. Предвид факта, че miR-142-5p\_1 е свързана с активност на заболяването, която от своя страна води до дефицит на витамин В12, може да се каже, че противоречивите резултати се дължат на малкия брой пациенти и броят на пациентите със свръхекспресия на miR-142-5p\_1 спрямо останалите.

Подобно изкривяване на резултатите се получава и при анализа на miR-155\_2. При изследване на серумното ниво на витамин В12 при пациенти с БК се установи, че увеличената експресията на miR-155\_2 се свързва със серумни нива на витамин В12 > 156 ng/l.

При изследване на серумното ниво на витамин В12 при пациенти с БК се установи, че експресията на miR-199a\_1 е увеличена при нива на витамин В12 > 156 ng/l ( $p=0.035$ ), като е намерена правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.387$ ;  $p<0.05$ ). При 14.9% от при пациенти с БК, понижена експресия на miR-199a\_1 се наблюдава при дефицит на витамин В12. Ниската експресия на miR-199a\_1 се явява рисков фактор за дефицит на витамин В12 при пациенти с БК (OR=8.40 (0.701-100.595);  $p<0.05$ ).

При изследване на серумното ниво на витамин В12 при пациенти с БК се установи, че експресията на miR-1228-3p\_1 е увеличена при нива на витамин В12 > 156 ng/l ( $p=0.002$ ), като е намерена правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.472$ ;  $p<0.05$ ). При 22.3% от при пациенти с БК, понижена експресия на miR-1228-3p\_1 се наблюдава при дефицит на витамин В12. Ниската експресия на miR-1228-3p\_1 се явява рисков фактор за дефицит на витамин В12 при пациенти с БК (OR=2.50 (0.428-14.607);  $p<0.05$ ).

От резултатите представени на табл. 12 се вижда, че индексът на телесната маса (ИТМ) при пациентите с БК корелира със седем от изследваните miRNAs, като при пет miRNAs ИТМ > 25 kg/m<sup>2</sup> има връзка с повишена експресия (miR-16\_2, miR-28\_1, miR-29c\_1, miR-96\_1 и miR-142-3p\_2), а при две miRNAs експресията е понижена (miR-144\_4 и miR-1228-3p\_1).

**Табл. 12. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо ИТМ**

| miRNAs        | ИТМ < 25кг/м <sup>2</sup> | ИТМ > 25 кг/м <sup>2</sup> | P value | Експресия | OR<br>95% CI            |
|---------------|---------------------------|----------------------------|---------|-----------|-------------------------|
| miR-16_2      | 2.49±1.25                 | 3.89±2.64                  | 0.05    | ↑         | 2.154<br>(0.336-13.804) |
| miR-28_1      | 1.95±1.01                 | 8.91±20.22                 | 0.016   | ↑         | 1.042<br>(0.466-2.328)  |
| miR-29c_1     | 1.37±0.722                | 2.08±1.03                  | 0.027   | ↑         | 3.033<br>(0.622-14.785) |
| miR-96_1      | 1.39±1.22                 | 3.60±4.67                  | 0.007   | ↑         | 1.143<br>(0.290-4.507)  |
| miR-142-5p_1  | 2.05±1.88                 | 2.82±2.36                  | 0.311   | -         | -                       |
| miR-142-3p_2  | 2.50±1.47                 | 3.03±2.46                  | 0.457   | ↑         | 1.380<br>(0.694-2.746)  |
| miR-144_4     | 3.08±2.14                 | 2.76±1.32                  | 0.611   | ↓         | 1.806<br>(0.353-9.237)  |
| miR-155_2     | 2.73±3.07                 | 2.24±1.86                  | 0.579   | -         | -                       |
| miR-191_1     | 1.82±0.95                 | 2.61±2.25                  | 0.193   | -         | -                       |
| miR-199a_1    | 2.06±1.49                 | 2.88±5.62                  | 0.565   | -         | -                       |
| miR-363_1     | 2.03±1.06                 | 2.93±1.85                  | 0.093   | -         | -                       |
| miR-451_1     | 2.07±1.30                 | 2.83±1.94                  | 0.197   | -         | -                       |
| miR-1228-3p_1 | 2.09±2.72                 | 1.87±1.71                  | 0.785   | ↓         | 1.481 (0.369-5.946)     |

В сиво е представено  $p < 0.05$

↓↑ посока на експресията

При изследване на ИТМ при пациенти с БК се установи, че повишената експресия на miR-16\_2 корелира слабо правопрпорционално ( $r=0.270$ ;  $p < 0.05$ ) с ИТМ  $> 25 \text{ кг/м}^2$ . При 7.3% от пациентите с БК се наблюдава повишена експресия на miR-16\_2 при пациенти с наднормено тегло и затлъстяване.

При изследване на ИТМ при пациенти с БК се установи, че повишената експресия на miR-29c\_1 корелира умерено правопрпорционално ( $r=0.391$ ;  $p < 0.05$ ) с ИТМ  $> 25 \text{ кг/м}^2$ . При 15.3% от пациентите с БК се наблюдава повишена експресия на miR-29c\_1 при пациенти с наднормено тегло и затлъстяване.

При изследване на експресията на miRNAs и давността на БК установихме, че при праговата стойност за давността на заболяването 50.5 месеца има повишаване на експресията на изследваните miRNAs. При давност на заболяването до 50.5 месеца се наблюдава повишена експресия при miR-96\_1 и miR-155\_2, като при miR-16\_2 и miR-28\_1 се наблюдава повишаване на експресията при давност на БК над 50.5 месеца (Табл. 13).

**Табл. 13. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо давността на заболяването**

| miRNAs        | До 50.5 мес. | Над 50.5 мес. | P value | Експресия     | RR<br>95% CI           |
|---------------|--------------|---------------|---------|---------------|------------------------|
| miR-16_2      | 2.51±1.62    | 3.67±2.44     | 0.011   | ↑ > 50.5 мес. | 1.33<br>(0.251-7.084)  |
| miR-28_1      | 1.81±1.52    | 8.58±19.59    | 0.015   | ↑ > 50.5 мес. | 4.77<br>(0.826-27.562) |
| miR-29c_1     | 1.42±0.75    | 1.98±1.01     | 0.068   | -             | -                      |
| miR-96_1      | 3.24±4.16    | 1.81±2.29     | 0.022   | ↑ < 50.5 мес. | 1.50<br>(0.326-1.364)  |
| miR-142-5p_1  | 2.06±2.17    | 2.79±1.98     | 0.302   | -             | -                      |
| miR-142-3p_2  | 2.42±2.12    | 2.98±1.79     | 0.398   | -             | -                      |
| miR-144_4     | 3.04±1.88    | 2.66±1.61     | 0.533   | -             | -                      |
| miR-155_2     | 3.16±3.44    | 2.14±1.73     | 0.028   | ↑ < 50.5 мес. | 1.20<br>(0.287-5.021)  |
| miR-191_1     | 1.93±1.95    | 2.41±1.36     | 0.409   | -             | -                      |
| miR-199a_1    | 2.46±5.16    | 2.34±2.03     | 0.930   | -             | -                      |
| miR-363_1     | 2.21±1.18    | 2.59±1.84     | 0.475   | -             | -                      |
| miR-451_1     | 2.07±1.13    | 2.69±2.03     | 0.270   | -             | -                      |
| miR-1228-3p_1 | 1.68±2.06    | 2.17±2.38     | 0.521   | -             | -                      |

В сиво е представено  $p < 0.05$

↑ повишена експресия

При изследване на давността на БК се установи, повишената експресия на miR-16\_2 корелира слабо правопрпорционално ( $r=0.261$ ;  $p < 0.05$ ) с давност на БК над 50.5 мес. При 6.8% от пациентите с БК се наблюдава повишена експресия на miR-16\_2 при пациенти с голяма давност на заболяването.

При изследване на давността на БК се установи, повишената експресия на miR-28\_1 корелира слабо правопрпорционално ( $r=0.239$ ;  $p < 0.05$ ) с давност на БК над 50.5 мес. При 5.7% от пациентите с БК се наблюдава повишена експресия на miR-28\_1 при пациенти с голяма давност на заболяването.

Връзка на експресията на изследваните miRNAs с медикаментозното лечение се установи при пет miRNAs (Табл. 14). При лечение с АЗА се установява ниска експресия на miR-28\_1, miR-142-3p\_2 и miR-1228-3p\_1.

Повишената експресия на miR-28\_1 корелира с лечение с АДА (6.34±16.72). По време на лечение с КС се наблюдава повишена експресия на miR-96\_1 (5.82±5.93), а лечението с 5-АСА има връзка с повишената експресия на miR-144\_4 (4.64±5.23).

**Табл. 14. Експресия на miRNAs при пациенти с БК в зависимост от медикаментозното лечение**

| miRNAs        | КС        | 5-АКА     | АДА        | АЗА       | P value | Експресия      |
|---------------|-----------|-----------|------------|-----------|---------|----------------|
| miR-16_2      | 3.11±2.25 | 2.83±0.90 | 3.15±2.26  | 2.28±0.82 | 0.956   | -              |
| miR-28_1      | 2.57±2.32 | 2.77±2.07 | 6.34±16.72 | 1.37±0.27 | 0.049   | ↑ АДА<br>↓ АЗА |
| miR-29c_1     | 1.91±1.45 | 1.38±0.22 | 1.67±0.81  | 1.61±0.12 | 0.894   | -              |
| miR-96_1      | 5.82±5.93 | 1.04±0.74 | 1.83±1.95  | 1.12±0.93 | 0.033   | ↑ КС           |
| miR-142-5p_1  | 2.16±1.61 | 0.82±0.08 | 2.66±2.32  | 1.88±0.37 | 0.640   | -              |
| miR-142-3p_2  | 3.17±2.77 | 3.01±1.49 | 2.64±1.83  | 1.37±0.54 | 0.027   | ↓ АЗА          |
| miR-144_4     | 2.69±1.32 | 4.64±5.23 | 2.83±1.57  | 1.97±0.71 | 0.046   | ↑ 5-АКА        |
| miR-155_2     | 3.39±3.10 | 2.71±2.76 | 2.51±2.85  | 1.94±0.72 | 0.883   | -              |
| miR-191_1     | 2.06±1.57 | 1.87±0.14 | 2.23±1.87  | 2.11±0.86 | 0.991   | -              |
| miR-199a_1    | 2.26±2.38 | 1.24±0.30 | 2.63±4.55  | 1.23±0.53 | 0.936   | -              |
| miR-363_1     | 2.96±2.41 | 2.89±1.19 | 2.26±1.27  | 1.55±0.84 | 0.601   | -              |
| miR-451_1     | 2.25±1.08 | 2.48±1.68 | 2.47±1.84  | 1.44±1.00 | 0.864   | -              |
| miR-1228-3p_1 | 1.96±2.06 | 1.66±1.28 | 2.03±2.42  | 0.60±0.29 | 0.061   | ↓ АЗА          |

В сиво е представено  $p < 0.05$       ↑ повишена експресия      ↓ понижена експресия

**4.3. Изследване на серумната експресия на съответните микро-RNAs: \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контроли: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 при пациентите с язвен колит (Задача 2)**

На табл. 15 са представени резултатите от сравнителния анализ на експресията на изследваните miRNAs и намерените прагови стойности при здрави индивиди.

Статистически значими разлики в стойността на експресията се наблюдават при четири miRNAs, при които има сигнификантно по-високи стойности спрямо праговете.

Статистически значима разлика в експресията на изследваните miRNAs при пациенти с активност на заболяването и в ремисия се наблюдава само при miR-29c\_1, miR-142-5p\_1 и miR-155\_2. При пациентите в активен стадий на заболяването повишена експресия се наблюдава при miR-155\_2. При пациентите в ремисия се установи повишена експресия на miR-29c\_1 и miR-142-5p\_1. По отношение на праговете стойности броят на лицата с повишена експресия при активна болест преобладава miR-142-5p\_1 и miR-155\_2, докато няма разлика в експресията на miR-29c\_1. При пациентите в ремисия не се установява

съществена разлика в броя на лицата в повишена и понижена експресия.

**Табл. 15. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК спрямо праговата стойност на контролната група**

| miRNAs        | Прагова стойност | Експресия при ЯК (mean±SD) | P value | Експресия<br>Повишена/понижена<br>(брой пациенти) |
|---------------|------------------|----------------------------|---------|---|
| miR-16_2      | 1.63             | 1.96±1.34                  | 0.342   | 17↑/18↓   |
| miR-28_1      | 1,17             | 1.20±0.71                  | 0.405   | 18↑/17↓   |
| miR-29c_1     | 1.07             | 1.23±0.66                  | 0.084   | 18↑/17↓   |
| miR-96_1      | 1.03             | 1.65±1.53                  | 0.05    | 17↑/18↓   |
| miR-142-5p_1  | 1.17             | 1.61±1.12                  | 0.05    | 20↑/15↓   |
| miR-142-3p_2  | 1.32             | 1.66±0.90                  | 0.152   | 22↑/13↓   |
| miR-144_4     | 1.59             | 2.16±1.25                  | 0.036   | 23↑/12↓   |
| miR-155_2     | 1.37             | 2.33±4.46                  | 0.045   | 19↑/16↓   |
| miR-191_1     | 1.11             | 1.32±0.81                  | 0.087   | 19↑/16↓   |
| miR-199a_1    | 0.96             | 1.08±0.64                  | 0.502   | 16↑/19↓   |
| miR-363_1     | 1.53             | 1.99±1.55                  | 0.483   | 21↑/14↓   |
| miR-451_1     | 1.53             | 1.72±1.03                  | 0.301   | 20↑/15  |
| miR-1228-3p_1 | 0.96             | 1.15±0.64                  | 0.073   | 17↑/18↓   |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

**Табл. 16. Експресия на miRNAs при пациенти с активна ЯК спрямо пациенти с ЯК в ремисия**

| miRNAs        | Активен ЯК | Ремисия ЯК | P value | Експресия Активен ЯК | Експресия Ремисия ЯК |
|---------------|------------|------------|---------|----------------------|----------------------|
| miR-16_2      | 1.88±1.13  | 2.07±1.62  | 0.405   | ↑9/11↓               | ↑8/7↓                |
| miR-28_1      | 1.23±0.67  | 1.15±0.77  | 0.769   | ↑10/10↓              | ↑8/7↓                |
| miR-29c_1     | 1.11±0.48  | 1.39±0.83  | 0.030   | ↑10/10↓              | ↑8/7↓                |
| miR-96_1      | 1.92±1.68  | 1.32±1.27  | 0.180   | ↑12/8↓               | ↑5/10↓               |
| miR-142-5p_1  | 1.43±0.72  | 1.83±1.49  | 0.007   | ↑12/8↓               | ↑8/7↓                |
| miR-142-3p_2  | 1.77±0.87  | 1.53±0.94  | 0.447   | ↑14/6↓               | ↑8/7↓                |
| miR-144_4     | 2.04±1.18  | 2.34±1.37  | 0.491   | ↑14/6↓               | ↑9/6↓                |
| miR-155_2     | 3.15±5.81  | 1.25±0.74  | 0.012   | ↑12/8↓               | ↑7/8↓                |
| miR-191_1     | 1.29±0.74  | 1.35±0.91  | 0.279   | ↑12/8↓               | ↑7/8↓                |
| miR-199a_1    | 1.12±0.68  | 1.03±0.62  | 0.675   | ↑10/10↓              | ↑6/9↓                |
| miR-363_1     | 2.00±1.81  | 1.97±1.17  | 0.469   | ↑11/9↓               | ↑10/5↓               |
| miR-451_1     | 1.52±0.85  | 1.99±1.22  | 0.179   | ↑11/9↓               | ↑9/6↓                |
| miR-1228-3p_1 | 1.11±0.68  | 1.21±0.60  | 0.715   | ↑10/10↓              | ↑7/8↓                |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

Връзка на експресията на изследваните miRNAs в зависимост от локализацията на ЯК се установява само при две miRNAs (Табл. 17).

Локализацията на ЯК в левия колон (E2) корелира с повишена експресия на miR-96\_1, докато панколитата (E3) може да се свърже с повишената експресия на miR-155\_2.

**Табл. 17. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК в зависимост от локализацията според Монреалската класификация**

| miRNAs        | Проктит (E1) | Ляв колит (E2) | Панколит (E3) | P value | Експресия |
|---------------|--------------|----------------|---------------|---------|-----------|
| miR-16_2      | 2.53         | 1.82±0.91      | 2.01±1.54     | 0.857   | -         |
| miR-28_1      | 1.18         | 0.93±0.48      | 1.33±0.78     | 0.317   | -         |
| miR-29c_1     | 2.43         | 1.01±0.44      | 1.28±0.70     | 0.095   | -         |
| miR-96_1      | 1.42         | 2.52±1.70      | 1.26±1.33     | 0.008   | ↑ E2      |
| miR-142-5p_1  | 2.38         | 1.01±0.54      | 1.86±1.24     | 0.092   | -         |
| miR-142-3p_2  | 1.99         | 1.52±0.74      | 1.71±0.99     | 0.784   | -         |
| miR-144_4     | 3.14         | 2.15±0.88      | 2.14±1.43     | 0.748   | -         |
| miR-155_2     | 2.19         | 1.25±0.96      | 2.86±5.43     | 0.036   | ↑ E3      |
| miR-191_1     | 1.35         | 1.13±0.47      | 1.41±0.93     | 0.653   | -         |
| miR-199a_1    | 0.69         | 1.12±0.90      | 1.08±0.53     | 0.827   | -         |
| miR-363_1     | 2.84         | 1.88±0.97      | 2.00±1.80     | 0.847   | -         |
| miR-451_1     | 1.81         | 1.67±0.68      | 1.75±1.21     | 0.978   | -         |
| miR-1228-3p_1 | 1.42         | 1.08±0.66      | 1.17±0.66     | 0.861   | -         |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия

**Табл. 18. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК в зависимост от формата на протичане според Монреалската класификация**

| miRNAs        | Хронично рецидивираща (XP) | Хронично персистираща (XIP) | P value | Експресия | OR 95% CI           |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|---------|-----------|---------------------|
| miR-16_2      | 1.97±1.43                  | 1.97±0.99                   | 0.988   | -         | -                   |
| miR-28_1      | 1.13±0.69                  | 1.48±0.75                   | 0.234   | -         | -                   |
| miR-29c_1     | 1.21±0.70                  | 1.31±0.49                   | 0.744   | -         | -                   |
| miR-96_1      | 1.65±1.57                  | 1.69±1.46                   | 0.957   | -         | -                   |
| miR-142-5p_1  | 1.61±1.23                  | 1.59±0.59                   | 0.976   | -         | -                   |
| miR-142-3p_2  | 1.51±0.86                  | 2.29±0.85                   | 0.036   | ↑ XIP     | 1.47 (1.102-1.951)  |
| miR-144_4     | 2.16±1.31                  | 2.19±1.14                   | 0.949   | -         | -                   |
| miR-155_2     | 1.54±1.22                  | 5.53±9.56                   | 0.032   | ↑ XIP     | 2.50 (0.413-15.115) |
| miR-191_1     | 1.21±0.72                  | 1.73±1.04                   | 0.032   | ↑ XIP     | 6.92 (0.734-65.259) |
| miR-199a_1    | 0.99±0.52                  | 1.42±0.98                   | 0.026   | ↑ XIP     | 3.86 (0.634-23.531) |
| miR-363_1     | 1.82±1.19                  | 2.66±2.57                   | 0.021   | ↑ XIP     | 1.13 (0.296-4.277)  |
| miR-451_1     | 1.74±1.09                  | 1.65±0.83                   | 0.825   | -         | -                   |
| miR-1228-3p_1 | 1.12±0.59                  | 1.28±0.84                   | 0.560   | -         | -                   |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия

Хронично персистиращата форма, без формиране на ясно обособена ремисия на заболяването, корелира с високата експресия на

miR-142-3p\_2, miR-155\_2, miR-191\_1, miR-199a\_1 и miR-363\_1.

Наличието на интестинални усложнения и екстраинтестинални прояви корелира с осем от изследваните miRNAs (Табл. 19). Интестиналните усложнения имат връзка с повишената експресия на miR-16\_2, miR-144\_4, miR-363\_1 и miR-451\_1 и с понижената експресия на miR-142-3p\_2 и miR-155\_2. Екстраинтестиналните прояви корелират с повишената експресия на miR-16\_2, miR-142-5p\_1, miR-142-3p\_2, miR-144\_4, miR-155\_2, miR-191\_1, miR-363\_1 и miR-451\_1.

**Табл. 19. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК спрямо наличието на интестинални усложнения и екстраинтестинални прояви (mean±SD)**

| miRNAs        | ИУ        | P value | ЕИП       | P value | Експресия  |
|---------------|-----------|---------|-----------|---------|------------|
| miR-16_2      | 2.19±1.51 | 0.038   | 2.08±1.45 | 0.035   | ↑ ИУ ↑ ЕИП |
| miR-28_1      | 1.26±0.83 | 0.588   | 1.26±0.75 | 0.279   | -          |
| miR-29c_1     | 1.24±0.68 | 0.932   | 1.24±0.67 | 0.832   | -          |
| miR-96_1      | 1.49±1.46 | 0.505   | 1.62±1.57 | 0.776   | -          |
| miR-142-5p_1  | 1.60±1.27 | 0.990   | 1.69±1.20 | 0.039   | ↑ ЕИП      |
| miR-142-3p_2  | 1.49±0.93 | 0.026   | 1.72±0.93 | 0.049   | ↓ ИУ ↑ ЕИП |
| miR-144_4     | 2.36±1.38 | 0.037   | 2.26±1.34 | 0.041   | ↑ ИУ ↑ ЕИП |
| miR-155_2     | 1.52±1.01 | 0.027   | 2.63±4.95 | 0.046   | ↓ ИУ ↑ ЕИП |
| miR-191_1     | 1.32±0.81 | 0.970   | 1.39±0.87 | 0.028   | ↑ ЕИП      |
| miR-199a_1    | 1.03±0.58 | 0.614   | 1.13±0.68 | 0.476   | -          |
| miR-363_1     | 2.13±1.32 | 0.039   | 2.04±1.63 | 0.017   | ↑ ИУ ↑ ЕИП |
| miR-451_1     | 2.08±1.17 | 0.032   | 1.80±1.11 | 0.038   | ↑ ИУ ↑ ЕИП |
| miR-1228-3p_1 | 1.12±0.65 | 0.758   | 1.17±0.65 | 0.685   | -          |

В сиво е представено p<0.05 ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

Изследването на влиянието на експресията на miRNAs и тежестта на ЯК според Монреалската класификация (S) е представено на табл. 20. При пациенти в ремисията и лека активност не се установява корелация с експресията на изследваните miRNAs. Умерената активност корелира с повишената експресия на miR-16\_2, miR-96\_1, miR-199a\_1 и miR-363\_1. Тежката активност корелира с повишената експресия на miR-155\_2 и miR-1228-3p\_1 и понижената експресия на miR-29c\_1.

Изследването на влиянието на експресията на miRNAs и ендоскопската активност според частичния Мейо скор е представено на табл. 21. При пациентите с ЯК ремисията корелира с повишената експресия на miR-142-5p\_1. Умерената активност има връзка с повишената експресия на miR-155\_2 и понижената активност на miR-144\_4.



**Табл. 20. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК в зависимост от тежестта на заболяването според Монреалската класификация (S) (mean±SD)**

| miRNAs        | Ремисия (P) | Лека активност (Л) | Умерена активност (У) | Тежка активност (Т) | P value | Експресия |
|---------------|-------------|--------------------|-----------------------|---------------------|---------|-----------|
| miR-16_2      | 1.45±1.11   | 2.42±1.65          | 3.02±0.08             | 1.38±0.89           | 0.043   | ↑ у       |
| miR-28_1      | 0.97±0.56   | 1.18±0.81          | 1.32±0.28             | 1.36±0.84           | 0.708   | -         |
| miR-29c_1     | 1.07±0.43   | 1.53±0.86          | 1.56±0.30             | 0.84±0.33           | 0.044   | ↓ Т       |
| miR-96_1      | 1.05±0.99   | 2.03±1.77          | 3.29±1.86             | 1.01±0.75           | 0.030   | ↑ у       |
| miR-142-5p_1  | 1.85±1.63   | 1.69±1.14          | 1.69±0.57             | 1.26±0.78           | 0.713   | -         |
| miR-142-3p_2  | 1.22±0.72   | 1.78±0.94          | 1.88±0.36             | 1.77±1.10           | 0.485   | -         |
| miR-144_4     | 2.27±1.86   | 2.41±0.73          | 2.34±0.62             | 1.71±1.45           | 0.607   | -         |
| miR-155_2     | 1.11±0.76   | 1.33±1.03          | 1.63±0.48             | 4.92±7.93           | 0.019   | ↑ Т       |
| miR-191_1     | 1.15±0.62   | 1.35±0.92          | 1.49±0.29             | 1.33±0.98           | 0.916   | -         |
| miR-199a_1    | 0.94±0.43   | 1.11±0.66          | 1.74±1.24             | 0.89±0.34           | 0.015   | ↑ у       |
| miR-363_1     | 1.45±0.85   | 2.28±1.37          | 3.40±3.05             | 1.47±1.14           | 0.012   | ↑ у       |
| miR-451_1     | 1.72±1.19   | 1.98±1.15          | 2.18±0.51             | 1.21±0.77           | 0.252   | -         |
| miR-1228-3p_1 | 1.19±0.57   | 0.94±0.57          | 0.75±0.21             | 1.56±0.73           | 0.045   | ↑ Т       |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

**Табл. 21. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК в зависимост от частичния Мейо скор (mean±SD)**

| miRNAs        | Ремисия (P) | Лека активност (Л) | Умерена активност (У) | Тежка активност (Т) | P value | Експресия |
|---------------|-------------|--------------------|-----------------------|---------------------|---------|-----------|
| miR-16_2      | 2.33±2.06   | 2.01±1.02          | 1.74±1.23             | 1.80±1.12           | 0.829   | -         |
| miR-28_1      | 1.26±0.96   | 1.14±0.55          | 1.21±0.78             | 1.21±0.67           | 0.989   | -         |
| miR-29c_1     | 1.57±1.04   | 1.27±0.49          | 0.97±0.52             | 1.12±0.44           | 0.314   | -         |
| miR-96_1      | 1.45±1.52   | 1.23±0.91          | 2.18±1.98             | 1.84±1.72           | 0.599   | -         |
| miR-142-5p_1  | 2.16±1.65   | 1.59±1.17          | 1.21±0.64             | 1.48±0.76           | 0.039   | ↑ P       |
| miR-142-3p_2  | 1.69±1.18   | 1.54±0.64          | 1.69±1.19             | 1.74±0.69           | 0.969   | -         |
| miR-144_4     | 2.02±0.96   | 2.74±1.48          | 1.39±0.76             | 2.36±1.38           | 0.015   | ↓ у       |
| miR-155_2     | 1.22±0.79   | 1.35±0.85          | 4.82±9.05             | 2.23±1.76           | 0.035   | ↑ у       |
| miR-191_1     | 1.58±1.11   | 1.17±0.48          | 1.51±1.10             | 1.07±0.39           | 0.499   | -         |
| miR-199a_1    | 1.17±0.79   | 1.01±0.42          | 1.02±1.05             | 1.13±0.25           | 0.943   | -         |
| miR-363_1     | 2.23±1.52   | 1.74±0.65          | 1.58±1.39             | 2.42±2.36           | 0.663   | -         |
| miR-451_1     | 1.99±1.51   | 2.02±0.87          | 1.16±0.75             | 1.65±0.83           | 0.293   | -         |
| miR-1228-3p_1 | 1.21±0.51   | 1.05±0.66          | 1.35±0.81             | 1.03±0.62           | 0.738   | -         |

В сиво е представено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

На табл. 22 е предствен сравнителен анализ на средните стойности на серумната експресия на разглежданите miRNAs според нивата на желязо. Резултатите показват, че четири miRNAs са с повишена експресия при дефицит на желязо, а miR-29c\_1 има повишена експресия

при нормални серумни нива на желязо.

**Табл. 22. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК спрямо серумните нива на желязо (mean±SD)**

| miRNAs        | Fe дефицит | Fe норма  | P value | Експресия    | OR (95% CI)        |
|---------------|------------|-----------|---------|--------------|--------------------|
| miR-16_2      | 1.85±1.18  | 1.73±1.18 | 0.782   | -            | -                  |
| miR-28_1      | 1.29±0.70  | 1.03±0.48 | 0.034   | ↑ Fe дефицит | 1.07 (0.527-2.161) |
| miR-29c_1     | 1.06±0.40  | 1.26±0.74 | 0.023   | ↑ Fe норма   | 2.00 (0.456-8.777) |
| miR-96_1      | 1.83±1.65  | 1.46±1.51 | 0.531   | -            | -                  |
| miR-142-5p_1  | 1.67±1.06  | 1.41±1.06 | 0.506   | -            | -                  |
| miR-142-3p_2  | 1.85±0.94  | 1.47±0.59 | 0.244   | -            | -                  |
| miR-144_4     | 1.45±0.79  | 1.12±0.56 | 0.033   | ↑ Fe дефицит | 1.20 (0.267-5.400) |
| miR-155_2     | 3.85±6.57  | 1.13±0.87 | 0.014   | ↑ Fe дефицит | 2.05 (0.954-4.418) |
| miR-191_1     | 1.45±0.79  | 1.12±0.56 | 0.206   | -            | -                  |
| miR-199a_1    | 1.08±0.44  | 1.09±0.76 | 0.608   | -            | -                  |
| miR-363_1     | 2.19±2.08  | 1.67±1.06 | 0.049   | ↑ Fe дефицит | 1.17 (0.269-5.054) |
| miR-451_1     | 1.49±0.98  | 1.50±0.70 | 0.994   | -            | -                  |
| miR-1228-3p_1 | 1.26±0.69  | 1.09±0.63 | 0.460   | -            | -                  |

В сиво е представено  $p < 0.05$

↑ повишена експресия

При изследване на серумното ниво на желязо при пациенти с ЯК се установи, че увеличената експресия на miR-28\_1 се свързва с дефицит ( $p=0.034$ ), като е намерена обратнопропорционална умерена зависимост ( $r=-0.324$ ;  $p < 0.05$ ). При 10.5% от пациентите с ЯК, повишената експресия на miR-28\_1 се наблюдава при дефицит на желязо. Високата експресия на miR-28\_1 се явява рисков фактор за дефицит на серумно желязо при пациенти с ЯК (OR=1.07 (0.527-2.161);  $p < 0.05$ ).

При изследване на серумното ниво на желязо при пациенти с ЯК се установи, че експресията на miR-155\_2 е увеличена при дефицит ( $p=0.014$ ), като е намерена обратнопропорционална слаба зависимост ( $r=-0.297$ ;  $p < 0.05$ ). При 8.8% от пациентите с ЯК, повишената експресия на miR-155\_2 се наблюдава при дефицит на желязо. Високата експресия на miR-155\_2 се явява рисков фактор за дефицит на серумно желязо при пациенти с ЯК (OR=2.05 (0.954-4.418);  $p < 0.05$ ).

При изследване на серумното ниво на желязо при пациенти с ЯК се установи, че увеличената експресия на miR-363\_1 корелира с дефицит ( $p=0.049$ ), като е намерена обратнопропорционална слаба зависимост ( $r=-0.228$ ;  $p < 0.05$ ). При 5.2% от пациентите с ЯК, повишената експресия на miR-363\_1 се наблюдава при дефицит на желязо. Високата експресия на miR-363\_1 се явява рисков фактор за дефицит на серумно желязо при

пациенти с ЯК (OR=1.17 (0.269-5.054); p<0.05).

**Табл. 23. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК спрямо серумните нива на витамин В12**

| miRNAs        | < 156 ng/l | > 156 ng/l | P value | Експресия    | OR (95% CI)           |
|---------------|------------|------------|---------|--------------|-----------------------|
| miR-16_2      | 1.87±1.77  | 1.93±0.96  | 0.168   | -            | -                     |
| miR-28_1      | 1.23±0.69  | 1.28±0.68  | 0.928   | -            | -                     |
| miR-29c_1     | 1.51±0.60  | 1.21±0.57  | 0.487   | -            | -                     |
| miR-96_1      | 2.00±1.70  | 1.44±1.37  | 0.599   | -            | -                     |
| miR-142-5p_1  | 1.44±0.96  | 1.35±0.65  | 0.577   | -            | -                     |
| miR-142-3p_2  | 1.52±0.69  | 1.78±0.85  | 0.689   | -            | -                     |
| miR-144_4     | 1.65±0.23  | 2.18±1.12  | 0.104   | -            | -                     |
| miR-155_2     | 0.72±0.84  | 3.30±6.41  | 0.015   | ↑ > 156 ng/l | -                     |
| miR-191_1     | 1.28±0.73  | 1.36±0.80  | 0.892   | -            | -                     |
| miR-199a_1    | 2.16±1.98  | 0.95±0.34  | <0.001  | ↑ < 156 ng/l | 2.0<br>(0.053-18.915) |
| miR-363_1     | 1.70±0.01  | 2.16±1.82  | 0.233   | -            | -                     |
| miR-451_1     | 1.37±0.13  | 1.72±0.86  | 0.148   | -            | -                     |
| miR-1228-3p_1 | 0.79±0.39  | 1.30±0.71  | 0.231   | -            | -                     |

В сиво е представено p<0.05                      ↑ повишена експресия

На табл. 23 е предствен сравнителен анализ на средните стойности на серумната експресия на разглежданите miRNAs според нивата на Витамин В12.

Увеличената експресия на miR-155\_2 при ниво на витамин В12>156 ng/l се дължи на свръхекспресията на един пациент.

При изследване на серумното ниво на витамин В12 при пациенти с ЯК се установи, че експресията на miR-199a\_1 е увеличена при дефицит на витамин В12 (p<0.001), като е намерена обратнопропорционална умерена зависимост (r=-0.302; p<0.05). При 9.1% от пациентите с ЯК, повишена експресия на miR-199a\_1 се наблюдава при дефицит на витамин В12. Високата експресия на miR-199a\_1 се явява рисков фактор за дефицит на витамин В12 при пациенти с ЯК (OR=2.0 (0.053-18.915); p<0.05).

Спрямо ИТМ > 25 kg/m<sup>2</sup> се установява повишена експресия на miR-144\_4, докато при miR-16\_2, miR-96\_1, miR-142-5p\_1 и miR-363\_1 се наблюдава понижаване на експресията (Табл. 24).

**Табл. 24. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК спрямо ИТМ (mean±SD)**

| miRNAs        | ИТМ < 25кг/м <sup>2</sup> | ИТМ > 25 кг/м <sup>2</sup> | P value | Експресия | OR 95% CI           |
|---------------|---------------------------|----------------------------|---------|-----------|---------------------|
| miR-16_2      | 1.91±1.35                 | 1.66±0.94                  | 0.651   | ↓         | 1.600 (0.270-9.490) |
| miR-28_1      | 1.03±0.62                 | 0.92±0.41                  | 0.671   | -         | -                   |
| miR-29c_1     | 1.11±0.58                 | 1.25±0.76                  | 0.645   | -         | -                   |
| miR-96_1      | 2.18±2.04                 | 1.08±0.72                  | 0.165   | ↓         | 1.167 (0.200-6.805) |
| miR-142-5p_1  | 1.45±1.12                 | 1.27±0.60                  | 0.678   | ↓         | 1.100 (0.370-3.271) |
| miR-142-3p_2  | 1.51±0.73                 | 1.55±0.63                  | 0.917   | -         | -                   |
| miR-144_4     | 1.82±0.88                 | 2.56±1.14                  | 0.110   | ↑         | 1.200 (0.397-3.631) |
| miR-155_2     | 1.25±0.87                 | 1.49±0.92                  | 0.558   | -         | -                   |
| miR-191_1     | 1.05±0.54                 | 1.15±0.49                  | 0.679   | -         | -                   |
| miR-199a_1    | 0.94±0.42                 | 0.98±0.32                  | 0.810   | -         | -                   |
| miR-363_1     | 2.16±2.13                 | 1.71±1.03                  | 0.587   | ↓         | 1.100 (0.370-3.271) |
| miR-451_1     | 1.48±0.76                 | 1.68±0.98                  | 0.607   | -         | -                   |
| miR-1228-3p_1 | 1.06±0.62                 | 0.98±0.59                  | 0.767   | -         | -                   |

↑ повишена експресия      ↓ понижена експресия

При изследване на експресията на miRNAs и давността на ЯК установихме, че при праговата стойност на давността на заболяването над 72.5 месеца има повишаване на експресията на някои от изследваните miRNAs.

**Табл. 25. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК в зависимост от давността на заболяването (mean±SD)**

| miRNAs        | До 72.5 мес. | Над 72.5 мес. | P value | Експресия     | RR 95% CI          |
|---------------|--------------|---------------|---------|---------------|--------------------|
| miR-16_2      | 2.14±1.02    | 1.79±1.63     | 0.449   | ↑ < 72.5 мес. | 1.35 (0.147-2.140) |
| miR-28_1      | 1.26±0.69    | 1.13±0.74     | 0.573   | -             | -                  |
| miR-29c_1     | 1.24±0.55    | 1.22±0.77     | 0.916   | -             | -                  |
| miR-96_1      | 1.71±1.36    | 1.60±1.73     | 0.838   | -             | -                  |
| miR-142-5p_1  | 1.62±0.97    | 1.59±1.28     | 0.954   | -             | -                  |
| miR-142-3p_2  | 1.75±0.88    | 1.58±0.94     | 0.588   | -             | -                  |
| miR-144_4     | 2.51±1.28    | 1.81±1.15     | 0.011   | ↑ < 72.5 мес. | 2.16 (1.128-4.122) |
| miR-155_2     | 3.02±6.10    | 1.62±1.32     | 0.036   | ↑ < 72.5 мес. | 1.06 (0.534-2.087) |
| miR-191_1     | 1.36±0.79    | 1.27±0.84     | 0.750   | -             | -                  |
| miR-199a_1    | 1.09±0.74    | 1.07±0.55     | 0.886   | -             | -                  |
| miR-363_1     | 2.39±1.82    | 1.57±1.10     | 0.012   | ↑ < 72.5 мес. | 1.33 (0.682-2.607) |
| miR-451_1     | 1.87±0.80    | 1.57±1.24     | 0.393   | -             | -                  |
| miR-1228-3p_1 | 1.19±0.77    | 1.10±0.48     | 0.662   | -             | -                  |

В сиво е представено  $p < 0.05$       ↑ повишена експресия      ↓ понижена експресия

**Табл. 26. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК в зависимост от медикаментозното лечение (mean±SD)**

| miRNAs        | КС        | 5-АСА     | АДА       | АЗА       | P value | Експресия |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|
| miR-16_2      | 2.29±0.82 | 1.44±0.82 | 2.15±1.81 | 2.47±1.91 | 0.041   | ↓ 5-АСА   |
| miR-28_1      | 1.58±0.79 | 0.97±0.43 | 1.12±0.83 | 1.42±0.75 | 0.273   | -         |
| miR-29c_1     | 1.22±0.52 | 1.08±0.62 | 1.29±0.75 | 1.64±0.92 | 0.614   | -         |
| miR-96_1      | 1.55±0.92 | 1.94±1.83 | 1.73±1.71 | 0.54±0.16 | 0.05    | ↓ АЗА     |
| miR-142-5p_1  | 1.70±0.85 | 1.19±0.55 | 1.75±1.43 | 2.40±1.94 | 0.042   | ↓ 5-АСА   |
| miR-142-3p_2  | 2.13±1.02 | 1.54±0.66 | 1.47±1.07 | 1.67±0.53 | 0.047   | ↑ КС      |
| miR-144_4     | 2.44±1.39 | 2.06±0.86 | 2.21±1.61 | 1.71±1.09 | 0.842   | -         |
| miR-155_2     | 5.19±8.91 | 1.65±1.51 | 1.23±0.86 | 1.90±1.25 | 0.023   | ↑ КС      |
| miR-191_1     | 1.73±0.91 | 1.01±0.40 | 1.33±0.98 | 1.37±0.85 | 0.280   | -         |
| miR-199a_1    | 1.35±0.96 | 0.95±0.38 | 1.06±0.69 | 1.01±0.37 | 0.617   | -         |
| miR-363_1     | 1.94±0.73 | 1.51±1.09 | 2.44±2.21 | 2.27±1.69 | 0.534   | -         |
| miR-451_1     | 1.83±0.74 | 1.35±0.72 | 2.07±1.41 | 1.53±0.96 | 0.394   | -         |
| miR-1228-3p_1 | 1.49±0.71 | 1.00±0.63 | 0.97±0.56 | 1.57±0.44 | 0.016   | ↓ АДА     |

В сиво е представено  $p < 0.05$     ↑ повишена експресия    ↓ понижена експресия

На табл. 26. са представени резултатите от експресията на изследваните miRNAs в зависимост от проведеното медикаментозно лечение. При пациентите, които са на биологично лечение с адалимумаб се наблюдава понижена експресия на miR-1228-3p\_1 до стойност близка до праговата стойност при здрави индивиди.

При лечение с 5-АСА се установява понижена експресия на miR-16\_2 и miR-142-5p\_1. При пациентите, които са на лечение с АЗА се наблюдава понижена експресия на miR-96\_1. Повишена експресия на miR-142-3p\_2 и miR-155\_2 се установява при пациентите, които са на лечение с КС.

**4.4. Съпоставяне на данните от експресията на съответните miRNAs: \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR -155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контроли: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 при пациенти с болест на Крон и с язвен колит в различен стадий на болестта (Задача 3)**

На табл. 27 са представени резултатите за определяне точността на изследваните miRNAs за разграничаване на БК и ЯК, както и позитивната и негативната предсказващи стойности.

**Табл. 27. Определяне точността на изследваните miRNAs за разграничаване на БК и ЯК**

| miRNAs        | БК      |        |       | ЯК      |       |       |
|---------------|---------|--------|-------|---------|-------|-------|
|               | Точност | PPV    | NPV   | Точност | PPV   | NPV   |
| miR-16_2      | 53.8%   | 73.7 % | 25.9% | 53.8%   | 62.9% | 47.4% |
| miR-28_1      | 53.8%   | 68.4%  | 33.3% | 53.8%   | 60.0% | 48.6% |
| miR-29c_1     | 53.8%   | 69.4%  | 34.5% | 53.8%   | 62.1% | 47.2% |
| miR-96_1      | 53.8%   | 58.8%  | 48.4% | 53.8%   | 54.8% | 52.9% |
| miR-142-5p_1  | 53.8%   | 70.6%  | 35.5% | 53.8%   | 66.7% | 42.8% |
| miR-142-3p_2  | 53.8%   | 70.6%  | 35.4% | 53.8%   | 68.7% | 39.4% |
| miR-144_4     | 53.8%   | 74.3%  | 30.0% | 53.8%   | 71.8% | 36.4% |
| miR-155_2     | 53.8%   | 68.6%  | 36.6% | 53.8%   | 63.3% | 45.7% |
| miR-191_1     | 53.8%   | 68.5%  | 36.7% | 53.8%   | 63.3% | 45.7% |
| miR-199a_1    | 53.8%   | 67.6%  | 35.7% | 53.8%   | 57.1% | 51.4% |
| miR-363_1     | 53.8%   | 69.7%  | 37.5% | 53.8%   | 67.7% | 41.2% |
| miR-451_1     | 53.8%   | 64.7%  | 41.9% | 53.8%   | 62.5% | 45.5% |
| miR-1228-3p_1 | 53.8%   | 57.6%  | 50.0% | 53.8%   | 54.8% | 52.9% |

От резултатите представени на табл. 28 се вижда, че експресията на изследваните miRNAs е по-висока при пациентите с БК, като при всички преобладават лицата със стойности над праговете. При пациентите с ЯК също преобладават лицата с повишена експресия спрямо праговата стойност, като при miR-16\_2, miR-28\_1 и miR-96\_1 няма разлика между двете групи. При пациентите с ЯК преобладават тези с понижена експресията на miR-199a\_1.

**Табл. 28. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо пациенти с ЯК (mean±SD)**

| miRNAs        | БК        | ЯК        | P value | Експресия БК | Експресия ЯК |
|---------------|-----------|-----------|---------|--------------|--------------|
| miR-16_2      | 3.07±2.11 | 1.96±1.34 | 0.011   | ↑28/7↓       | ↑17/18↓      |
| miR-28_1      | 5.09±13.9 | 1.20±0.71 | 0.016   | ↑26/9↓       | ↑18/17↓      |
| miR-29c_1     | 1.69±0.92 | 1.23±0.66 | 0.075   | ↑25/10↓      | ↑18/17↓      |
| miR-96_1      | 2.54±3.41 | 1.65±1.53 | 0.045   | ↑20/15↓      | ↑17/18↓      |
| miR-142-5p_1  | 2.42±2.08 | 1.61±1.12 | 0.041   | ↑24/11↓      | ↑20/15↓      |
| miR-142-3p_2  | 2.69±1.96 | 1.66±0.90 | 0.006   | ↑24/11↓      | ↑22/13↓      |
| miR-144_4     | 2.86±1.74 | 2.16±1.25 | 0.062   | ↑26/9↓       | ↑23/12↓      |
| miR-155_2     | 2.66±2.76 | 2.33±4.46 | 0.716   | ↑24/11↓      | ↑19/16↓      |
| miR-191_1     | 2.16±1.68 | 1.32±0.81 | 0.009   | ↑24/11↓      | ↑19/16↓      |
| miR-199a_1    | 2.39±3.91 | 1.08±0.64 | 0.013   | ↑25/10↓      | ↑16/19↓      |
| miR-363_1     | 2.39±1.52 | 1.99±1.55 | 0.272   | ↑23/12↓      | ↑21/14↓      |
| miR-451_1     | 2.37±1.63 | 1.72±1.03 | 0.05    | ↑22/13↓      | ↑20/15↓      |
| miR-1228-3p_1 | 1.91±2.20 | 1.15±0.64 | 0.054   | ↑19/16↓      | ↑17/18↓      |

В сиво е посочено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

**Табл. 29. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо пациенти с ЯК (mean±SD)**

| miRNAs        | Активна БК | Активен ЯК | P value | Експресия Активна БК | Експресия Активен ЯК |
|---------------|------------|------------|---------|----------------------|----------------------|
| miR-16_2      | 3.77±2.38  | 1.88±1.13  | 0.040   | ↑19/1↓               | ↑9/11↓               |
| miR-28_1      | 3.69±5.82  | 1.23±0.67  | 0.025   | ↑16/4↓               | ↑10/10↓              |
| miR-29c_1     | 1.96±1.06  | 1.11±0.48  | 0.002   | ↑15/5↓               | ↑10/10↓              |
| miR-96_1      | 3.40±4.24  | 1.92±1.68  | 0.033   | ↑13/7↓               | ↑12/8↓               |
| miR-142-5p_1  | 2.56±2.01  | 1.43±0.72  | 0.024   | ↑14/6↓               | ↑12/8↓               |
| miR-142-3p_2  | 3.37±2.01  | 1.77±0.87  | 0.002   | ↑17/3↓               | ↑14/6↓               |
| miR-144_4     | 3.15±1.84  | 2.04±1.18  | 0.030   | ↑17/3↓               | ↑14/6↓               |
| miR-155_2     | 2.59±2.02  | 3.15±5.81  | 0.296   | ↑18/2↓               | ↑12/8↓               |
| miR-191_1     | 2.41±1.36  | 1.29±0.74  | 0.003   | ↑14/6↓               | ↑12/8↓               |
| miR-199a_1    | 2.26±1.85  | 1.12±0.68  | 0.014   | ↑16/4↓               | ↑10/10↓              |
| miR-363_1     | 2.68±1.66  | 2.00±1.81  | 0.221   | ↑15/5↓               | ↑11/9↓               |
| miR-451_1     | 2.72±1.79  | 1.52±0.85  | 0.011   | ↑16/4↓               | ↑11/9↓               |
| miR-1228-3p_1 | 2.14±2.47  | 1.11±0.68  | 0.013   | ↑12/8↓               | ↑10/10↓              |

В сиво е посочено p<0.05    ↑ повишена експресия    ↓ понижена експресия

При изследване на експресията на miRNAs при пациенти с активна болест се установява, че пациентите с БК имат значително по-високи стойности на серумната експресия в сравнение с циркулиращите нива при пациентите с ЯК (Табл. 29).

**Табл. 30. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо пациенти с ЯК (mean±SD)**

| miRNAs        | Ремисия БК | Ремисия ЯК | P value | Експресия Ремисия БК | Експресия Ремисия ЯК |
|---------------|------------|------------|---------|----------------------|----------------------|
| miR-16_2      | 2.14±1.24  | 2.07±1.62  | 0.484   | ↑9/6↓                | ↑8/7↓                |
| miR-28_1      | 6.97±20.43 | 1.15±0.77  | 0.035   | ↑10/5↓               | ↑8/7↓                |
| miR-29c_1     | 1.34±0.50  | 1.39±0.83  | 0.838   | ↑10/5↓               | ↑8/7↓                |
| miR-96_1      | 1.39±1.19  | 1.32±1.27  | 0.861   | ↑7/8↓                | ↑5/10↓               |
| miR-142-5p_1  | 2.22±2.23  | 1.83±1.49  | 0.573   | ↑10/5↓               | ↑8/7↓                |
| miR-142-3p_2  | 1.79±1.53  | 1.53±0.94  | 0.368   | ↑7/8↓                | ↑8/7↓                |
| miR-144_4     | 2.47±1.58  | 2.34±1.37  | 0.516   | ↑9/6↓                | ↑9/6↓                |
| miR-155_2     | 2.75±3.59  | 1.25±0.74  | 0.016   | ↑6/9↓                | ↑7/8↓                |
| miR-191_1     | 1.85±2.04  | 1.35±0.91  | 0.392   | ↑10/5↓               | ↑7/8↓                |
| miR-199a_1    | 2.58±5.67  | 1.03±0.62  | 0.080   | ↑9/6↓                | ↑6/9↓                |
| miR-363_1     | 2.01±1.26  | 1.97±1.17  | 0.882   | ↑8/7↓                | ↑10/5↓               |
| miR-451_1     | 1.92±1.31  | 1.99±1.22  | 0.443   | ↑6/9↓                | ↑9/6↓                |
| miR-1228-3p_1 | 1.61±1.82  | 1.21±0.60  | 0.150   | ↑7/8↓                | ↑7/8↓                |

В сиво е посочено p<0.05    ↑ повишена експресия    ↓ понижена експресия

За разлика от групата на пациентите с активна болест при пациентите в ремисия съществена разлика в експресията се установи само при две miRNAs, където стойностите на циркулиращите miRNAs отново са по-високи при пациентите с БК (Табл. 30).

На табл. 31 е предствен сравнителен анализ на средните стойности на серумната експресия на разглежданите miRNAs според нивата на FCP. Резултатите от анализа показват, че шест miRNAs са с повишена експресия при повишени серумни нива на FCP, докато една miRNA (miR-28\_1) е с повишена експресия при понижени нива на FCP.

**Табл. 31. Експресия на miRNAs при пациенти с IBD спрямо серумните нива на FCP (mean±SD)**

| miRNAs        | < 50 µg/l   | > 50 µg/l | P value | Експресия   | OR (95% CI)         |
|---------------|-------------|-----------|---------|-------------|---------------------|
| miR-16_2      | 1.59±1.09   | 2.69±2.17 | 0.018   | ↑ > 50 µg/l | 1.50 (0.303-7.432)  |
| miR-28_1      | 10.92±28.19 | 1.73±0.95 | <0.001  | ↑ < 50 µg/l | 3.54 (0.674-18.623) |
| miR-29c_1     | 1.12±0.47   | 1.52±0.88 | 0.131   | -           | -                   |
| miR-96_1      | 0.64±0.25   | 2.28±3.61 | 0.032   | ↑ > 50 µg/l | 7.58 (0.809-71.046) |
| miR-142-5p_1  | 1.82±1.31   | 2.06±1.56 | 0.078   | -           | -                   |
| miR-142-3p_2  | 1.11±0.65   | 2.43±1.87 | 0.041   | ↑ > 50 µg/l | 6.37 (1.046-38.858) |
| miR-144_4     | 2.43±1.78   | 2.04±1.32 | 0.448   | -           | -                   |
| miR-155_2     | 1.54±0.59   | 3.97±5.77 | 0.045   | ↑ > 50 µg/l | 1.50 (0.303-7.432)  |
| miR-191_1     | 1.11±0.54   | 1.74±1.16 | 0.155   | -           | -                   |
| miR-199a_1    | 0.89±0.47   | 1.49±1.23 | 0.043   | ↑ > 50 µg/l | 2.96 (0.570-15.396) |
| miR-363_1     | 1.45±0.89   | 1.84±1.04 | 0.341   | -           | -                   |
| miR-451_1     | 1.87±1.46   | 1.70±1.05 | 0.290   | -           | -                   |
| miR-1228-3p_1 | 1.28±0.48   | 1.81±1.97 | 0.063   | ↑ > 50 µg/l | 1.56 (0.882-2.767)  |

В сиво е посочено p<0.05      ↑ повишена експресия      ↓ понижена експресия

Беше установена правопрпорционална умерена зависимост между експресията на miR-155\_2 и серумните нива на FCP (r=0.345; p<0.01), като повишената експресия на miR-155\_2 се свързва с повишени нива на FCP. При 11.9 % от пациентите с IBD, повишена експресия на miR-155\_2 се наблюдава при повишени нива на FCP. Високата експресия на miR-155\_2 се явява рисков фактор за повишени нива на FCP при пациенти с IBD (OR=1.50 (0.303-7.432); p<0.05).

**4.5. Изготвяне на профил на пациентите с възпалителни болести на червата, които да отразява основните характеристики на болестта според серумната експресия на съответните miRNAs: \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1;**



\*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4;  
 \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и  
 контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 (Задача 4)

### miR-16\_2

На табл. 32 е представена експресията на miR-16\_2 в зависимост от основните характеристики на пациентите с БК и ЯК.

**Табл. 32. Експресия на miR-16\_2 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК**

| Показатели                |                       | Експресия на miR-16_2<br>(mean±SD) |           |
|---------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------|
|                           |                       | БК (n=35)                          | ЯК (n=35) |
| Локализация<br>БК/ЯК      | L1/E1                 | 3.54±2.33                          | 2.53      |
|                           | L2/E2                 | 2.64±0.90                          | 1.82±0.91 |
|                           | L3/E2                 | 2.45±2.03                          | 2.01±1.54 |
| Форма на<br>протичане     | B1                    | 2.43±1.13                          | -         |
|                           | B2                    | 3.27±2.49                          | -         |
|                           | B3                    | 3.51±2.15                          | -         |
|                           | B2-B3                 | 9.20                               | -         |
|                           | Хронично рецидивираща | -                                  | 1.97±1.43 |
|                           | Хронично персистираща | -                                  | 1.97±0.99 |
| CDAI                      | Ремисия               | 2.41±1.23                          | -         |
|                           | Лека активност        | 2.38±1.06                          | -         |
|                           | Умерена активност     | 4.27±3.00                          | -         |
| S (severity)              | Ремисия               | -                                  | 1.45±1.11 |
|                           | Лека активност        | -                                  | 2.41±1.65 |
|                           | Умерена активност     | -                                  | 3.01±0.08 |
|                           | Тежка активност       | -                                  | 1.38±0.89 |
| Mayo score<br>Ендоскопски | Ремисия               | -                                  | 2.33±2.05 |
|                           | Лека активност        | -                                  | 2.01±1.02 |
|                           | Умерена активност     | -                                  | 1.74±1.23 |
|                           | Тежка активност       | -                                  | 1.80±1.12 |
| Лечение                   | 5-АСА                 | 2.83±0.90                          | 1.44±0.82 |
|                           | Кортикостероиди       | 3.11±2.25                          | 2.29±0.82 |
|                           | Имуномодулатори       | 2.27±0.82                          | 2.47±1.91 |
|                           | Биологично лечение    | 3.51±2.26                          | 2.15±1.81 |

Анализът на резултатите от експресията на miR-16\_2 в зависимост от локализацията показват, че циркулиращата miR-16\_2 е повишена при тънкочревна локализация (L1) (3.54±2.33) и панколит (E3)

(2.01±1.54). При пациентите с БК се установява съществена разлика в експресията на miR-16\_2 при възпалителна (B1), стеногична (B2) и пенетрираща (B3) форма на болестта (p=0.010). Експресията е по-висока при тежките форми на заболяването (B2 и B3). При пациентите с ЯК не се установява съществена разлика във формата на протичане.

При анализа на връзката между експресията на miR-16\_2 и CDAI се установява правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.424$ ;  $p=0.015$ ), която показва, че серумната експресия на miR-16\_2 се увеличава при активност на БК. Пациентите с умерена активност на БК имат значително повишена експресия на miR-16\_2 спрямо тези в ремисия и лека активност (4.27±3.00 към 2.41±1.23 и 2.38±1.06;  $p=0.048$ ). Повишената експресията на miR-16\_2 е рисков фактор за CDAI над 150 (OR=4.80 (0.506-45.495);  $p=0.015$ ).

Анализът на връзката между тежестта на ЯК и експресията на miR-16\_2 показва, че между индекса за тежест (S, според Монреалската класификация) и ендоскопската активност (Partial Mayo score) няма зависимост с експресията на miR-16\_2. При пациентите с ЯК и тежка болест има понижаване на експресията на miR-16\_2 и при двата индекса.

От гледна точка на лечението няма съществена разлика в серумните нива на miR-16\_2, както при БК, така и при ЯК.

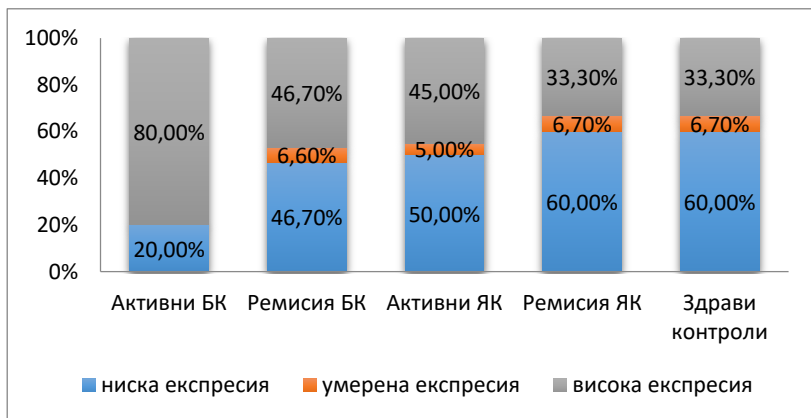
### **miR-28\_1**

Според намерените прагови стойности определихме три групи пациенти според серумната експресия на miR 28 – с ниска експресия < 1.19, с умерена експресия 1.19-1.2 и с висока експресия > 1.24. Средната експресия на miR-28 при здрави контроли е 1.43±1.47.

Средната стойност на серумната експресия на miR 28 се различава съществено при пациенти с БК и ЯК (съответно 5.09±13.9 към 1.20±0.71,  $p=0.016$ ), като разликата се запазва и по отношение на пациентите с активна болест (съответно 3.69±5.82 за БК и 1.23±0.67 за ЯК,  $p=0.025$ ) и пациентите в ремисия (съответно 6.97±20.43 за БК и 1.15±0.77 за ЯК,  $p=0.035$ ).

В настоящото изследване сред пациенти с БК в ремисия с разпространена локализация (L2 и L3) и ниски нива на експресия на серумната miR 28 са 85.7% от пациентите. При пациентите с ЯК в ремисия с разпространен обхват на болестта (E2 и E3) и ниски нива на експресия на серумната miR 28 са 88.9% от пациентите. Ако разгледаме пациентите с IBD в това проучване чрез нивата на експресия на циркулиращата miR-28,

въпреки постигнатата ремисия, се оказва, че над две трети пациентите са високо рискови за прогресиране на болестта към дисплазия и формиране на КА-КРК. Всички пациенти с БК в ремисия с възпалителен фенотип (В1) показват ниска експресия на miR 28, което отново ги поставя в рисковата група за прогресия към дисплазия, тъй като отпада тумор супресорната роля на повишената експресия на miR 28.



**Фиг. 2. Разпределение на пациентите с IBD според нивата на серумна експресия на miR 28 и активността на заболяването**

Дебютът на IBD в млада възраст (под 40 г.) се явява друг рисков фактор за развитието на КА-КРК. При пациентите с БК в ремисия и с ниски серумни нива на miR 28, 85.7% са били на възраст под 40 г. при поставяне на диагнозата. При млади пациенти с ЯК в ремисия, при които циркулиращите нива на miR 28 са ниски, 66.7% попадат в рисковата група.

Както е известно при давност на IBD над 8 г. (96 мес.) се повишава рискът от развитие на дисплазия. Анализирайки този показател се установи, че 28.6% от пациентите с БК и съответно 44.4% от пациентите с ЯК попадат в рисковата група на пациенти с голяма давност на съответното заболяване и възможност за развитие на неоплазма.

В групата на изследваните пациенти липсват такива с първичен склерозиращ холангит.

Според извършения мултивариационен анализ на пациенти, при които се съчетават основните рискови фактори за развитието на КА-КРК и

ниски циркулиращи нива на miR-28, са 26.7% от пациентите с IBD в това проучване.

### miR-29c\_1

На табл. 33 е представена характеристика на пациентите и сравнителен анализ на експресията на miR-29 при пациентите с БК и ЯК.

**Табл. 33. Серумна експресия на miR-29 (mean±SD; 95% CI) според Монреалската класификация**

| Показател          |                                  | Експресия на miR-29 |                  |
|--------------------|----------------------------------|---------------------|------------------|
|                    |                                  | БК (n=35)           | ЯК (n=35)        |
| Пол                | Мъже                             | 1.79±1.04           | 1.21±0.64        |
|                    | Жени                             | 1.59±0.77           | 1.25±0.69        |
| Локализация БК/ЯК  | L1/E1                            | 1.92±0.98           | <b>2.43</b>      |
|                    | L2/E2                            | 1.44±0.30           | <b>1.01±0.44</b> |
|                    | L3/E3                            | 1.43±0.92           | <b>1.28±0.70</b> |
| Форма на протичане | B1                               | 1.37±0.52           | -                |
|                    | B2                               | 1.92±1.18           | -                |
|                    | B3                               | 2.11±1.11           | -                |
|                    | B2-B3                            | 2.33                | -                |
|                    | Хронично рецидивираща            | -                   | 1.21±0.70        |
|                    | Хроночно персистираща            | -                   | 1.31±0.49        |
| CDAI               | CDAI < 150- Ремисия              | 1.54±0.69           | -                |
|                    | CDAI 150-220- Лека активност     | 1.43±0.86           | -                |
|                    | CDAI 221-45 - Умерена активност  | 1.98±1.22           | -                |
| S (severity)       | S0-Ремисия                       | -                   | <b>1.07±0.43</b> |
|                    | S1-Лека активност                | -                   | <b>1.53±0.86</b> |
|                    | S2-Умерена активност             | -                   | <b>1.56±0.30</b> |
|                    | S3-Тежка активност               | -                   | <b>0.84±0.32</b> |
| Mayo score         | Mayo score 0 - Ремисия           | -                   | 1.57±1.04        |
|                    | Mayo score 1 - Лека активност    | -                   | 1.26±0.49        |
|                    | Mayo score 2 - Умерена активност | -                   | 0.97±0.52 (      |
|                    | Mayo score 3 - Тежка активност   | -                   | 1.12±0.44        |
| Лечение            | 5-ACA                            | 1.38±0.22           | 1.07±0.62        |
|                    | КС                               | 1.91±1.46           | 1.21±0.51        |
|                    | Имуномодулатори                  | 1.61±0.92           | 1.63±0.92        |
|                    | Биологично лечение               | 1.67±0.81           | 1.29±0.75        |

В удебелен шрифт е представено  $p < 0.05$

Средните нива на серумната експресия на miR-29 са  $2.41 \pm 2.96$  (95% CI 1.31-3.52) Резултатите показват, че при пациентите с БК не се

установява статистически значима разлика според изследваните показатели, докато при пациентите с ЯК се установява разлика в експресията според локализацията и активността. Впечатление прави, че има правопрпорционална умерена зависимост между експресията на miR-29 и възрастта на пациентите с БК ( $r=0.336$ ;  $p=0.049$ ), докато при пациентите с ЯК не беше установена подобна корелация ( $r=0.275$ ;  $p=0.109$ ). При здрави контроли се установи обратнопропорционална умерена зависимост между серумната експресия на miR-29 и възрастта ( $r=-0.349$ ;  $p=0.039$ ). От друга страна и при двете заболявания се установява правопрпорционална умерена зависимост между експресията на miRNAата и давността на заболяването (съответно Spearman's rho=0.314;  $p=0.046$  за БК и Spearman's rho=0.322;  $p=0.049$  за ЯК).

При сравняване на получените резултати с праговата стойност при здравите контроли е намерена съществена разлика по всички показатели като за пациентите с БК, така и за пациентите с ЯК.

Установено бе, че при пациентите с ляв колит (E2) и тези с умерена (S2) и тежка (S3) активност на ЯК, експресията на miR-29 е под тази установена за прагова стойност. При пациентите в ремисия според Монреалската класификация (S) стойностите на експресията се доближават до тези на здравите котроли.

### **miR-96\_1**

За целите на настоящото изследване са определени праговите стойности на експресия на miR 96 при болест в активен стадий е 1.19 (AUC 0.616 (0.504-0.727),  $p=0.05$ ) с чувствителност 60.0 % и специфичност 60.0% и прагова стойност при постигната ремисия 1.02 (AUC 0.432 (0.321-0.544),  $p=0.285$ ) с чувствителност 43.3% и специфичност 44.3%. Праговата стойност при здрави контроли е 1.03 (AUC 0.565 (0.421-0.708),  $p=0.308$ ) с чувствителност 52.9% и специфичност 53.3%.

На табл. 34 е представена серумната експресия на miR-96 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК, както и експресията спрямо праговата стойност, която беше установена при здравите контроли. Както при пациентите с БК, така и при пациентите с ЯК средните стойности на серумната експресия на miR-96 са над праговата стойност при здрави контроли.

**Табл. 34. Експресия на miR-96 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК**

| Основни показатели        |                                  | Експресия на miR-96 (mean±SD) |                  | Експресия на miR-96 спрямо праговата стойност при здрави контроли |               |
|---------------------------|----------------------------------|-------------------------------|------------------|---|---------------|
|                           |                                  | БК (n=35)                     | ЯК (n=35)        | БК (n=35)   | ЯК (n=35)     |
| Локализация БК/ЯК         | L1/E1                            | <b>1.85±2.00</b>              | <b>1.42</b>      | 10↓/9↑  | <b>1↑</b>     |
|                           | L2/E2                            | <b>1.24±1.36</b>              | <b>2.52±1.70</b> | 3↓/2↑   | <b>3↓/8↑</b>  |
|                           | L3/E3                            | <b>4.32±5.13</b>              | <b>1.26±1.33</b> | 2↓/9↑   | <b>15↓/8↑</b> |
| Форма на протичане        | B1                               | 2.26±2.14                     | -                | 7↓/10↑  | -             |
|                           | B2                               | 2.41±2.32                     | -                | 4↓/7↑   | -             |
|                           | B3                               | 3.96±7.07                     | -                | 3↓/3↑   | -             |
|                           | B2-B3                            | 0.31                          | -                | 1↓  | -             |
|                           | Хронично рецидивираща            | -                             | 1.65±1.57        | -   | 14↓/14↑       |
|                           | Хронично персистираща            | -                             | 1.69±1.46        | -   | 4↓/3↑         |
| CDAI                      | Ремисия                          | <b>1.55±1.29</b>              | -                | 8↓/10↑  | -             |
|                           | Лека активност                   | <b>2.58±2.36</b>              | -                | 2↓/3↑   | -             |
|                           | Умерена активност                | <b>4.34±5.36</b>              | -                | 4↓/7↑   | -             |
| S (severity)              | S <sub>0</sub> Ремисия           | -                             | <b>1.05±0.99</b> | -   | 6↓/2↑         |
|                           | S <sub>1</sub> Лека активност    | -                             | <b>2.04±1.77</b> | -   | 5↓/8↑         |
|                           | S <sub>2</sub> Умерена активност | -                             | <b>3.29±1.86</b> | -   | 1↓/3↑         |
|                           | S <sub>3</sub> Тежка активност   | -                             | <b>1.01±0.75</b> | -   | 6↓/4↑         |
| Частичен Мейо скор        | Ремисия                          | -                             | 1.46±1.52        | -   | 5↓/3↑         |
|                           | Лека активност                   | -                             | 1.24±0.91        | -   | 6↓/4↑         |
|                           | Умерена активност                | -                             | 2.18±1.98        | -   | 3↓/5↑         |
|                           | Тежка активност                  | -                             | 1.84±1.73        | -   | 4↓/5↑         |
| Лечение                   | 5-АСА                            | <b>1.04±0.74</b>              | 1.94±1.83        | 1↓/6↑   | 3↓/5↑         |
|                           | Кортикостероиди                  | <b>5.82±5.93</b>              | 1.55±0.92        | 1↓/1↑   | 5↓/7↑         |
|                           | Имуномодулатори                  | <b>1.12±0.94</b>              | 0.54±0.16        | 12↓/12↑   | 7↓/5↑         |
|                           | Биологично лечение               | <b>1.83±1.95</b>              | 1.73±1.71        | 1↓/1↑   | 3↓            |
| CRP                       | < 5 мг/л                         | <b>1.17±0.98</b>              | 1.88±1.48        | 9↓/7↑   | 6↓/10↑        |
|                           | > 5 мг/л                         | <b>3.70±4.25</b>              | 1.57±1.66        | 6↓/3↑   | 10↓/7↑        |
| BMI                       | ИТМ < 25кг/м <sup>2</sup>        | <b>1.39±1.22</b>              | 2.18±2.04        | 8↓/9↑   | 7↓/6↑         |
|                           | ИТМ > 25 кг/м <sup>2</sup>       | <b>3.60±4.67</b>              | 1.08±0.72        | 7↓/9↑   | 4↓/4↑         |
| Интестинални усложнения   |                                  | 3.08±4.53                     | 1.49±1.46        | 6↓/10↑  | 11↓/7↑        |
| Давност на БК             | < 50.5 мес.                      | <b>3.24±4.16</b>              | -                | 6↓/12↑  | -             |
|                           | > 50.5 мес.                      | <b>1.81±2.29</b>              | -                | 9↓/8↑   | -             |
| Давност на ЯК             | < 72.5 мес.                      | -                             | 1.71±1.36        | -   | 8↓/10↑        |
|                           | > 72.5 мес.                      | -                             | 1.60±1.73        | -   | 10↓/7↑        |
| Екстраинтестинални прояви |                                  | <b>2.15±2.13</b>              | 1.62±1.58        | 9↓/11↑  | 15↓/13↑       |

**В удебелен шрифт са стойностите, при които p<0.05**      ↑ = повишена експресия  
↓ = понижена експресия

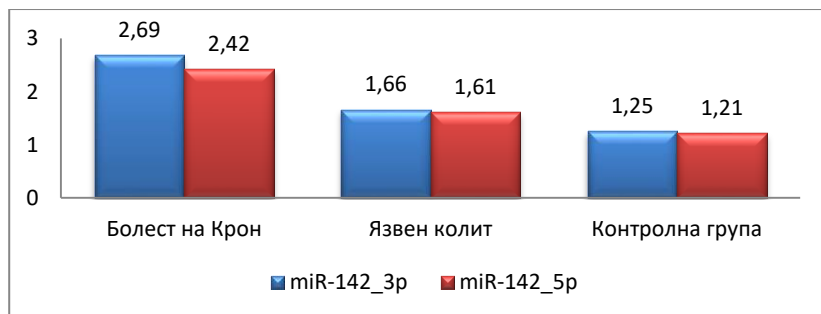
При пациентите с БК бе намерена по-висока експресия на miR-96 в активната фаза на заболяването сравнена с ремисия (p=0.018), но спрямо праговата стойност при здрави контроли, при постигната ремисия няма

разлика между броя на пациентите в повишена и понижена експресия. При пациентите с БК в стадий на активност, с повишена експресия са значително повече от тези с понижена. При пациентите с БК повишената експресия на miR-96 корелира с обширен обхват (тънко и дебело черво, L3,  $4.32 \pm 5.13$ ), докато при пациентите с ЯК повишена експресия се наблюдава при левостранен колит (E2) ( $2.52 \pm 1.70$ ). При пациенти с БК повишена експресия на miR-96 ( $5.82 \pm 5.93$ ) се свързва с кортикостероидно лечение. При пациентите с ЯК, които са на лечение с имunosупресори (azathioprine), се наблюдава понижаване на експресията на miR-96 ( $0.54 \pm 0.16$ ), която достига дори под праговата стойност за ремисия.

Повишените стойности на експресията на miR-96 при пациентите с БК корелират с умерената активност на болестта, оценена чрез CDAI ( $4.34 \pm 5.36$ ). При изследването на тежестта на ЯК според Монреалската класификация (S) се установи, че повишената експресия на miR-96 ( $3.29 \pm 1.86$ ) корелира с умерената активност (S2).

### miR-142-5p\_1 и miR-142-3p\_2

При изследването на експресията на miR-142\_3p се установи съществена разлика между изследваните групи ( $p < 0.001$ ). При пациентите с БК серумната експресия на miR-142\_3p е значително по-висока в сравнение с пациентите с ЯК и контролната група. Подобни са резултатите и при експресията на miR-142\_5p. Експресията на miR-142\_5p е значително по-висока при пациентите с БК ( $p = 0.004$ ) (Фиг. 3). Не се установява съществена разлика в експресията на двете miRNAs в изследваните групи.



Фиг. 3. Експресия на miR-142\_3p и miR-142\_5p

На табл. 35 е представена експресията на miR-142\_3p и miR-142\_5p според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК.

**Табл. 35. Експресия на miRNA 142 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК**

| Основни показатели |                       | Експресия на miR-142_3p (mean±SD) |                  | Експресия на miR-142_5p (mean±SD) |                  |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
|                    |                       | БК (n=35)                         | ЯК (n=35)        | БК (n=35)                         | ЯК (n=35)        |
| Локализация БК/ЯК  | L1/E1                 | 3.06±1.94                         | 1.99             | 3.08±2.54                         | <b>2.38</b>      |
|                    | L2/E2                 | 1.73±0.88                         | 1.52±0.74        | 1.78±0.59                         | <b>1.01±0.54</b> |
|                    | L3/E3                 | 2.48±2.29                         | 1.72±0.99        | 1.54±1.06                         | <b>1.85±1.24</b> |
| Форма на протичане | B1                    | 2.03±1.47                         | -                | 2.05±2.12                         | -                |
|                    | B2                    | 2.92±1.74                         | -                | 2.33±1.90                         | -                |
|                    | B3                    | 3.82±3.06                         | -                | 3.67±2.35                         | -                |
|                    | B2-B3                 | 4.66                              | -                | 1.92                              | -                |
|                    | Хронично рецидивираща | -                                 | <b>1.51±0.86</b> | -                                 | 1.61±1.23        |
|                    | Хронично персистираща | -                                 | <b>2.29±0.85</b> | -                                 | 1.59±0.59        |
| CDAI               | Ремисия               | <b>1.94±1.58</b>                  | -                | 2.06±2.02                         | -                |
|                    | Лека активност        | <b>2.94±1.32</b>                  | -                | 3.06±3.02                         | -                |
|                    | Умерена активност     | <b>3.64±2.40</b>                  | -                | 2.52±1.82                         | -                |
| S (severity)       | Ремисия               | -                                 | 1.22±0.72        | -                                 | 1.85±1.64        |
|                    | Лека активност        | -                                 | 1.77±0.94        | -                                 | 1.69±1.14        |
|                    | Умерена активност     | -                                 | 1.88±0.36        | -                                 | 1.69±0.57        |
|                    | Тежка активност       | -                                 | 1.78±1.01        | -                                 | 1.25±0.79        |
| Mayo score         | Ремисия               | -                                 | 1.69±1.18        | -                                 | 2.16±1.65        |
|                    | Лека активност        | -                                 | 1.54±0.64        | -                                 | 1.59±1.16        |
|                    | Умерена активност     | -                                 | 1.69±1.19        | -                                 | 1.21±0.64        |
|                    | Тежка активност       | -                                 | 1.74±0.69        | -                                 | 1.48±0.76        |
| Лечение            | 5-АСА                 | 3.02±1.49                         | 1.54±0.65        | 0.82±0.08                         | 1.19±0.54        |
|                    | Кортикостероиди       | 3.17±2.77                         | 2.13±1.02        | 2.16±1.61                         | 1.70±0.85        |
|                    | Имунни модулатори     | 1.37±0.54                         | 1.67±0.53        | 1.88±0.37                         | 2.40±1.95        |
|                    | Биологично лечение    | 2.63±1.83                         | 1.47±1.08        | 2.66±2.33                         | 1.75±1.43        |

В удебелен шрифт са стойностите, при които  $p < 0.05$

Въпреки, че няма съществена разлика в експресията на miRNAs според локализацията на заболяването, при пациенти с БК с тънкочревна локализация има повишена експресия на miR-142\_3p и miR-142\_5p (съответно 3.06 и 3.08). При пациентите с ЯК не се установява съществена разлика в експресията на miR-142\_3p според локализацията. При изследване циркулиращите нива на miR-142\_5p се установяват значително



повишена експресия на miR-142\_5p при пациентите с панколит (E3) (1.85;  $p=0.042$ ). В настоящото изследване има само един пациент с проктит и експресията на изследваните miR-142\_3p и miR-142\_5p не се взема предвид при анализа.

Според формата на протичане при пациентите с БК се установява повишена експресия и при двете miRNAs, като при пациентите с пенетриращ фенотип е съответно 3.82 за miR-142\_3p и 3.67 за miR-142\_5p. При пациентите с ЯК експресията на miR-142\_3p е значително по-висока при пациентите с хронично персистираща форма (2.29 спрямо 1.51 за хронично рецидивираща форма,  $p=0.036$ ). Експресията на miR-142\_5p не показва съществена разлика при двете форми на протичане на ЯК.

При пациенти с БК има съществена разлика в експресията на miR-142\_3p ( $p=0.047$ ), като се установява правопрпорционална зависимост спрямо тежестта на заболяването, изчислена с CDAI ( $r=0.353$ ;  $p<0.05$ ). Повишената експресия на miR-142\_3p носи 4 пъти по висок риск за повишена активност при пациенти с БК ( $OR=4.13$  (0.726-23.429),  $p<0.05$ ), докато експресията на miR-142\_5p не показва такава зависимост.

Не се установява съществена разлика в експресията между двете miRNAs при оценка тежестта на заболяването (при пациенти с ЯК, оценен чрез два индекса и при пациенти с БК, оценен чрез CDAI). Не се установява съществена разлика в експресията на разглежданите miRNAs според провежданото медикаментозно лечение.

#### **miR-144\_4**

За целите на настоящото изследване са определени праговите стойности на експресия на miR-144\_4 при болест в активен стадий е 2.03 (AUC 0.687 (0.582-0.793),  $p=0.002$ ) с чувствителност 60.0% и специфичност 61.5% и прагова стойност при постигната ремисия 1.97 (AUC 0.539 (0.424-0.654),  $p=0.022$ ) с чувствителност 51.4% и специфичност 52.3%. Праговата стойност при здрави контроли е 1.59 (AUC 0.745 (0.632-0.858),  $p<0.001$ ) с чувствителност 70.0% и специфичност 70.0% (Фиг. 38.).

На табл. 36 е представена серумната експресия на miR-144 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК, както и изменението в експресията спрямо праговата стойност, която е установена при здравите контроли. Както при пациентите с БК, така и при пациентите с ЯК средните стойности на серумната експресия на miR-144\_4 са над праговата стойност при здрави контроли.

**Табл. 36. Експресия на miR-144\_4 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК**

| Основни показатели |                       | Експресия на miR-144_4 (mean±SD) |           | Изменение в експресията на miR-144_4 спрямо праговата стойност при здрави контроли |           |
|--------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------|--|-----------|
|                    |                       | БК (n=35)                        | ЯК (n=35) | БК (n=35)  | ЯК (n=35) |
| Локализация БК/ЯК  | L1/E1                 | 2.51±1.15                        | 3.14      | 4↓/15↑   | 1↑        |
|                    | L2/E2                 | 3.27±2.09                        | 2.15±0.88 | 1↓/4↑  | 3↓/8↑     |
|                    | L3/E3                 | 3.26±2.39                        | 2.14±1.43 | 4↓/7↑  | 9↓/14↑    |
| Форма на протичане | B1                    | 3.09±2.19                        | -         | 6↓/11↑   | -         |
|                    | B2                    | 2.26±0.94                        | -         | 2↓/9↑  | -         |
|                    | B3                    | 3.06±1.43                        | -         | 1↓/5↑  | -         |
|                    | B2-B3                 | 4.30                             | -         | 1↑   | -         |
|                    | Хронично рецидивираща | -                                | 2.16±1.31 | -  | 11↓/17↑   |
|                    | Хронично персистираща | -                                | 2.19±1.14 | -  | 1↓/6↑     |
| CDAI               | Ремисия               | 2.68±1.68                        | -         | 7↓/11↑   | -         |
|                    | Лека активност        | 3.15±2.92                        | -         | 1↓/4↑  | -         |
|                    | Умерена активност     | 3.08±1.38                        | -         | 1↓/10↑   | -         |
| S (severity)       | Ремисия               | -                                | 2.27±1.87 | -  | 5↓/3↑     |
|                    | Лека активност        | -                                | 2.41±0.73 | -  | 2↓/11↑    |
|                    | Умерена активност     | -                                | 2.34±0.62 | -  | 4↑        |
|                    | Тежка активност       | -                                | 1.71±1.44 | -  | 5↓/5↑     |
| Mayo score         | Ремисия               | -                                | 2.02±0.96 | -  | 3↓/5↑     |
|                    | Лека активност        | -                                | 2.74±1.48 | -  | 3↓/7↑     |
|                    | Умерена активност     | -                                | 1.39±0.76 | -  | 4↓/4↑     |
|                    | Тежка активност       | -                                | 2.36±1.38 | -  | 2↓/7↑     |
| Лечение            | 5-АСА                 | 4.64±5.24                        | 2.06±0.86 | 1↓/1↑  | 2↓/6↑     |
|                    | Кортикостероиди       | 2.69±1.32                        | 2.44±1.39 | 1↓/6↑  | 4↓/8↑     |
|                    | Имунни модулатори     | 1.97±0.72                        | 1.71±1.09 | 1↓/1↑  | 5↓/7↑     |
|                    | Биологично лечение    | 2.83±1.57                        | 2.21±1.61 | 6↓/18↑   | 1↓/2↑     |

В удебелен шрифт са стойностите, при които  $p < 0.05$       ↑ = повишена експресия  
↓ = понижена експресия

Въпреки, че не е установена съществена разлика в серумната експресия на miR-144\_4 според локализацията, при сравнителния анализ с праговите стойности при здрави контроли, се наблюдава голям брой на пациентите с тънчочревна локализация (L1) и панколит (E3), които имат повишена експресия на изследваната miRNA.

Най-голям брой пациенти с повишена експресия спрямо праговата стойност при здрави контроли, са пациентите с възпалителен фенотип (В1) на клинична изява на БК, а при пациенти с ЯК- са тези с хронично рецидивиращата форма на протичане. При активност на заболяването се установи съществена разлика в експресията на miR-144\_4, която е значително по висока при пациентите с БК (съответно  $3.15 \pm 1.84$  за БК и  $2.04 \pm 1.18$  за ЯК,  $p=0.033$ ), като не се установява съществена разлика според степените на активност. При постигане на ремисия не се установи съществена разлика в експресията на изследваната miRNA при пациенти с БК (2.68) и при пациенти с ЯК (2.27). Впечатление прави, че в зависимост от тежестта на ЯК, при сравнение експресията на miR-144\_4 спрямо праговата стойност на експресия при здрави контроли, има съществена разлика. С увеличаване на тежестта на ЯК се повишава и броят на пациентите с повишена експресия спрямо тези с понижена.

При пациенти с БК повишената експресия на miR-144\_4 корелира с лечението с mesalazine (5-АСА) ( $r=0.583$ ;  $p=0.008$ ), което предполага, че на фона на тази терапия не може да се постигне ремисия. От друга страна при лечението с имunosупресори средната стойност на експресията на miR-144\_4 е равна на праговата стойност при ремисия. При тези резултати може да се допусне, че за постигането на ремисия при пациентите с БК, лечението с имunosупресори е по-подходящо, отколкото терапията с 5-АСА. Подобни резултати относно лечението с имуномодулатори се наблюдават и при пациентите с ЯК. В групата на пациентите с ЯК, при лечението с кортикостероиди се установява повишена експресия на miR-144\_4, което може да се свърже с недостатъчно ефективния контрол на възпалението и активността на заболяването на фона на това лечение.

### **miR-155\_2**

На табл. 37 е представена експресията на miR-155 в зависимост основните характеристики на пациентите с БК и ЯК.

Анализът на резултатите на експресията на miR-155 в зависимост от локализацията показват, че циркулиращата miR-155 е повишена при Крон-колит ( $3.51 \pm 5.22$ ) и екстензивен ЯК (Е3) ( $2.86 \pm 5.44$ ). При пациентите с БК не се установява съществена разлика в експресията на miR-155 при възпалителна (В1) и стеногична (В2) форма на болестта, докато при пациентите с ЯК, които не могат да постигнат отчетлива ремисия (хронично персистираща форма) експресията на miR-155 е сигнификантно по-висока спрямо хронично рецидивиращата форма на

протичане ( $5.53 \pm 9.56$  към  $1.54 \pm 1.22$ ;  $P=0.032$ ). При анализа на връзката между експресията на miR-155 и CDAI се установява правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.415$ ;  $p=0.015$ ), която показва, че с увеличаване на серумната експресия на miR-155, нараства на активността на БК. Пациентите с умерена активност на БК имат значително повишена експресия на miR-155 спрямо тези в ремисия и лека активност ( $6.08 \pm 5.12$  към  $2.11 \pm 2.09$  и  $2.11 \pm 1.07$ ;  $p=0.009$ ). Повишената експресията на miR-155 е рисков фактор за активност на БК, измерена чрез CDAI (OR=10.91 (1.194-99.688);  $p=0.017$ ).

**Табл. 37. Експресия на miR-155 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК**

| Основни характеристики               |                       | Експресия на miR-155 (mean±SD) |                  |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------|
|                                      |                       | БК (n=35)                      | ЯК (n=35)        |
| Локализация<br>БК/ЯК                 | L1/E1                 | 2.51±2.42                      | 2.19             |
|                                      | L2/E2                 | 3.51±5.22                      | 1.25±0.96        |
|                                      | L3/E3                 | 2.53±1.84                      | 2.86±5.44        |
| Форма на<br>протичане<br><br>P=0.032 | B1                    | 2.87±3.36                      | -                |
|                                      | B2                    | 2.89±2.55                      | -                |
|                                      | B3                    | 1.86±1.06                      | -                |
|                                      | B2-B3                 | 1.48                           | -                |
|                                      | Хронична рецидивираща | -                              | <b>1.54±1.22</b> |
|                                      | Хронична персистираща | -                              | <b>5.53±9.56</b> |
| CDAI<br>P=0.009                      | Ремисия               | <b>2.11±2.09</b>               | -                |
|                                      | Лека активност        | <b>2.11±1.07</b>               | -                |
|                                      | Умерена активност     | <b>6.08±5.12</b>               | -                |
| S (severity)                         | Ремисия               | -                              | 1.11±0.75        |
|                                      | Лека активност        | -                              | 1.33±1.02        |
|                                      | Умерена активност     | -                              | 1.63±0.48        |
|                                      | Тежка активност       | -                              | 4.92±7.93        |
| Mayo score<br>Ендоскопски            | Ремисия               | -                              | 1.22±0.79        |
|                                      | Лека активност        | -                              | 1.34±0.85        |
|                                      | Умерена активност     | -                              | 4.82±9.05        |
|                                      | Тежка активност       | -                              | 2.23±1.75        |
| Лечение                              | 5-АСА                 | 2.71±2.76                      | 1.65±1.51        |
|                                      | КС                    | 3.39±3.10                      | 5.20±8.91        |
|                                      | Имуномодулатори       | 1.94±0.72                      | 1.90±1.26        |
|                                      | Биологично лечение    | 2.51±2.85                      | 1.23±0.86        |

В удебелен шрифт са стойностите, при които  $p < 0.05$

Анализът на връзката между тежестта на ЯК и експресията на miR-155 показва, че повишената експресия на miR-155 има правопроразпорционална умерена зависимост с индексът за тежест (S, според Монреалската класификация) ( $r=0.321$ ;  $p=0.048$ ). Пациентите с по-висока експресия на miR-155 имат значително по-изразена активност на болестта ( $p<0.05$ ). От друга страна ендоскопската активност, оценена чрез Partial Mayo score не показва зависимост с експресията на miR-155. Установяват се повишени нива на изследваната miRNA при пациентите с умерена активност ( $4.82\pm 9.05$ ), а при тези с тежка активност нивата на експресия се понижават ( $2.23\pm 1.75$ ). При пациентите с ЯК, които са в ремисия или с лека активност на заболяването, експресията на miR-155 е близка до или под праговата стойност, определена при здрави индивиди. От гледна точка на лечението, повишена експресия на miR-155 се наблюдава при лечението с кортикостероиди ( $5.20\pm 8.91$  за ЯК и  $3.39\pm 3.10$  за БК). Експресията на miR-155 при лечението с имуномодулатори е почти еднаква за двете заболявания. При биологичната терапия, пациентите с ЯК имат нива на серумната експресия на miR-155 под определената прагова стойност при здравите контроли.

Други широкоприлагани биомаркери за оценка на възпалението при пациентите с IBD са CRP и FCP. В настоящото проучване средната стойност на нивата на CRP при пациентите с IBD е  $19.31 \text{ mg/l} \pm 32.69 \text{ mg/l}$  ( $0.09\text{-}160.0 \text{ mg/l}$ ), а средните нива на FCP са  $459.19 \text{ mg/g} \pm 490.74 \text{ mg/g}$  ( $2.00 - 1800 \text{ mg/g}$ ). Резултатите от анализа на връзката между експресията на miR-155 с CRP и FCP показва, че изследваната miRNA не корелира с нивата на CRP, докато между циркулиращите нива на miR-155 с нивата на FCP се установява обратнопропорционална умерена зависимост ( $r=-0.344$ ;  $p<0.05$ ).

### **miR-191\_1**

Сравнителният анализ на експресията на miRNA-191\_1 при пациенти с БК и праговата стойност показва наличието на съществена разлика, като miRNA-191\_1 е със значително по-висока експресия при пациентите с БК (съответно 1.11 – прагова стойност и 2.16 при БК). Експресията на miRNA-191\_1 е по-висока при пациентите с активност на БК, но по отношение на праговата стойност както в активност, така и в ремисия броя на пациентите с повишена експресия е 2 пъти по-висок от тези с понижена експресия. При ЯК не се установява съществена разлика между праговата стойност и експресията на miRNA-191\_1. Не се

установява разлика и в експресията на miR-191 при активност и ремисия на пациентите с ЯК.

На табл. 38 е представена характеристиката на изследваните пациенти в активност и ремисия и експресията на miRNA-191\_1. Повишената експресия на miRNA-191\_1 корелира с тънкочревната локализация на БК (L1). Хронично персистиращата форма (т.е. без формиране на ясно обособена ремисия) на ЯК корелира с високата експресия на miRNA-191\_1.

**Табл. 38. Обща характеристика на изследваните лица според експресията на miR-191**

| Показател                      |                       | Експресия на miR-191 при БК |                   | Експресия на miR-191 при ЯК |                   |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
|                                |                       | Активен БК (n=20)           | Ремисия БК (n=15) | Активен ЯК (n=20)           | Ремисия ЯК (n=15) |
| Възраст, год. (mean±SD, range) |                       | <b>r=0.431 P=0.010</b>      |                   | <b>r=0.287 P=0.094</b>      |                   |
| Пол                            | Мъже                  | 2.38±1.22                   | <b>1.09±0.46</b>  | 0.95±0.44                   | 1.19±0.46         |
|                                | Жени                  | 2.45±1.71                   | <b>2.22±2.43</b>  | 1.47±0.82                   | 1.52±1.26         |
| Локализация БК/ЯК              | L1/E1                 | <b>2.59±1.54</b>            | <b>2.71±3.14</b>  | -                           | 1.35              |
|                                | L2/E2                 | -                           | <b>1.54±0.24</b>  | 1.26±0.49                   | 0.76±0.09         |
|                                | L3/E3                 | 2.06±0.98                   | <b>0.92±0.42</b>  | 1.31±0.89                   | 1.50±1.01         |
| Форма на протичане             | B1                    | <b>1.50±0.52</b>            | <b>2.07±2.25</b>  | -                           | -                 |
|                                | B2                    | <b>2.28±1.71</b>            | <b>1.01±0.14</b>  | -                           | -                 |
|                                | B3                    | <b>3.32±0.59</b>            | <b>0.81</b>       | -                           | -                 |
|                                | B2-B3                 | <b>3.39</b>                 | -                 | -                           | -                 |
|                                | Хронично рецидивираща | -                           | -                 | 1.06±0.41                   | 1.35±0.91         |
|                                | Хронично персистираща | -                           | -                 | 1.73±1.03                   | 1.35±0.91         |

В удебелен шрифт са стойностите, при които  $p < 0.05$

Изследването на зависимостта между CDAI и експресията на miR-191\_1 показва, че има правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.330$ ;  $p < 0.05$ ), която сочи, че в 10.89% от случаите повишената експресията на miR-191\_1 се наблюдава при активност на БК. Експресията на изследваната miRNA се различава съществено при пациентите с БК и ЯК, което ги прави разграничими по отношение на активността и тежестта на заболяването. Подобно разграничение се

наблюдава и при локализацията и формата на протичане, което показва, че експресията на miR-191\_1 може да насочи клинициста за определяне на локализация и поведение на болестта още при нейното откриване.

### **miR-199a\_1**

На табл. 39 е представена характеристиката на пациентите с IBD според Монреалската класификация и серумната експресия на miR-199.

Поради липса на валидирани референтни прагови нива на експресията на miRNAs за разграничаване на пациенти с IBD от здрави индивиди бе определена праговата стойност (Cut-off) на експресията на miR-199 при здрави контроли. Тя е специфична за дадената популация и служи като ориентир за оценка на експресията на miRNA 199 при пациенти с БК и ЯК. В нашето проучване праговата стойност на miR-199 е 0.96 (AUC = 0.574 (0.444-0.705);  $p=0.241$ ) с чувствителност 60% и специфичност 60%. При сравняване на праговете стойности и тези от експресията на miR-199 се установяват сигнификантно по-високи серумни нива при пациентите с БК ( $2.39\pm 3.91$ ,  $p<0.05$ ), докато при пациентите с ЯК ( $1.08\pm 0.64$ ) не се установява подобна разлика.

Резултатите показват, че серумната експресия на miR-199 корелира правопрпорционално с възрастта при пациентите с БК. Не се установява съществена разлика в експресията на miR-199 според пола, тежестта, формата на протичане и давността на заболяването. При пациентите с БК се установява съществена разлика в експресията на miR-199, която е значително по-висока при тънкочревна локализация (L1) на болестта. miR-199 има правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.343$ ;  $p<0.05$ ), която показва, че в 11.76% от случаите повишената експресия на miR-199 може да се свърже с активност на БК. Хронично персистиращата форма (т.е. без формиране на ясно обособена ремисия) на ЯК корелира с високата експресия на miR-199. Умерената активност на ЯК корелира с повишената експресия на miR-199.

При изследване на нивото на FCP при пациенти с БК се установи, че експресията на miR-199 се увеличава при повишени нива на FCP ( $p=0.009$ ), като е намерена правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.461$ ;  $p=0.0063$ ) показваща, че в 21.3% от случаите повишената експресия на miR-199 се свързва с повишените нива на FCP при пациенти с това заболяване. Високата експресия на miR-199 се явява рисков фактор за повишаване нивата на FCP при пациенти с БК (OR=10.0 (0.739-135.327);  $p<0.05$ ).

**Табл. 39. Характеристика на пациентите с IBD според Монреалската класификация и експресия на miR-199**

| Показател               |                          | Пациенти                                   |   | Експресия на miR-199 |                    |
|-------------------------|--------------------------|--|---|----------------------|--------------------|
|                         |                          | БК<br>(n=35)                               | ЯК<br>(n=35)                                | БК<br>(n=35)         | ЯК<br>(n=35)       |
| Възраст, год.           | mean±SD, range           | 41.51±13.55<br>(18-75)                     | 41.54±15.21<br>(18-73)                      | r=0.365<br>p=0.031   | r=0.226<br>p=0.192 |
| Пол                     | Мъже                     | 18/51.4%                                   | 15/ 42.9%                                   | 2.07±1.95            | 0.97±0.29          |
|                         | Жени                     | 17/48.6%                                   | 20/ 57.1%                                   | 2.73±5.29            | 1.17±0.82          |
| Локализация<br>* БК/ЯК  | L1/E1                    | 19/54.3%                                   | 1/ 2.9%                                     | <b>3.49±5.08</b>     | 0.69               |
|                         | L2/E2                    | 5/4.3%                                     | 11/ 31.4%                                   | <b>0.92±0.12</b>     | 1.12±0.90          |
|                         | L3/E3                    | 11/31.4%                                   | 23/ 65.7%                                   | <b>1.17±0.55</b>     | 1.08±0.53          |
| Форма на<br>протичане*  | B1                       | 17/48.6%                                   | -   | 2.40±5.34            | -                  |
|                         | B2                       | 11/31.4%                                   | -   | 2.40±2.29            | -                  |
|                         | B3                       | 6/17.1%                                    | -   | 2.47±1.32            | -                  |
|                         | B2-B3                    | 1/ 2.9%                                    | -   | 1.82                 | -                  |
|                         | Хронично<br>рецидивираща | -  | 28/ 80.0%                                   | -                    | <b>0.99±0.52</b>   |
|                         | Хронично<br>персистираща | -  | 7/ 20.0%                                    | -                    | <b>1.42±0.98</b>   |
| Давност на<br>IBD, мес. | mean±SD, range           | 66.91±59.67<br>(3-204)                     | 113.03±119.10<br>(1-492)                    | r=0.062<br>p=0.722   | r=0.117<br>p=0.502 |
| FCP                     | (mean±SD, range)         | <b>251.36±306.1</b><br><b>(2.00-910.0)</b> | <b>680.03±559.3</b><br><b>(12.5-1800.0)</b> | r=0.455<br>p=0.066   | r=0.066<br>p=0.808 |
|                         | < 50µg/g                 | 4/23.5%                                    | 4/25.0%                                     | 0.67±0.25            | 1.10±0.57          |
|                         | > 50µg/g                 | 13/76.5%                                   | 12/75.0%                                    | 1.84±1.45            | 1.11±0.84          |
| CDAI                    | Ремисия                  | 18/52.9%                                   | -   | 2.52±5.19            | -                  |
|                         | Лека активност           | 5/14.7%                                    | -   | 1.80±1.32            | -                  |
|                         | Умерена активност        | 11/ 31.4%                                  | -   | 2.14±1.89            | -                  |
| S (severity)*           | Ремисия                  | -  | -   | -                    | <b>0.94±0.43</b>   |
|                         | Лека активност           | -  | -   | -                    | <b>1.11±0.65</b>   |
|                         | Умерена активност        | -  | -   | -                    | <b>1.73±1.24</b>   |
|                         | Тежка активност          | -  | -   | -                    | <b>0.89±0.34</b>   |
| Mayo score              | Ремисия                  | -  | -   | -                    | 1.17±0.79          |
|                         | Лека активност           | -  | -   | -                    | 1.01±0.42          |
|                         | Умерена активност        | -  | -   | -                    | 1.02±1.04          |
|                         | Тежка активност          | -  | -   | -                    | 1.13±0.25          |
| Лечение                 | 5-АСА                    | 2/ 5.7%                                    | 12/ 34.3%                                   | 2.25±2.38            | 0.94±0.38          |
|                         | КС                       | 7/ 20.0%                                   | 8/ 22.9%                                    | 1.24±0.31            | 1.34±0.96          |
|                         | Имуномодулатори          | 2/ 5.7%                                    | 3/ 8.6%                                     | 1.24±0.53            | 1.01±0.37          |
|                         | Биологично<br>лечение    | 24/ 68.6%                                  | 12/ 34.3%                                   | 2.63±4.55            | 1.06±0.68          |

r – коефициент на корелация; в удебелен шрифт са стойностите, при които p<0.05;

\* Монреалска класификация

### miR-363\_1

Не се установи разлика в експресията на miR-363\_1 при пациентите с ЯК и БК (Табл. 40).



**Табл. 40. Серумна експресия на miR-363 според някои характеристики на изследваните лица**

| Показател                         |                       | Болест на Крон (n=35) | Изменение спрямо праговата стойност | Язвен колит (n=35) | Изменение спрямо праговата стойност |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| Пол                               | Мъже                  | 2.65±1.84             | 6↓/12↑                              | 1.79±1.16          | 7↓/8↑                               |
|                                   | Жени                  | 2.13±1.08             | 6↓/11↑                              | 2.14±1.80          | 7↓/13↑                              |
| Локализация БК/ЯК                 | L1/E1                 | 2.72±1.78             | 6↓/13↑                              | 2.84               | 1↑                                  |
|                                   | L2/E2                 | 2.21±0.90             | 1↓/4↑                               | 1.88±0.97          | 3↓/8↑                               |
|                                   | L3/E3                 | 1.93±1.18             | 5↓/6↑                               | 2.00±1.80          | 11↓/12↑                             |
| Форма на протичане                | B1                    | 2.22±1.21             | 7↓/10↑                              | -                  | -                                   |
|                                   | B2                    | 2.35±2.01             | 4↓/7↑                               | -                  | -                                   |
|                                   | B3                    | 2.52±1.17             | 1↓/5↑                               | -                  | -                                   |
|                                   | B2-B3                 | 5.20                  | 1↑                                  | -                  | -                                   |
|                                   | Хронично рецидивираща | -                     | -                                   | 1.82±1.19          | 11↓/17↑                             |
|                                   | Хронично персистираща | -                     | -                                   | 2.66±2.57          | 3↓/4↑                               |
| CDAI Crohn Disease Activity Index | Ремисия               | 2.20±1.12             | 6↓/12↑                              | -                  | -                                   |
|                                   | Лека активност        | 1.71±1.17             | 3↓/2↑                               | -                  | -                                   |
|                                   | Умерена активност     | 3.01±2.12             | 3↓/8↑                               | -                  | -                                   |
| Mayo score Ендоскопски            | Ремисия               | -                     | -                                   | 2.23±1.51          | 3↓/5↑                               |
|                                   | Лека активност        | -                     | -                                   | 1.74±0.66          | 3↓/7↑                               |
|                                   | Умерена активност     | -                     | -                                   | 1.58±1.39          | 4↓/4↑                               |
|                                   | Тежка активност       | -                     | -                                   | 2.42±2.36          | 4↓/5↑                               |
| S (severity)                      | Ремисия               | -                     | -                                   | 1.45±0.85          | 4↓/4↑                               |
|                                   | Лека активност        | -                     | -                                   | 2.29±1.37          | 4↓/9↑                               |
|                                   | Умерена активност     | -                     | -                                   | 3.40±3.06          | 4↑                                  |
|                                   | Тежка активност       | -                     | -                                   | 1.47±1.14          | 6↓/4↑                               |
| CRP                               | < 5 mg/l              | 2.26±1.28             | 5↓/11↑                              | 2.19±1.32          | 6↓/10↑                              |
|                                   | ≥ 5 mg/l              | 2.51±1.73             | 7↓/12↑                              | 1.82±1.85          | 6↓/9↑                               |
| Витамин D (25(OH)D)               | < 50 nmol/L           | 2.48±1.72             | 6↓/11↑                              | 2.49±1.93          | 3↓/11↑                              |
|                                   | ≥ 50 nmol/L           | 2.89±1.37             | 1↓/9↑                               | 2.21±1.31          | 3↓/6↑                               |
| Витамин B12                       | < 156 ng/L            | 2.45±1.25             | 2↓/6↑                               | 1.70±0.01          | 2↑                                  |
|                                   | ≥ 156 ng/L            | 2.65±1.19             | 3↓/12↑                              | 2.16±1.82          | 6↓/10↑                              |
| Лечение                           | 5-ACA                 | 2.89±1.19             | 2↑                                  | 1.51±1.09          | 2↓/6↑                               |
|                                   | КС                    | 2.96±2.41             | 2↓/5↑                               | 1.94±0.73          | 7↓/5↑                               |
|                                   | Имуномодулатори       | 1.55±0.84             | 1↓/1↑                               | 2.28±1.69          | 4↓/8↑                               |
|                                   | Биологично лечение    | 2.26±1.27             | 9↓/15↑                              | 2.44±2.21          | 1↓/2↑                               |

↑ повишена експресия      ↓ понижена експресия

Въпреки, че не се установява съществена разлика в експресията на miR-363\_1 може да се каже, че при жените, обширен обхват и възпалителна форма на БК се наблюдава понижена експресия. При пациентите с ЯК понижена експресия се наблюдава при мъже, ляв колит и

хронично рецидивираща форма.

От гледна точка на лечението понижена експресия на miR-363\_1 при пациентите с БК се установява при приложение на имуномодулатори, а при пациентите с ЯК на 5- АСА.

При извършване на по-детайлен анализ на експресията на miR-363\_1 спрямо пациентите в активност и ремисия на БК се установи, че при мъжете експресията на miRNA е понижена значително ( $p < 0.05$ ; съответно от 2.94 на 1.89), докато при жените не се установява подобна разлика (съответно 2.20 към 2.07). От гледна точка на обхвата може да се каже, че при обширен обхват (L3) експресията на miR-363\_1 е понижена значително при ремисия, приблизително 3 пъти, от 2.54 в активност до 0.87 в ремисия ( $p < 0.01$ ), като тази стойност е под установената прагова стойност при здрави контроли.

Според фенотипната изява на БК, активността, измерена чрез CDAI, CRP, Витамин В12 и Витамин D също не се установи разлика в експресията на miR-363\_1.

При анализа на експресията на miR-363\_1 в активност и ремисия на пациентите с ЯК не се установи разлика според изследваните показатели.

### **miR-451\_1**

Средната стойност на серумната експресия на miR-451\_1 при пациентите с БК е по-висока сравнение с тези с ЯК ( $2.37 \pm 1.63$  за БК и  $1.72 \pm 1.03$  за ЯК;  $p = 0.05$ ). Подобни резултати се отчитат и по отношение на активността на заболяването ( $2.72 \pm 1.79$  за БК и  $1.52 \pm 0.85$  за ЯК;  $p = 0.011$ ), докато по отношение на ремисията не се наблюдава съществена разлика в серумната експресия на изследваната miRNAa.

Резултатите за експресията на miR-451\_1 показват повишена експресия при пациентите в активност, като по отношение на праговата стойност, броят на пациентите с повишена експресия е 4 пъти по-висок от тези с понижена, докато при пациентите в ремисия преобладава броят на тези с понижена експресия.

На табл. 41 е представена експресията на miR-451\_1 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК.

**Табл. 41. Експресия на miR-451 според основните характеристики на пациентите с БК и ЯК**

| Основни показатели |                            | Експресия на miR-451 (mean±SD) |                  | Изменение в експресията на miR-451 спрямо праговата стойност при здрави контроли |           |
|--------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------|--|-----------|
|                    |                            | БК (n=35)                      | ЯК (n=35)        | БК (n=35)  | ЯК (n=35) |
| Локализация БК/ЯК  | L1/E1                      | 2.49±1.84                      | 1.81             | 6↓/13↑   | 1↑        |
|                    | L2/E2                      | 2.51±1.59                      | 1.67±0.68        | 2↓/3↑  | 5↓/6↑     |
|                    | L3/E3                      | 2.11±1.36                      | 1.75±1.20        | 5↓/6↑  | 10↓/13↑   |
| Форма на протичане | B1                         | 2.22±1.26                      | -                | 8↓/9↑  | -         |
|                    | B2                         | 2.08±1.16                      | -                | 3↓/8↑  | -         |
|                    | B3                         | 2.24±1.19                      | -                | 2↓/4↑  | -         |
|                    | B2-B3                      | 8.96                           | -                | 1↑   | -         |
|                    | Хронично рецидивираща      | -                              | 1.74±1.09        | -  | 12↓/16↑   |
|                    | Хронично персистираща      | -                              | 1.65±0.83        | -  | 3↓/4↑     |
| CDAI               | Ремисия                    | <b>2.23±1.26</b>               | -                | 8↓/10↑   | -         |
|                    | Лека активност             | <b>1.79±1.12</b>               | -                | 2↓/3↑  | -         |
|                    | Умерена активност          | <b>2.86±2.33</b>               | -                | 3↓/8↑  | -         |
| S (severity)       | Ремисия                    | -                              | 1.72±1.18        | -  | 5↓/3↑     |
|                    | Лека активност             | -                              | 1.98±1.15        | -  | 3↓/10↑    |
|                    | Умерена активност          | -                              | 2.18±0.51        | -  | 1↓/3↑     |
|                    | Тежка активност            | -                              | 1.21±0.76        | -  | 6↓/4↑     |
| Mayo score         | Ремисия                    | -                              | 1.99±1.51        | -  | 3↓/5↑     |
|                    | Лека активност             | -                              | 2.02±0.88        | -  | 4↓/6↑     |
|                    | Умерена активност          | -                              | 1.16±0.75        | -  | 5↓/3↑     |
|                    | Тежка активност            | -                              | 1.66±0.83        | -  | 3↓/6↑     |
| Лечение            | 5-Аминосалицилова киселина | 2.25±1.08                      | 1.83±0.74        | 2↓/5↑  | 3↓/5↑     |
|                    | Кортикостероиди            | 2.48±1.68                      | 1.35±0.71        | 1↓/1↑  | 6↓/6↑     |
|                    | Имунни модулатори          | 2.48±1.84                      | 2.07±1.41        | 9↓/15↑   | 5↓/7↑     |
|                    | Биологично лечение         | 1.45±1.01                      | 1.53±0.96        | 1↓/1↑  | 1↓/2↑     |
| Витамин B12        | < 156 ng/L                 | <b>2.93±2.47</b>               | 1.37±0.13        | 0↓/8↑  | 2↓/0↑     |
|                    | ≥ 156 ng/L                 | <b>2.52±1.31</b>               | 1.71±0.86        | 6↓/9↑  | 5↓/11↑    |
| Витамин D          | < 50 nmol/L                | <b>2.96±2.36</b>               | <b>2.14±1.45</b> | 4↓/13↑   | 4↓/10↑    |
|                    | ≥ 50 nmol/L                | <b>2.25±1.06</b>               | <b>1.81±0.68</b> | 4↓/6↑  | 3↓/6↑     |

**В удебелен шрифт са стойностите, при които  $p < 0.05$ ; ↑ = повишена експресия; ↓ = понижена експресия**

Не се установи съществена разлика в серумните нива на miR-451\_1 според локализацията и формата на протичане на БК, но може да се

каже, че при пациентите с тънкочревна (L1 – 2.49), дебелочревна (L2 – 2.51) локализация и пенетриращ фенотип (2.24) се наблюдава повишена експресия. Повишената серумна експресия на miR-451\_1 при пациентите с БК се свързва с умерена активност, измерена чрез CDAI (2.86). При лечението с кортикостероиди и имуномодулатори (Азатиоприн) се наблюдава еднакво повишена експресия на miR-451 (2.48).

При пациентите с ЯК не се установи значима разлика в нивата на серумната експресия на miR-451\_1 според локализацията, формата на протичане и активността на заболяването, измерена чрез две оценъчни скали. За разлика от пациентите с БК, при пациентите с ЯК серумната експресия на miR-451 е значително по-ниска при кортикостероидно лечение (1.35 за ЯК към 2.48 за БК).

При изследване на серумното ниво на Витамин В12 при пациенти с БК се установи, че експресията на miR-451\_1 е висока при ниски нива на витамина ( $p=0.05$ ), като е намерена обратнопропорционална умерена зависимост ( $r=-0.434$ ;  $p=0.039$ ), показваща, че в 18.8% от случаите повишената експресия на miR-451\_1 може да се наблюдава при ниски серумни нива на Витамин В12 при пациентите с БК. При пациентите с ЯК не се установи връзка между серумните нива на Витамин В12 и експресията на miR-451\_1.

При анализ на серумната експресия на miR-451\_1 при пациенти с IBD се установи, че експресията на miRNA-ата е по-висока при пациенти нива на Витамин D < 50 nmol/L ( $2.05\pm 0.92$ ) спрямо експресията при пациенти с Витамин D  $\geq 50$  nmol/L ( $1.85\pm 1.07$ ) ( $p=0.022$ ). Подобна на тази тенденция се установява както при пациентите с БК, така и при пациентите с ЯК. Установява се повишена експресия на miR-451 при пациентите с нива на Витамин D < 50 nmol/L (съответно 2.96 за БК и 2.14 за ЯК). Повишената експресия на miR-451 при пациенти с ЯК корелира с наличието на интестинални усложнения (стенози, стриктури, псевдополипоза) ( $2.08\pm 1.17$ ;  $p=0.032$ ) и екстраинтестинални прояви ( $1.80\pm 1.11$ ;  $p=0.038$ ). При пациентите с БК не се установи разлика в серумната експресия на miRNA-ата по отношение на интестиналните усложнения и екстраинтестиналните прояви.

### **miR-1228-3p\_1**

При изследване на серумната експресия на miR-1228 при здрави контроли, пациенти с ЯК и БК се установи съществена разлика ( $p=0.037$ ). Експресията при пациентите с БК ( $1.91\pm 2.21$ ) е значително по-висока в

сравнение с тази при пациентите с ЯК ( $1.15 \pm 0.64$ ) и здрави контроли ( $1.14 \pm 0.59$ ). Няма разлика в серумната експресия на miR-1228 според пола на пациентите.

На табл. 42 е представена експресията на miR-1228. Резултатите от анализа показват, че има съществена разлика в серумната експресия на miR-1228 според вида на заболяването и неговата активност. При пациентите с БК се наблюдава повишена експресия на miR-1228 при тънкочревна локализация (L1 – 2.28) и активна болест, както и при дебелочревна локализация (L2 – 2.50) в ремисия. При пациентите с активна БК се установи повишена експресия на miR-1228 при пенетриращ фенотип (B3 – 3.92). Не се установи разлика според степента на активност.

При пациентите с ЯК не се установява разлика в експресията на miR-1228 според локализацията и формата на протичане, но се установи повишена експресия при пациентите с тежка активност, измерена чрез Монреалската класификация (S - severity).

При изследване на серумното ниво на CRP при пациенти с ЯК се установи, че при ниска експресията на miR-1228 има ниски нива на CRP и обратно при висока експресия на miR се наблюдават при високи серумни нива на CRP ( $p=0.027$ ). Намерена е правопрпорционална умерена зависимост ( $r=0.393$ ;  $p=0.024$ ), показваща, че в 15.4 % от случаите вида на експресия на miR-1228 се свързва с различните нива на CRP при пациенти с ЯК. Високата експресия на miR-1228 се явява рисков фактор за високи нива на CRP при пациенти с ЯК (OR=5.28 (1.196-23.317);  $p<0.05$ ). Експресията miR-1228 е увеличена при пациенти с БК при нормални серумни нива на Витамин D.

При пациентите с ЯК, които са на биологично лечение (Adalimumab) се наблюдава понижаване на експресията на miR-1228 до стойност близка до праговата стойност при здрави индивиди. При пациентите с БК, ниската експресия на miR-1228 корелира с лечение с имunosупресор (Azathioprine).

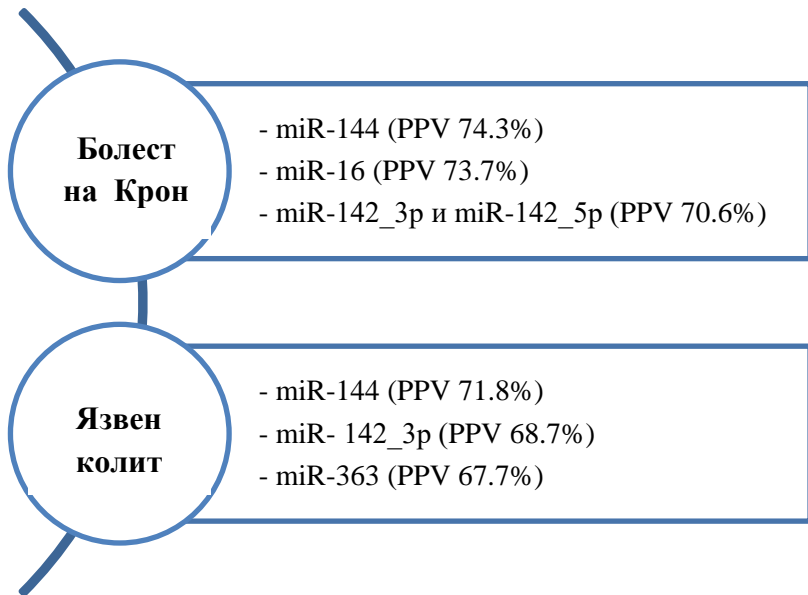
При определянето на прогностичните стойности на изследваните miRNAs за разграничаване на БК и ЯК от здрави контроли се откриха пет различни miRNAs с висока позитивна предсказваща роля за съответното заболяване (Фиг. 4).

**Табл. 42. Серумна експресия на miR-1228 според някои характеристики на изследваните лица**

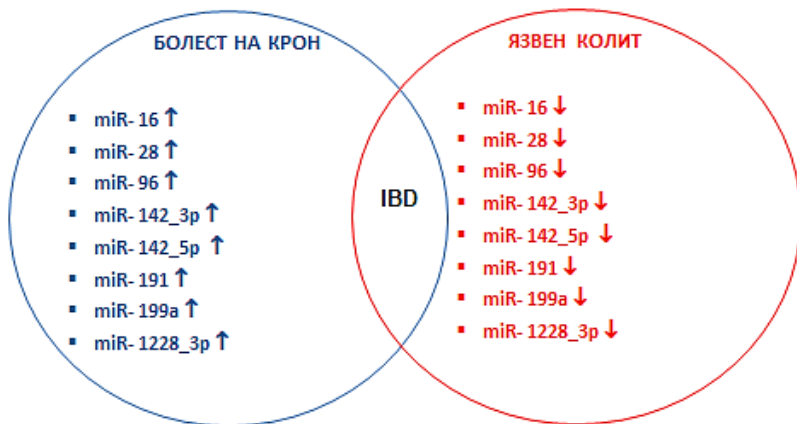
| Показател              |                       | Активен БК (n=20) | Ремисия БК (n=15) | Активен ЯК (n=20) | Ремисия ЯК (n=15) |
|------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Пол                    | Мъже                  | 2.08±2.90         | 1.19±0.54         | 1.12±0.68         | 1.27±0.66         |
|                        | Жени                  | 2.24±1.61         | 1.82±2.21         | 1.10±0.71         | 1.14±0.57         |
| Локализация БК/ЯК      | L1/E1                 | <b>2.28±2.71</b>  | <b>1.32±0.94</b>  | -                 | 1.43              |
|                        | L2/E2                 | -                 | <b>2.50±2.97</b>  | 0.98±0.62         | 1.36±0.81         |
|                        | L3/E3                 | <b>1.87±2.15</b>  | <b>0.94±0.27</b>  | 1.19±0.73         | 1.15±0.60         |
| Форма на протичане     | B1                    | <b>1.34±0.72</b>  | 1.74±1.99         | -                 | -                 |
|                        | B2                    | <b>1.75±1.58</b>  | 1.45±0.88         | -                 | -                 |
|                        | B3                    | <b>3.92±4.26</b>  | 0.43              | -                 | -                 |
|                        | B2-B3                 | <b>0.79</b>       | -                 | -                 | -                 |
|                        | Хронично рецидивираща | -                 | -                 | 1.02±0.59         | 1.21±0.60         |
|                        | Хронично персистираща | -                 | -                 | 1.28±0.85         | -                 |
| CDAI                   | Ремисия               | -                 | 1.18±0.66         | -                 | -                 |
|                        | Лека активност        | 2.83±2.86         | -                 | -                 | -                 |
|                        | Умерена активност     | 2.83±3.16         | -                 | -                 | -                 |
| Mayo score Ендоскопски | Ремисия               | -                 | -                 | -                 | 1.21±0.51         |
|                        | Лека активност        | -                 | -                 | 1.05±0.67         | -                 |
|                        | Умерена активност     | -                 | -                 | 1.35±0.81         | -                 |
|                        | Тежка активност       | -                 | -                 | 1.03±0.62         | -                 |
| S (severity)           | Ремисия               | -                 | -                 | -                 | <b>1.19±0.57</b>  |
|                        | Лека активност        | -                 | -                 | <b>1.06±0.55</b>  | -                 |
|                        | Умерена активност     | -                 | -                 | <b>1.48±0.73</b>  | -                 |
|                        | Тежка активност       | -                 | -                 | <b>2.28±0.64</b>  | -                 |
| CRP                    | < 5 mg/l              | <b>3.18±3.94</b>  | <b>1.94±2.04</b>  | <b>0.54±0.29</b>  | <b>1.02±0.43</b>  |
|                        | ≥ 5 mg/l              | <b>1.79±1.83</b>  | <b>0.72±0.32</b>  | <b>1.35±0.66</b>  | <b>1.65±0.78</b>  |
| Витамин D (25(OH)D)    | < 50 nmol/L           | <b>1.79±1.82</b>  | <b>0.79±0.19</b>  | 1.05±0.52         | 1.50±0.47         |
|                        | ≥ 50 nmol/L           | <b>3.17±3.97</b>  | <b>2.15±3.15</b>  | 1.49±1.07         | 1.07±0.68         |
| Лечение                | 5-АСА                 | 2.57              | 0.75              | 0.83±0.61         | 1.25±0.64         |
|                        | КС                    | 2.18±2.17         | 0.65              | 1.49±0.71         | -                 |
|                        | Имуномодулатори       | 0.39              | 0.81              | 1.35±0.32         | 2.01              |
|                        | Биологично лечение    | 2.23±2.86         | 1.83±1.98         | 0.59±0.36         | 1.09±0.58         |

**В удебелен шрифт са стойностите, при които p<0.05**

На фиг. 5 нагледно е представена промяната в експресията на изследваните miRNAs, които имат връзка с БК или ЯК. Резултатите от проведените до момента анализи показват, че при пациенти с БК като цяло може да се очаква повишена експресия, докато при пациентите с ЯК стойностите на циркулиращите miRNAs също показват повишена експресия спрямо здравите контроли, но тя е значително по-ниска от тази на пациентите с БК.



**Фиг. 4. Прогностична стойност на отделни miRNAs за разграничаване на БК и ЯК от здрави контроли**



**Фиг. 5. Разграничаване на БК от ЯК посредством експресията на изследваните miRNAs**

**Табл. 43. Промяна в експресията на отделни miRNAs при ремисия и активност на БК**

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Ремисия</b>                  | ➤ miR-28 ↑   |
| <b>Активност</b>                | ➤ miR -16 ↑<br>➤ miR-29c ↑<br>➤ miR-96 ↑<br>➤ miR-142_3p ↑<br>➤ miR-191 ↑<br>➤ miR-451 ↑ |
| <b>CDAI – лека активност</b>    | ➤ miR-28 ↓<br>➤ miR-142_5p ↑<br>➤ miR-155 ↑  |
| <b>CDAI – умерена активност</b> | ➤ miR-16 ↑<br>➤ miR-96 ↑<br>➤ miR-142_3p ↑<br>➤ miR-363 ↑                                |

**Табл. 44. Промяна в експресията на отделни miRNAs при ремисия, активност и тежест на ЯК**

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>Ремисия</b>                        | ➤ miR-29c ↑<br>➤ miR-142_5p ↑                            |
| <b>Активност</b>                      | ➤ miR-155 ↑  |
| <b>Тежест S2</b>                      | ➤ miR -16 ↑<br>➤ miR-96 ↑<br>➤ miR-199a ↑<br>➤ miR-363 ↑ |
| <b>Тежест S3</b>                      | ➤ miR-29c ↓<br>➤ miR-155 ↑<br>➤ miR-1228_3p ↑            |
| <b>Ендоскопска активност Мейо 0-1</b> | ➤ miR-142_5p ↑   |
| <b>Ендоскопска активност Мейо 2</b>   | ➤ miR-144 ↓<br>➤ miR-155 ↑                               |

Видовете и експресията на изследваните miRNAs се различават съществено при пациентите с БК и ЯК, което ги прави разграничими по отношение на активността и тежестта на заболяването.

Подобно разграничение се наблюдава също според локализацията и формата на протичане, което показва, че експресията на конкретна



miRNA може да насочи клинициста за определяне локализацията и поведение на болестта още при нейното откриване.

| Локализация   | Форма на протичане  |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• L1                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-28 ↑</li> <li>• miR-142_5p ↑</li> <li>• miR-191 ↑</li> <li>• miR-199a ↑</li> </ul> </li> <li>• L2                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-155 ↑</li> <li>• miR-1228_3p ↑</li> </ul> </li> <li>• L3                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-96 ↑</li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• B1                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-16 ↓</li> </ul> </li> <li>• B2                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-28 ↑</li> </ul> </li> <li>• B3                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-142_3p ↑</li> <li>• miR-142_5p ↑</li> <li>• miR-1228_3p ↑</li> </ul> </li> </ul> |

**Фиг. 6.** Връзка между видовете miRNAs и посоката на експресия с локализацията и формата на протичане на БК

| Локализация   | Форма на протичане  |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• E1                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-199a ↓ - доближаване до праговата стойност при здрави контроли</li> </ul> </li> <li>• E2                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-96 ↓</li> </ul> </li> <li>• E3                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-155 ↑</li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Хронично персистиращо                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-155 ↑ (OR 2.50)</li> <li>• miR-191 ↑ (OR 6.92)</li> <li>• miR-199a ↑ (OR 3.86)</li> </ul> </li> </ul> |

**Фиг. 7.** Връзка между видовете miRNAs и посоката на експресия с локализацията и формата на протичане на ЯК

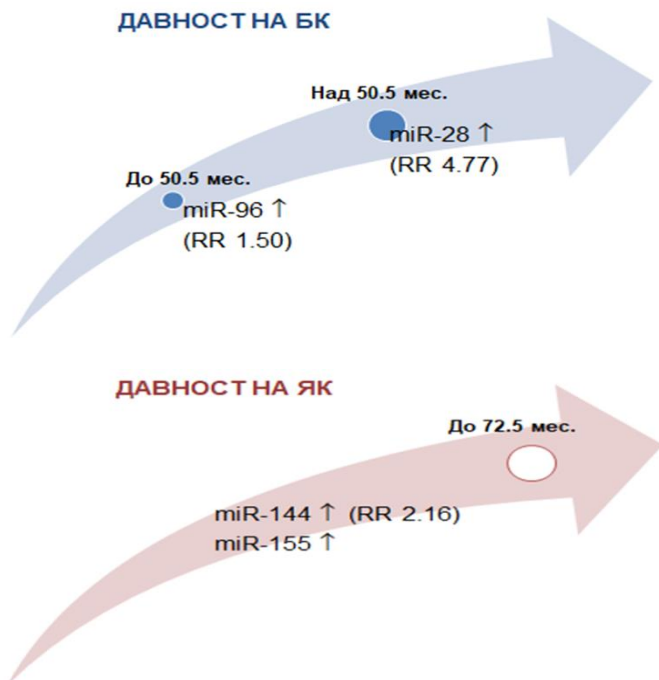
На табл.45 се вижда, че miRNAs имат различно поведение при интестиналните усложнения и екстраинтестиналните прояви при пациенти с БК и ЯК, което е насочващ показател за очакваните усложнения при конкретните пациенти, типа на протичане и тежестта на съответната болест, както и необходимостта от проактивно лечение и наблюдение.

**Табл. 45. Промяна в експресията при интестиналните усложнения и екстраинтестиналните прояви при пациенти с БК и ЯК**

|                                      | <b>БОЛЕСТ НА КРОН</b>  | <b>ЯЗВЕН КОЛИТ</b>  |
|--------------------------------------|--|---|
| <b>ИНТЕСТИНАЛНИ<br/>УСЛОЖНЕНИЯ</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ miR-16 ↑</li> <li>➤ miR-28 ↓</li> <li>➤ miR-142_3p ↑</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ miR-16 ↑</li> <li>➤ miR-142_3p ↓</li> <li>➤ miR-144 ↑</li> <li>➤ miR-155 ↓</li> <li>➤ miR-363 ↑</li> <li>➤ miR-451 ↑</li> </ul>  |
| <b>ЕКСПРАИНТЕСТИНАЛНИ<br/>ПРОЯВИ</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ miR-16 ↓</li> <li>➤ miR-28 ↑</li> <li>➤ miR-96 ↓</li> <li>➤ miR-142_3p ↓</li> <li>➤ miR-199a ↑</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ miR-16 ↑</li> <li>➤ miR-142_5p ↑</li> <li>➤ miR-142_3p ↑</li> <li>➤ miR-144 ↑</li> <li>➤ miR-155 ↑</li> <li>➤ miR-191 ↑</li> <li>➤ miR-363 ↑</li> <li>➤ miR-451 ↑</li> </ul> |

Въз основа на публикуваните данни за закъсняване при поставяне на диагнозата на БК средно с 4 г. и 8 мес. (Георгиева, 2018; Пенчев, 2009), бяха определени прагови стойности за давност на болестта 50.5 мес. Тази стойност показва, че еволюцията на болестта е свързана с промяна в експресията на основни miRNAs и приложението им при новооткрити пациенти може да помогне в преценка за давността на съответното заболяване към момента на диагностициране.

Анализът на експресията на изследваните miRNAs по време на различни терапевтични режими разкрива, че отговорът на терапията е свързан с ниски нива на експресията на дадена miRNA, чиято циркулация е висока по време на активността на съответното заболяване. Персистирането на висока серумна експресия на miRNA характерна за активна болест, показва първична липса на отговор или загуба на отговор в хода на дадено лечение.



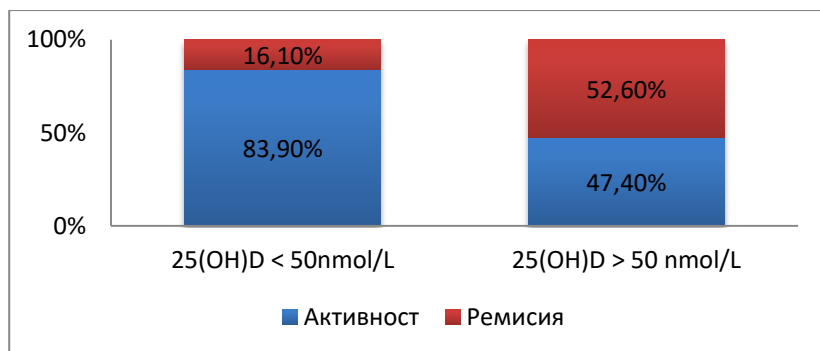
**Фиг. 8. Експресия на някои miRNAs според давността на заболяването**

**Табл. 46. Връзка между експресията на дадени miRNAs и приложеното лечение при пациенти с IBD**

| ЛЕЧЕНИЕ            | БОЛЕСТ НА КРОН                                  | ЯЗВЕН КОЛИТ  |
|--------------------|---|--|
| КОРТИКОСТЕРОИДИ    | ➤ miR-96 ↑                                      | ➤ miR-142_3p ↑<br>➤ miR-155 ↑                                      |
| 5-АСА              | ➤ miR-144 ↑                                     | ➤ miR-16 ↓<br>➤ miR-142_5p ↓                                       |
| АЗАТИОПРИН         | ➤ miR-28 ↓<br>➤ miR-142_3p ↓<br>➤ miR-1228_3p ↓ | ➤ miR-96 ↓ - под праговата стойност при здрави контроли            |
| БИОЛОГИЧНА ТЕРАПИЯ | ➤ miR-28 ↑                                      | ➤ miR-1228_3p ↓ - доближава праговата стойност при здрави контроли |

**4.6. Изследване на серумната експресия на съответните miRNAs: \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 при пациенти с IBD и се сравни със серумните нива на Витамин D (Задача 5)**

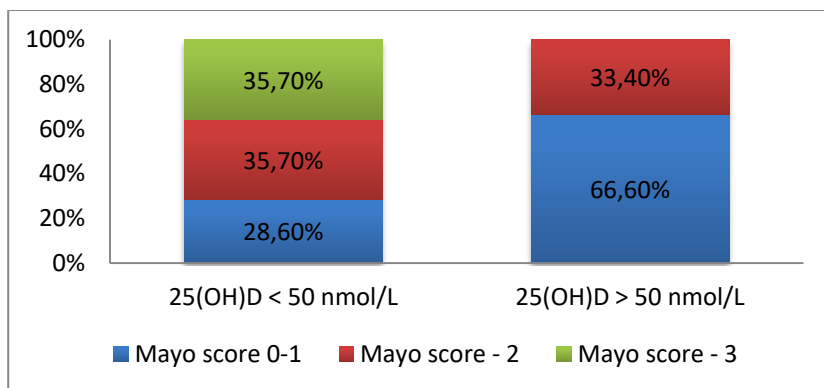
Средните серумни нива на експресия на Витамин D (25(OH)D) при пациентите с IBD е  $44.14\text{nmol/L} \pm 17.47\text{nmol/L}$ , като варира от  $2.76\text{nmol/L}$  до  $90.65\text{nmol/L}$ . Не беше установена връзка между серумните нива на Витамин D и възрастта на пациентите. Жените с IBD имат пониски нива на Витамин D спрямо мъжете (съответно  $40.72\text{nmol/L} \pm 16.38\text{nmol/L}$  за жените и  $47.84\text{nmol/L} \pm 18.20\text{nmol/L}$  за мъжете). Има съществена разлика ( $p=0.007$ ) в серумните нива на експресия на Витамин D при пациенти с активност ( $39.83\text{nmol/L} \pm 15.32\text{nmol/L}$ ) и тези тези в ремисия ( $54.19\text{nmol/L} \pm 18.54\text{nmol/L}$ ). Активността на IBD е рисков фактор за понижаване серумните нива на Витамин D ( $OR=5.77$  ( $1.552-21.503$ ;  $p<0.01$ )). Относителният дял на пациентите с IBD, които са със серумни нива на Витамин D до  $50\text{nmol/L}$  е  $62.0\%$ . Беше намерена обратнопропорционална умерена зависимост между активността на IBD, и Витамин D ( $r=-0.510$ ;  $p<0.01$ ) (Фиг. 9).



**Фиг. 9. Относителен дял на пациентите с IBD според нивата на Витамин D**

Средните серумни нива на експресия на Витамин D (25(OH)D) при пациентите с язвен колит е  $45.51\text{nmol/L} \pm 18.57\text{nmol/L}$ , като варира от

25.66nmol/L до 90.65nmol/L. Не беше установена връзка между серумните нива на Витамин D и възрастта на пациентите. Жените с ЯК имат по-ниски нива на Витамин D спрямо мъжете (съответно 34.75nmol/L±12.98nmol/L за жените и 55.58nmol/L±20.45nmol/L за мъжете). Има съществена разлика ( $p=0.043$ ) в серумните нива на Витамин D при пациенти с активност (40.32nmol/L±15.40nmol/L) и тези в ремисия (55.22nmol/L±21.07nmol/L). Активността на ЯК е рисков фактор за понижаване серумните нива на Витамин D (OR=4.58 (0.733-28.646;  $p<0.05$ )). Относителният дял на пациентите с ЯК, които са със серумни нива на Витамин D до 50nmol/L е 60.9%. Беше намерена обратнопропорционална умерена зависимост между активността на заболяването, измерена чрез частичния ендоскопски Mayo score и Витамин D ( $r=-0.412$ ;  $p=0.015$ ) (Фиг. 10).



**Фиг. 10. Зависимост между Mayo score и Витамин D**

Средната стойност на серумните нива на експресия на Витамин D (25(OH)D) при пациентите с БК е 42.97nmol/L±16.75nmol/L, като варира от 2.76nmol/L до 73.17nmol/L. Не беше установена връзка между серумните нива на Витамин D с пол и възраст на пациентите. Серумните нива на Витамин D показаха наличието на съществена разлика ( $p=0.043$ ) между пациентите с активност (39.45nmol/L±16.65nmol/L) и тези в ремисия (53.02nmol/L±16.76nmol/L). Активността на БК е рисков фактор за понижаване серумните нива на Витамин D (OR=7.5 (1.09-51.52;  $p<0.05$ )). Относителният дял на пациентите с БК, които са със серумни нива на Витамин D до 50nmol/L е 63.0%. Беше намерена обратнопропорционална умерена зависимост между активността на заболяването, измерена чрез

CDAI и Витамин D ( $r=-0.421$ ;  $p=0.029$ ), която показва, че при нарастването на CDAI серумните нива на Витамин D намаляват.

При IBD пациенти изследване на корелацията между Витамин D и най-често използваните в клиничната практика биомаркери, с които се отчита активност, CRP и FCP, се установи обратнопропорционална зависимост, която показва, че серумните нива на витамин D намаляват при повишени нива на CRP и FCP. Беше намерена слаба обратнопропорционална зависимост между CRP и Витамин D ( $r=-0.114$ ;  $p<0.05$ ).

Не бе установена зависимост между нивата на CRP и Витамин D при пациентите с ЯК.

При изследване на корелацията между Витамин D при пациентите с БК и най-често използваните в клиничната практика CRP и FCP бе намерена обратнопропорционална зависимост, която показва, че серумните нива на витамин D намаляват при повишени нива на CRP и FCP. Беше установена слаба обратнопропорционална зависимост между CRP и Витамин D ( $r=-0.202$ ;  $p<0.05$ ).

FCP е друг често използван биомаркер за проследяване активността при пациентите с IBD. При оценката на връзката на FCP със серумните нива на Витамин D, беше установена обратнопропорционална слаба към умерена зависимост ( $r=-0.259$ ;  $p<0.01$ ).

При оценка на връзката на FCP със серумните нива на Витамин D при пациенти с ЯК беше установена обратнопропорционална умерена зависимост ( $r=-0.363$ ;  $p<0.05$ ).

При оценка на връзката на FCP със серумните нива на Витамин D при пациенти с БК беше установена обратнопропорционална силна зависимост ( $r=-0.641$ ;  $p<0.001$ ).

На табл. 47 е представена експресията на някои miRNAs при пациенти с IBD спрямо серумните нива на Витамин D. Резултатите показват, че при част miRNAs има разлика в експресията спрямо серумните нива на Витамин D. Експресията на miR-28\_1 и miR-1228-3p\_1 е повишена при пациенти с нормални серумни нива на Витамин D. Докато останалите miRNAs имат повишена експресия при дефицит на Витамин D.

**Табл. 47. Експресия на miRNAs при пациенти с IBD спрямо серумните нива на Витамин D (25(OH)D)**

| miRNAs        | 25(OH)D<br>< 50 nmol/L | 25(OH)D<br>≥ 50 nmol/L | P<br>value | Експресия<br>miRNAs | Експресия<br>25(OH)D |
|---------------|------------------------|------------------------|------------|---------------------|----------------------|
| miR-16_2      | 3.02±1.90              | 2.85±2.02              | 0.970      | -                   | -                    |
| miR-28_1      | 1.92±1.57              | 3.09±6.0               | 0.006      | ↑                   | ↑                    |
| miR-29c_1     | 1.79±0.92              | 1.43±0.79              | 0.598      | -                   | -                    |
| miR-96_1      | 3.22±3.55              | 1.22±1.08              | 0.009      | ↑                   | ↓                    |
| miR-142-5p_1  | 2.51±2.22              | 1.62±0.87              | 0.015      | ↑                   | ↓                    |
| miR-142-3p_2  | 2.63±1.83              | 2.32±1.56              | 0.725      | -                   | -                    |
| miR-144_4     | 2.45±1.14              | 2.91±1.84              | 0.114      | -                   | -                    |
| miR-155_2     | 3.53±6.35              | 2.38±2.23              | 0.041      | ↑                   | ↓                    |
| miR-191_1     | 2.09±1.76              | 1.85±1.07              | 0.258      | -                   | -                    |
| miR-199a_1    | 2.40±4.13              | 1.42±0.94              | 0.049      | ↑                   | ↓                    |
| miR-363_1     | 2.49±1.78              | 2.57±1.35              | 0.744      | -                   | -                    |
| miR-451_1     | 2.05±0.92              | 1.85±1.07              | 0.022      | ↑                   | ↓                    |
| miR-1228-3p_1 | 1.44±1.34              | 1.99±2.58              | 0.059      | ↑                   | ↑                    |

В сиво в посочено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

Средните серумни нива на Витамин D при пациентите с IBD е  $44.14 \text{ nmol/L} \pm 17.47 \text{ nmol/L}$ , като варира от  $2.76 \text{ nmol/L}$  до  $90.65 \text{ nmol/L}$ . Резултатите показват, че експресията на miR-155 се различава спрямо серумните нива на Витамин D. При пациентите със серумни нива на Витамин D < 50 nmol/L, експресията на miR-155 е сигнификантно висока отколкото при пациентите с нива на Витамин D ≥ 50 nmol/L ( $3.53 \pm 6.35$  към  $2.38 \pm 2.23$ ;  $p = 0.041$ ). Повишената серумна експресия на miR-155 носи 1,24 пъти по-висок риск за дефицит на Витамин D.

Беше установена обратнопропорционална умерена зависимост между експресията на miR-142-5p\_1 и серумните нива на Витамин D ( $r = -0.362$ ;  $p < 0.01$ ), която показва, че повишената експресия на miR-142-5p\_1 може да бъде свързана с дефицит на Витамин D при 13,10% от случаите.

На табл. 48 е представена експресията на някои miRNAs при пациенти с ЯК спрямо серумните нива на Витамин D. Резултатите показват, че при шест miRNAs има разлика в експресията спрямо серумните нива на Витамин D. Експресията на miR-28\_1, miR-191\_1, miR-451\_1 и miR-1228-3p\_1 е повишена при пациенти с нормални серумни нива на Витамин D. В същото време miR-96\_1 и miR-155\_2 имат повишена експресия при дефицит на Витамин D.

**Табл. 48. Експресия на miRNAs при пациенти с ЯК спрямо серумните нива на Витамин D (25(OH)D)**

| miRNAs        | 25(OH)D < 50 nmol/L | 25(OH)D ≥ 50 nmol/L | P value | Експресия miRNAs | Експресия 25(OH)D |
|---------------|---------------------|---------------------|---------|------------------|-------------------|
| miR-16_2      | 2.32±1.24           | 2.34±1.73           | 0.571   | -                | -                 |
| miR-28_1      | 1.19±0.52           | 1.49±0.99           | 0.021   | ↑                | ↑                 |
| miR-29c_1     | 1.44±0.58           | 1.35±0.93           | 0.104   | -                | -                 |
| miR-96_1      | 2.22±1.89           | 1.66±1.31           | 0.050   | ↑                | ↓                 |
| miR-142-5p_1  | 1.66±1.02           | 1.37±0.88           | 0.966   | -                | -                 |
| miR-142-3p_2  | 1.78±0.45           | 1.89±1.37           | 0.140   | -                | -                 |
| miR-144_4     | 2.34±0.89           | 2.09±1.21           | 0.212   | -                | -                 |
| miR-155_2     | 4.34±8.58           | 1.45±0.95           | 0.025   | ↑                | ↓                 |
| miR-191_1     | 1.29±0.48           | 1.71±1.29           | 0.023   | ↑                | ↑                 |
| miR-199a_1    | 1.19±0.74           | 1.03±0.75           | 0.639   | -                | -                 |
| miR-363_1     | 2.49±1.93           | 2.21±1.31           | 0.732   | -                | -                 |
| miR-451_1     | 1.81±0.68           | 2.14±1.45           | 0.042   | ↑                | ↑                 |
| miR-1228-3p_1 | 1.15±0.53           | 1.26±0.84           | 0.029   | ↑                | ↑                 |

В сиво в посочено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия

На табл. 49 е представена експресията на някои miRNAs при пациенти с БК спрямо серумните нива на Витамин D. Резултатите показват, че при част miRNAs има разлика в експресията спрямо серумните нива на Витамин D. Експресията на miR-28\_1 и miR-1228-3p\_1 е повишена при пациенти с нормални серумни нива на Витамин D. Докато останалите miRNAs имат повишена експресия при дефицит на Витамин D.

**Табл. 49. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо серумните нива на Витамин D**

| miRNAs        | 25(OH)D < 50 nmol/L | 25(OH)D ≥ 50 nmol/L | P value | Експресия miRNAs | Експресия 25(OH)D |
|---------------|---------------------|---------------------|---------|------------------|-------------------|
| miR-16_2      | 3.59±2.17           | 3.31±2.24           | 0.739   | -                | -                 |
| miR-28_1      | 2.52±1.88           | 4.54±8.14           | 0.05    | ↑                | ↑                 |
| miR-29c_1     | 2.08±1.04           | 1.50±0.68           | 0.139   | -                | -                 |
| miR-96_1      | 4.04±4.38           | 0.82±0.65           | 0.024   | ↑                | ↓                 |
| miR-142-5p_1  | 3.22±2.69           | 1.84±0.85           | 0.012   | ↑                | ↓                 |
| miR-142-3p_2  | 3.33±2.22           | 2.71±1.69           | 0.188   | -                | -                 |
| miR-144_4     | 2.54±1.32           | 3.64±2.06           | 0.345   | -                | -                 |
| miR-155_2     | 3.14±2.69           | 2.80±3.73           | 0.687   | -                | -                 |
| miR-191_1     | 2.75±2.15           | 1.97±0.88           | 0.067   | ↑                | ↓                 |
| miR-199a_1    | 3.40±5.41           | 1.77±0.99           | 0.008   | ↑                | ↓                 |
| miR-363_1     | 2.48±1.72           | 2.88±1.37           | 0.958   | -                | -                 |
| miR-451_1     | 2.25±1.06           | 2.96±2.36           | 0.087   | -                | -                 |
| miR-1228-3p_1 | 1.68±1.74           | 2.66±3.42           | 0.05    | ↑                | ↑                 |

В сиво в посочено  $p < 0.05$  ↑ повишена експресия ↓ понижена експресия



При пациенти с БК беше установена обратнопропорционална слаба клоняща към умерена зависимост между експресията на miR-96\_1 и серумните нива на Витамин D ( $r=-0.289$ ;  $p<0.01$ ), която показва, че повишената експресия на miR-96\_1 може да бъде свързана с дефицит на Витамин D при 8.4% от случаите.

При пациенти с БК беше установена обратнопропорционална умерена зависимост между експресията на miR-142-5p\_1 и серумните нива на Витамин D ( $r=-0.474$ ;  $p<0.01$ ), която показва, че повишената експресия на miR-142-5p\_1 може да бъде свързана с дефицит на Витамин D при 22.5 % от случаите.

При пациенти с БК беше установена обратнопропорционална слаба, клоняща към умерена зависимост между експресията на miR-199a\_1 и серумните нива на Витамин D ( $r=-0.285$ ;  $p<0.05$ ), която показва, че повишената експресия на miR-199a\_1 може да бъде свързана с дефицит на Витамин D при 8.1% от случаите.

На табл. 51 е представен рисковият анализ на експресията на установените miRNAs спрямо серумните нива на Витамин D. Резултатите показват, че промяната в серумната експресия на miR-28\_1 носи най-голям риск за дефицит на Витамин D.

**Табл. 51. Рисков анализ на експресия на miRNAs при пациенти с IBD спрямо серумните нива на Витамин D**

| miRNAs        | OR   | 95% CI      | P value |
|---------------|------|-------------|---------|
| miR-28_1      | 1.78 | 0.470-6.789 | 0.301   |
| miR-96_1      | 1.41 | 0.698-2.866 | 0.252   |
| miR-142-5p_1  | 1.13 | 0.548-2.339 | 0.487   |
| miR-155_2     | 1.24 | 0.604-2.542 | 0.394   |
| miR-199a_1    | 1.19 | 0.353-4.018 | 0.513   |
| miR-451_1     | 1.36 | 0.670-2.766 | 0.303   |
| miR-1228-3p_1 | 1.72 | 0.810-3.627 | 0.122   |

На табл. 52 е представен рисковият анализ на експресията на установените miRNAs спрямо серумните нива на Витамин D при пациентите с ЯК. Резултатите показват, че промяната в серумната експресия на miR-1228-3p\_1 носи най-голям риск за дефицит на Витамин D.

На табл. 53 е представен рисковият анализ на експресията на установените miRNAs спрямо серумните нива на Витамин D при

пациентите с БК. Резултатите показват, че промяната в серумната експресия на miR-96\_1 носи най-голям риск за дефицит на Витамин D.

**Табл. 52. Рисков анализ на експресия на miRNAs при пациенти с ЯК спрямо серумните нива на Витамин D**

| miRNAs        | OR   | 95% CI       | P value |
|---------------|------|--------------|---------|
| miR-28_1      | 1.50 | 0.262-8.579  | 0.495   |
| miR-96_1      | 2.00 | 0.352-11.364 | 0.036   |
| miR-155_2     | 1.25 | 0.233-6.715  | 0.056   |
| miR-191_1     | 1.11 | 0.190-6.492  | 0.063   |
| miR-451_1     | 1.14 | 0.394-3.312  | 0.058   |
| miR-1228-3p_1 | 2.18 | 0.713-6.678  | 0,015   |

**Табл. 53. Рисков анализ на експресия на микроRNA при пациенти с БК спрямо серумните нива на Витамин D**

| miRNAs        | OR   | 95%CI        | P value |
|---------------|------|--------------|---------|
| miR-28_1      | 2.77 | 0.264-29.047 | 0.037   |
| miR-96_1      | 2.92 | 0.952-8.934  | 0.049   |
| miR-142-5p_1  | 1.22 | 0.431-3.476  | 0.052   |
| miR-191_1     | 1.67 | 0.257-10.792 | 0.047   |
| miR-199a_1    | 2.77 | 0.264-29.047 | 0.037   |
| miR-1228-3p_1 | 1.39 | 0.505-3.844  | 0.053   |

При пациенти с IBD и интестинални усложнения (илеус, субилеус, стеноза, фистулизация, абсцедиране, псевдополипоза) не се установи връзка между експресията на витамин D и изследваните miRNAs. При дефицит на Витамин D, на фона на лечение с кортикостероиди или моноклонални анти-TNF- антитела, се установи повишена експресия на всички изследвани miRNAs (Табл. 54).

При пациенти с БК и интестинални усложнения не се установи връзка между експресията на витамин D и изследваните miRNAs. При дефицит на Витамин D, лечение с кортикостероиди или анти-TNF антитела, се установи повишена експресия на всички изследвани miRNAs (Табл. 55).

**Табл. 54. Експресия на miRNAs при пациенти с IBD спрямо серумните нива на Витамин D при лечение с кортикостероиди**

| miRNAs        | 25(OH)D < 50 nmol/L | 25(OH)D ≥ 50 nmol/L | P value |
|---------------|---------------------|---------------------|---------|
| miR-16_2      | 3.09±1.83           | 1.91±0.88           | < 0.05  |
| miR-28_1      | 2.17±2.03           | 1.91±0.92           | > 0.05  |
| miR-29c_1     | 1.83±1.17           | 1.00±0.67           | > 0.05  |
| miR-96_1      | 4.69±5.21           | 1.23±0.54           | < 0.001 |
| miR-142-5p_1  | 2.04±1.37           | 1.47±1.05           | > 0.05  |
| miR-142-3p_2  | 2.76±2.35           | 2.26±1.47           | > 0.05  |
| miR-144_4     | 2.61±1.18           | 2.06±1.69           | > 0.05  |
| miR-155_2     | 8.72±12.25          | 2.66±2.79           | < 0.001 |
| miR-191_1     | 1.95±1.29           | 1.95±1.32           | > 0.05  |
| miR-199a_1    | 2.06±2.08           | 1.14±0.85           | > 0.05  |
| miR-363_1     | 2.79±1.99           | 1.78±0.76           | > 0.05  |
| miR-451_1     | 2.25±0.92           | 1.62±0.89           | > 0.05  |
| miR-1228-3p_1 | 1.86±0.73           | 1.65±1.77           | > 0.05  |

**Табл. 55. Експресия на miRNAs при пациенти с БК спрямо серумните нива на Витамин D при лечение с кортикостероиди**

| miRNAs        | 25(OH)D < 50 nmol/L | 25(OH)D ≥ 50 nmol/L | P value |
|---------------|---------------------|---------------------|---------|
| miR-16_2      | 3.32±2.39           | 1.81±0.90           | < 0.05  |
| miR-28_1      | 2.61±2.54           | 2.32±2.07           | > 0.05  |
| miR-29c_1     | 2.14±1.44           | 0.52±0.22           | < 0.001 |
| miR-96_1      | 6.55±6.14           | 1.45±0.74           | < 0.001 |
| miR-142-5p_1  | 2.34±1.68           | 1.04±0.08           | > 0.05  |
| miR-142-3p_2  | 3.30±3.01           | 2.35±1.49           | < 0.05  |
| miR-144_4     | 3.38±1.21           | 2.58±1.41           | > 0.05  |
| miR-155_2     | 3.53±3.37           | 2.59±2.76           | > 0.05  |
| miR-191_1     | 2.24±1.65           | 0.98±0.14           | < 0.01  |
| miR-199a_1    | 2.33±0.31           | 2.25±2.61           | > 0.05  |
| miR-363_1     | 3.18±2.56           | 1.62±1.19           | < 0.05  |
| miR-451_1     | 2.37±1.14           | 1.51±1.68           | > 0.05  |
| miR-1228-3p_1 | 1.98±2.25           | 1.81±1.28           | > 0.05  |

## V. ДИСКУСИЯ

Въпреки дългогодишните изследвания, точната патогенеза на IBD не е изяснена напълно. Настоящите данни показват, че тези заболявания могат да се развият като резултат от сложното взаимодействие между генетична предразположеност, фактори на околната среда и променен имунен отговор (Kaplan and Ng, 2017; Zhang et al., 2018).

В съвременната медицина прецизирането на диагностиката и персонализираният подход при проследяване и лечение на дадено заболяване се явяват основна цел в клиничната практика (Li, 2018; Weissman, 2018). В тази връзка, определяне ролята на епигенетиката при IBD предоставя нови възможности за прогнозиране на заболяването, терапия и мониторинг. Представени са последните генетични и епигенетични открития в областта на IBD, като се акцентира основно върху ролята на експресията на някои miRNAs и чувствителността ѝ при разграничаване на БК от ЯК, тяхната активност, еволюция и потенциалните транслационни приложения в клиничната практика.

Въпреки нарастващият брой на публикациите, които изследват експресията на различни miRNAs при пациенти с IBD, не се откриват съобщения за установени и валидирани прагови стойности на miRNAs при пациенти с ЯК и БК. При описание на резултатите, често се използват различни методи за анализ, което затруднява сравняването между получените резултати в различните изследвания. Единствените насоки за обработка на информацията са в посока сравняване на експресията на отделните miRNAs между пациенти с ЯК или БК и здрави контроли, както и определяне на повишена или понижена експресия. Други ограничения при сравняване на резултатите са различните популации, малките извадки, различните методи на обработка на резултатите, използването на различни miRNAs и изследването на тяхната експресия в различни материали (мукозна тъкан, серум, слюнка, фецес и други).

Въз основа на посочените ограничения от литературата, при анализа на резултатите за промяната в експресията на отделните miRNAs се определиха праговите стойности, точността на miRNA-та за разграничаване на ЯК от БК, специфичността, чувствителността и позитивната и негативната предсказваща стойност на здрави контроли. При сравняване на серумната експресия на изследваните miRNAs при пациентите с БК и ЯК и здравите контроли в настоящото проучване се

установи повишаване на стойностите при всички miRNAs, като резултатите кореспондират с тези съобщени в научната литература (Kaplan and Ng, 2017; Li, 2018; Weissman, 2018; Zhang et al., 2018).

### **5.1.Изследване на серумната експресия на съответните miRNAs: \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 при пациенти с болест на Крон (Задача 1)**

При изследване на експресията на miRNAs при пациентите с БК в настоящото изследване се установи, че стойностите са сигнификантно високи при всички miRNAs с изключение на miR-29c. През 2011 г. Zahm et al. изследват експресията на miR-16 при педиатрични пациенти с БК спрямо здрави контроли (n=102), като резултатите са AUC=0.912 ( $p<0.0001$ ) с чувствителност 73.91% и специфичност 100% (Zahm et al., 2011). Подобна повишена серумна експресия на miR-16 при пациенти с БК са установени и от други научни екипи (Iborra et al., 2013; Paraskevi et al., 2012; Zahm et al., 2011). При пациенти с активна БК, повишена експресия на miR-16 е установена и в мукозата на терминален илеум (Wu et al., 2010). Установено е, че miR-16 има повишени нива в серума и при пациенти с други автоимунни заболявания (ревматоиден артрит), като нивата на експресия корелират с активността на болестта (Pauley et al., 2008). Основната функция на miRNA-16 е регулацията на възпалителните медиатори и имунитета посредством съвместната дейност с други miRNAs, като прицел на тяхното въздействие е TNF- $\alpha$  (Lindsay, 2008; Tomankova et al., 2011). Наблюдаваната повишена експресия на miRNA-16 в Т лимфоцитите, дава логичен отговор за участието ѝ в различни аспекти на вродения и придобит имунитет (Brooks et al., 2010; Pekow and Kwon, 2012; Wu et al., 2008). В същото време miR-16 индуцира апоптоза чрез bcl-2 и модулира трансактивацията на гените на Ил-8 посредством регулацията на NF- $\kappa$ B (Brooks et al., 2010; Zhou et al., 2012).

През 2015 година Schaefer и сътр. разглеждат десет miRNAs като специфични за БК. Сред тях описват miR-142-3p, miR-142-5p и miR-155, които са свръхекспресирани при пациентите с БК и при тези с ЯК, т.е. по какъвто и път да се развива възпалението, свръхекспресията на тези miRNAs, може да се свърже с активност на IBD (Schaefer et al., 2015). От

друга страна персистиращата им експресия по време на постигната ремисия, разкрива налично възпаление, независимо от постигнатите резултати като намалена ендоскопска активност във видимите сегменти на ГИТ и нормализиране на биохимичните маркери за активност. В настоящото проучване анализът на данните от групата на пациенти с БК в ремисия спрямо здрави контроли, показва повишена експресия на miR-142-3p, която персистира и по време на ремисия на болестта ( $t=2,236$   $p=0,031$ ).

Някои рецепторни семейства като мемранно-свързаните белтъци от фамилията TLR и NOD рецепторната система участват в разпознаването на микроорганизми, индукция на имунната система и възпалителни отговори (Gourbeuge et al., 2015). Установено е, че повишената експресия на miR-155 индуцира TLR сигнализиране. (Nahid et al., 2011; O'Connell et al., 2007). При миши модели с дефицит на miR-155 се наблюдава увреда във функцията на дендритните клетки и промяна в придобития имунния отговор към патогени. Стимулирането на miRNA-155 се явява индуктор на активността на В клетките и фино регулира възпалителния отговор при бактериални инфекции (Kalla et al., 2014). От друга страна miR-155 е една от тези miRNAs, които повлияват в Th1 диференциацията (Banerjee et al., 2010; Guerau-de-Arellano et al., 2011; Lu et al., 2010; Steiner et al., 2011).

При свръхекспресия на miR-155 повлиява CD4+ Т-клетъчната диференциация към Th1 клетки. Обратно, при дефицит в експресията на miR-155, диференциацията върви в посока Th2 клетки (Rodriguez et al., 2007; Thai et al., 2007).

Th17 пътят на диференциация е задълбочено изследван при IBD, тъй като участва в свръхекспресията на проинфламаторни цитокини като IL-17, IL-21, IL-22, IL-26 и TNF- $\alpha$  (Kalla et al., 2014).

Посредством проучвания върху миши модели, се доказва директното участие на miR-155 в регулацията на диференцирането към Th17. Това от своя страна води до повишено производство на про-Th17, зависими цитокини от дендритните клетки. (Murugaiyan et al., 2011; O'Connell et al., 2010).

Интересът към тази miR-155 се подсилва и от данните, че участва в хомеостазата посредством регулация на зрението на T reg клетки чрез IL-2 сигналният път (Lu et al., 2009; Lu et al., 2010).

Авторски екип доказва ролята на повишената експресия на miR-142-3p, която се прицелва в мултипротеинния комплекс ATG16L1 и участва в регулацията на автофагията (Zhai et al., 2014). Според данните от настоящото проучване повишената експресия на miR-155 и miR-142-3p

при пациенти с активна БК, говори за множество нарушени регулаторни механизми на контрол на възпалението при БК и изследването им може да послужи като маркер за активност на възпалителния процес при пациенти с БК.

В настоящото проучване при пациентите с активна БК се наблюдава повишена експресия на изследваните miRNAs в сравнение със здрави контроли. При част от miRNAs тези повишени нива се запазват и в стадия на ремисия. Някои автори съобщават за повишена експресия на miR-16, miR-191 и miR-199a при пациенти с активна БК спрямо здрави контроли (Dalal and Kwon, 2010). Това доказва, че независимо от начина на подбор на изследваните лица, периода на изследване и различната популация пациенти, този miRNA подтип на активност при БК се наблюдава и при българските пациенти, което дава основание повишената експресия на miR-16, miR-191 и miR-199a да влезе в профила на пациентите с активна БК. В свое проучване Annese публикува информация за повишаване на експресията на miR-16, miR-28 и miR-199a при активна болест на Крон (Annese, 2020). В настоящото изследване съществена разлика в експресията е установена при седем от проучваните miRNAs, като при шест има повишаване на експресията (miR-16, miR-29c, miR-96, miR-142-3p, miR-191 и miR-451). За разлика от съобщените от Annese V. данните, в това изследване показват, че експресията на miR-28 при пациентите с БК е съществено по-висока при тези в ремисия.

Нарушенията в NOD2 рецепторната фамилия са тясно свързани с БК. Посредством проучване на miRNA-NOD взаимодействията, се установи, че NOD2 полиморфизма може да наруши способността на дендритните клетки да експресират miR-29, което да доведе до засилване на възпалението чрез прекомерната експресия на IL-23 (Chen et al., 2013; Chuang et al., 2014; Cuthbert et al., 2002, Ghorpade et al., 2013). От друга тази miR-29 участва и в Th1 клетъчната диференциация, клетъчно-медиаторния имунитет и производството на IL-2, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  (Kalla et al., 2014).

За това в настоящото проучване повишената експресия на miR-29 при активна болест на Крон е обясним резултат, който дава връзката между генетични промени, нарушения в имунната регулация и свръхактивиране на възпалението по пътя на Th1 диференциация, които наблюдаваме при IBD пациенти с БК.

През 2019 г. Zeng et al. съобщават за повишена експресия на miR-199a при пациенти с активна БК спрямо пациенти в ремисия (Zeng et al.,

2019). За разлика от тях, в това изследване няма съществена разлика в експресията на miR-199a при пациенти с активна болест и ремисия (съответно 2.26 в активност към 2.58 в ремисия). Същите автори установяват, че експресията на miR-191 корелира с дебелочревна локализация (L2), а miR-16 има връзка с тънкочревната локализация на БК (L1), където стойностите на miRNAs се повишават. Резултатите от настоящото изследване показват, че с тънкочревната локализация корелира с повишената експресия на miR-28, miR-142-5p, miR-191 и miR-199a. Повишената експресия на miR-16 също се наблюдава при тънкочревната локализация, но тя не се различава статистически от експресията при дебелочревната локализация на БК, която корелира с повишена експресия на miR-155 и miR-1228-3p. Една miRNAa (miR-96) показва повишена експресия при илеоколонна локализация.

По отношение на формата на протичане Zeng et al. намират, че експресията на miR-29 е понижена при стриктурираща форма на БК (Zeng et al., 2019). В това изследване няма съществена разлика между експресията според формата на протичане на заболяването, но miR-29 има понижени стойности (1.37) при болни с възпалителна форма на заболяването. В литературата изследователите свързват понижена експресия на miR-29 със стриктуриращ фенотип на БК (Brain et al., 2013; Li and Kuemmerle, 2014; Nijhuis et al., 2014). При персистиране на ниска експресия на miR-29 при отсъствие на активно възпаление се наблюдава повишено производство на компонентите на екстрацелуларния матрикс, отговорни за развитието на фиброза (Li, 2016). Това предполага, че пациентите с възпалителна форма и ниска експресия на miRNAата могат във времето да развият стриктурираща форма.

Резултатите в настоящото изследване потвърждават тези на Berezin и Poplyonkin (Berezin and Poplyonkin, 2020). Тези автори обобщават данните за експресията на някои miRNAs и установяват, че намалената експресия на miR-28, miR-142-3p и miR-199a предсказва възпаление на ГИТ. Към тази група от miRNAs авторите добавят и понижена експресия на miR-155 (Berezin and Poplyonkin, 2020), която в българската популация обратно е с повишени стойности при активно възпаление.

## **5.2. Изследване на серумната експресия на съответните micro-RNAs:**

\*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-



3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 при пациенти с язвен колит (Задача 2)

През 2018 г. Luo et al. изследват експресията на няколко miRNAs при 94 пациенти с ЯК и намират за miR-16 AUC=0.94 (0.891–0.986),  $p < 0.0001$  с чувствителност 74.4%, специфичност 97.3% (Luo et al., 2018). miR-16 е изследвана и от Saad et al. през 2020 г. при 30 пациента с ЯК като AUC=0.787 (0.659–0.914),  $p = 0.001$  с чувствителност 80%, специфичност 75%, PPV 82.8%, NPV 71.4% (Saad et al., 2020). Авторите доказват, че в тяхната извадка праговата стойност на miR-16 е 1.21 и експресията над тази стойност се счита за предсказваща за наличие на ЯК. Резултатите в настоящото изследване се доближават до тези на Saad et al., като AUC=0.701 (0.585–0.817),  $p = 0.001$  с чувствителност 62.9%, специфичност 63.3%, PPV 81.8%, NPV 55.5%. Праговата стойност на здравите контроли в българската популация е 1.63, като се приема, че експресията на miR-16 над тази стойност е предсказваща за наличие на IBD.

През 2014 г. Zahm et al. публикуват данни за експресията на miR-142-3p при педиатрични пациенти с ЯК (n=18), БК, L2 (n=12) и здрави контроли (n=20). Авторите определят AUC=0.723 (0.573–0.873),  $p = 0.0078$  с чувствителност 75.86%, специфичност 66.67% (Zahm et al., 2014). Резултатите от изследването на серумната експресия на miR-142-3p сред пациентите с ЯК (n=35), с БК (n=35) и здрави контроли (n=30) в българската популация са AUC=0.716 (0.609–0.823),  $p = 0.001$  с чувствителност 65.7%, специфичност 66.7%, PPV 82.1%, NPV 54.4%. Експресията над 1.32 е предсказваща за наличие на IBD.

От гледна точка на активността на ЯК, експресията на изследваните miRNAs не се различава съществено в стадий на активност и ремисия с изключение на miR-29c, miR-142-5p и miR-155, но спрямо установената прагова стойност при здрави контроли, експресията при всички miRNAs е повишена както в активност, така и в ремисия. В тази връзка през 2010 г. Dalal и Kwon съобщават за повишена експресия на miR-16, miR-28, miR-29c и miR-199a при пациенти с активен ЯК спрямо здрави контроли (Dalal and Kwon, 2010).

През 2019 г. Zeng et al. потвърждават резултатите на Dalal и Kwon относно повишената експресия на miR-16, miR-28 и miR-199a при активна форма на ЯК (Zeng et al., 2019). Тъй като резултатите се потвърждават както по отношение на различните популации, така и по отношение на устойчивост във времето може да се допусне, че повишената експресия на miR-16 и miR-199a е предсказващ фактор за активност на ЯК.

**5.3. Съпоставяне на данните от експресията на съответните miRNA:** \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 **при пациенти с болест на Крон и при пациенти с язвен колит в различните стадии на болестта (Задача 3)**

Резултатите от определянето на праговите стойности показаха, че експресията на някои miRNAs е подобна на тази, съобщена от други автори. През 2013 г. италиански учени публикуват данни за промяна в серумната експресия на miR -16 при пациенти с БК (n=18) спрямо здрави контроли. Установяват, че експресия на miR -16 е  $\log_2FC$  1.43. При пациенти с ЯК (n=18) намират промяна в серумната експресия на miR-142-5p, miR-199a, miR-28 и miR-29 спрямо здрави контроли, както и повишена експресия и при четирите miRNAs (miR-142-5p-  $\log_2FC$  1.71, miR-199a- $\log_2FC$  1.38 и miR-28- $\log_2FC$  1.01 и miR-29- $\log_2FC$  1.07) (Iborra et al., 2013).

През 2017 г. Béres et al. публикуват данни за експресията на miR-142-3p за разграничаване на БК от ЯК при педиатрична популация пациенти. Авторите установяват  $AUC=0.888$ ,  $p<0.01$  с чувствителност 77.78%, специфичност 90.31% (Béres et al., 2017).

**Табл. 56. Сравнителен анализ на експресията на изследваните miRNAs спрямо здрави контроли**

| miRNAs         | А. Атанасова (2021) |    | J. Schaefer (2016) |    | XM Xu et al. (2016) |    | A. Paraskevi et al. (2012) |    |
|----------------|---------------------|----|--------------------|----|---------------------|----|----------------------------|----|
|                | БК                  | ЯК | БК                 | ЯК | БК                  | ЯК | БК                         | ЯК |
| miR -16_2      | ↑                   | ↑  | ↑                  |    | ↑                   | ↑  | ↑                          | ↑  |
| miR -28_1      | ↑                   | ↑  |                    | ↑  |                     | ↑  | ↑                          | ↑  |
| miR -29c_1     | ↑                   | ↑  | ↑                  | ↑  | ↑                   |    | ↑                          |    |
| miR -96_1      | ↑                   | ↑  |                    |    |                     |    |                            |    |
| miR -142-5p_1  | ↑                   | ↑  | ↑                  | ↑  |                     |    |                            |    |
| miR -142-3p_2  | ↑                   | ↑  | ↑                  | ↑  |                     |    |                            |    |
| miR -144_4     | ↑                   | ↑  |                    |    |                     |    |                            |    |
| miR -155_2     | ↑                   | ↑  | ↑                  | ↑  |                     | ↑  |                            | ↑  |
| miR -191_1     | ↑                   | ↑  | ↑                  |    | ↑                   |    | ↑                          |    |
| miR -199a_1    | ↑                   | ↑  | ↑                  | ↑  | ↑                   | ↑  | ↑                          | ↑  |
| miR -363_1     | ↑                   | ↑  |                    |    |                     |    |                            |    |
| miR -451_1     | ↑                   | ↑  |                    |    |                     |    |                            |    |
| miR -1228-3p_1 | ↑                   | ↑  |                    |    |                     |    |                            |    |

На табл. 5б е представено сравнение на резултатите, свързани с експресията на изследваните miRNAs. Във всички проучвания се установява повишена експресия.

По отношение на локализацията и формата на протичане някои автори установяват, че повишената експресия на miR -155 в интестинални миофибробласти и в колонна мукоза са свързани с контрола на Th17 възпалителния път, с цел FOXO3a и IL-8, което води до повишаване на фиброобразуването (Min et al., 2014; Pathak et al., 2015).

**5.4. Изготвяне на профил на пациентите с възпалителни болести на червата, който да отразява основните характеристики на болестта според промените в серумната експресия на съответните микро-RNA:** \*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR-29c\_1; \*Hs\_miR-96\_1; \*Hs\_miR-191\_1; \*Hs\_miR-451\_1; \*Hs\_miR-142-5p\_1; \*Hs\_miR-199a\_1; \*Hs\_miR-363\_1; \*Hs\_miR-144\_4; \*Hs\_miR-142-3p\_2; \*Hs\_miR-155\_2; \*Hs\_miR-16\_2; \*Hs\_miR-1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 (Задача 4)

## **miR-16\_2**

В някои проучвания се установява, че miRNAs могат да се използват за разграничаване на пациенти с активна БК и ЯК от здрави контроли и могат да служат като потенциален маркер за диагностика, оценка на възпалението и ефекта от прилаганото лечение (Archanioti et al., 2011; Wu et al., 2011). Наскоро някои изследвания показват, че miR-16 играе важна роля при IBD. (Chung et al., 2014; Min et al., 2013; Schönauen et al., 2018; te Velde et al., 2008, Tian et al., 2016) miR-16 е малка некодираща RNA молекула, разположена в хромозома 13q14. Биоинформатичният анализ прогнозира, че miR-16 има между 1088 и 8778 цели (Yan et al., 2019). Установено е, че miR-16 може значително да инхибира клетъчната пролиферация, да стимулира клетъчната апоптоза и да потиска прогресията на клетъчния цикъл (Zhan et al., 2017). miR-16 може да трансформира поляризацията на макрофагите от M2 в M1 и активира CD4 + Т клетки чрез снижаване експресията на лиганд за програмирана клетъчна смърт - 1 (PD-L1) (Jia et al., 2016). В същото време miR16-1 действа като регулатор на имунно-медираното възстановяване на тъканите, а при липсата на miR-16-1 в CD4 + Т клетките, се увеличават нивата на IL-22 (Lu et al., 2018). Много изследвания до момента показват, че miR-16 участва в потенциалните регулаторни пътища (NF-kB, LPS –

индуцирано възпаление, 5-НТ4 рецепторния сигнални пътища) при автоимунни заболявания и играе важна роля в развитието на имуномедираните болести (Chen et al., 2020; Huang et al., 2018; Wang et al., 2018).

В свои проучвания Wu et al. установяват, че miR-16 има повишена експресия при пациенти с активен ЯК и БК в сравнение със здрави контроли (Wu et al., 2008; Wu et al., 2010). За подобни резултати съобщават и Paraskevi et al., като експресията на miR-16 е значително по-висока при пациентите с БК, спрямо тези с ЯК ( $6.38 \pm 1.46$  към  $2.98 \pm 0.35$ ) (Paraskevi et al., 2012).

Schönauen et al. установяват значително повишени нива на miR-16 в серума и изпражненията на пациенти с IBD в сравнение с контролите, като серумната експресия на miR-16 е положително свързана с активността на заболяването (Schönauen et al., 2018). Нещо повече, нивата на miR-16 във фекалната маса са значимо свързани с нивата на CRP, което предполага, че miR-16 може да бъде подходяща за бъдещи анализи (Schönauen et al., 2018). Резултатите от настоящото проучване също потвърждават недвусмислено връзката между повишената серумна експресия на miR-16 и активността на заболяването при пациенти с БК, докато при пациентите с изразена тежка активност на ЯК, измерена чрез S и Partial Mayo score, експресията на miRNA-тата парадоксално се понижава до нива близки на тези при здрави контроли.

Ting et al. установяват повишена експресия на miR-16 при пациенти с ЯК в активност в сравнение с пациенти със синдром на раздразненото черво (IBS) и здрави доброволци, което предполага, че променената експресия на miR-16 може да бъде свързана с IBD, и демонстрира, че miR-16 инхибира експресията на аденозин A2a рецепторния протеин (A2aAR) на посттранскрипционно ниво. (Tian et al., 2016). Тези резултати показват, че както miR-16, така и A2aAR са потенциални терапевтични цели за контролиране на възпалението и че терапия, насочена към тези молекули може да бъде от полза за пациентите с IBD (Tian et al., 2016). Резултатите от някои проучвания показват, че повишената експресия на miR-16, се асоциира със снижена експресия на TNF- $\alpha$  и IL-12p40 в макрофаги от дебело черво (Huang et al., 2015). По този начин се разкрива ролята на miR-16 в потискане на възпалението на мукозата.

miR-16 има редица прицелни гени, чрез които участва в контрола на апоптозата, регулацията на клетъчния цикъл и преживяемост на

клетките, активирането и диференциацията на макрофагите. В същото време чрез сигналния път NF- $\kappa$ B пряко участва в контрола на възпалението, в туморната генезата и прогресията на колоректалния карцином. Ето защо проследяване експресията на miR-16 при пациентите с IBD с хронично и трудно поддаващо се на лечение възпаление, изисква мониториране посредством нивата на тази miRNAa.

В настоящото проучване повишената серумна експресия на miR-16 корелира с тънкочревна локализация, стенотична и пенетрираща форма при БК и панколит при ЯК. При пациентите с БК е установена правопрпорционална зависимост между експресията на miR-16 и CDAI. При ЯК умерено тежката форма на заболяването, оценена чрез S индекса показва повишена експресия на miR-16. Експресията на miR-16 в настоящото проучване не корелира с вида на медикаментозната терапия.

miR-16 е важна за възпалителните процеси и сигналните пътища в регулацията на имунната система. Тъй като при IBD има имунно възпаление на мукозата, miR-16 би могла да бъде обещаващ биомаркер за оценка на възпалението.

## **miR-28\_1**

Според установените в литературата фактори, които способстват за развитие на КА-КПК (Charatcharoenwiththaya and Lindor, 2006; Ording et al., 2013) в рисковата група попадат млади пациенти с дебют на болестта в млада възраст, лош контрол на заболяването, с персистиращо възпаление, разпространен обхват на засягане на гастроинтестиналния тракт и съпътстващ първичен склерозиращ холангит. Според публикуваните проучвания, ниските серумни нива на miR 28 се свързват с развитието на КПК.

Различни научни екипи описват снижена експресия на miR-28-5p в различни тумори: хепатоцелуларен карцином (Shi and Teng, 2015), бъбречен карцином (Wang et al., 2016), natural killer/T-клетъчен лимфом (Ng et al., 2011), B-клетъчен лимфом (Schneider et al., 2014), колоректален рак (КПК). (Almeida et al., 2012) и КПКм с чернодробна метастаза (Sayagués et al., 2016; Vychytilova-Faltejskova et al., 2016), въпреки че в някои други видове карциноми, се наблюдава повишено ниво на експресия на miR-28-5p като: рак на яйчниците, хранопровода и шийката на матката) (Huang et al., 2017; Rizzo et al., 2017; Wilting et al., 2013, Xu et al., 2017).

Тъй като по-често се наблюдава снижена експресия на miR-28-5p в туморите, предполага се, че преобладаващата активност на тази miRNA

тумор супресорна(Almeida et al., 2012; Choi et al., 2015; Schneider et al., 2014; Shi and Teng, 2015; Wang et al., 2016).

Напоследък вниманието е насочено към потенциалното използване на miRNAs не само като биомаркери, но и за терапевтични цели. (Lewis et al., 2017) Появи се една нова терапевтична стратегия при някои онкологични заболявания- базирана на miR-28-5p заместително лечение (Bartolomé-Izquierdo et al., 2017).

В литературата са намерени много малко данни за експресията на miR-28 при пациенти с IBD. Основно насоката на изследванията е свързана с проучване ролята на серумната експресия на miR-28 при пациенти с различни злокачествени заболявания.

Rizzo et al. изследват нивата на експресия на циркулиращата miR-28 при пациенти с различни карциноми и установяват, че експресията на miR-28 е сигнификантно по-ниска при пациентите с карцином спрямо здрави контроли ( $p < 0.001$ ) (Rizzo et al., 2017). За подобни резултати съобщават различни научни екипи (Chang et al., 2011; Mazeh et al., 2013; Mosakhani et al., 2012; Slattery et al., 2011).

Други автори установяват, че при пациенти с ЯК серумната експресия на miR-28 се повишава при пациенти с ЯК и дисплазия (Lewis et al., 2017).

Almeida et al. при изследване експресията на miR-28-5p и miR-28-3p при пациенти с КПК установяват, че има понижени нива на тъканната експресия при пациенти с КПК спрямо здрави контроли (Almeida et al., 2012).

Paraskevi et al. са изследвали широк диапазон от miRNAs и установяват, че miRNA-28-5p е значително свръхекспресирана при пациенти с ЯК и БК в сравнение със здрави контроли (Paraskevi et al., 2012).

За разлика от резултатите на Paraskevi et al. в настоящото проучване експресията на miR-28 при пациентите с ЯК е понижена спрямо здрави контроли, докато за пациентите с БК данните се потвърждават.

В научната литература няма достъпни литературни данни за промените в серумната експресия на miR-28 според локализацията, формата на протичане и приложеното лечение. В настоящото проучване се установи, че при пациентите с БК в ремисия понижените нива на циркулиращата miR-28 се свързват с локализация дебело черво (L2) и разпространен обхват - тънко и дебело черво (L3) и възпалителен фенотип (B1), а при пациенти ЯК в ремисия понижените нива на експресия на miR-

28 са свързани с разпространен обхват на болестта – ляв колит (E2) и панколит (E3). Не се установи корелация на експресията на miR-28 с провежданото лечение.

Резултатите от настоящото изследване потвърждават тези от публикуван мета-анализ на A. Berezin и E. Poplyonkin, които стигат до извода, че нарушената експресия на miRNAs при пациентите с IBD се свързва както с диагностиката на заболяванията ЯК и БК, така и с възможностите за трансформация на тези болести в дебелочревен карцином. (Berezin and Poplyonkin, 2020).

### **miR-29c\_1**

Семейството на miR-29 има три представители miR-29a, miR-29b и miR29c, които са кодирани от два отделни геномни локуса. В мезенхимните клетки на множество органи се наблюдава експресия на miR-29. Някои растежни фактори или цитокини, като TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  IL-4, потискат експресията на miR-29 (Cushing et al., 2015).

Интересът към тази miRNA се засили, след като се установи, че взаимодействието на miR-29 с NOD е предпоставка за развитието на IBD. Чрез изследване на дендритна клетъчна линия, се установи, че NOD2 индуцира освобождаване на miR-29 и ограничено освобождаване на IL-23.

Полиморфизми на NOD2 нарушават експресията на miR-29 в дендритните клетки и това води до свръхекспресия на IL-23 с последващо възпаление (Chuang et al., 2014).

NOD2 полиморфизмът намалява експресията на miR-29, увеличава рискът от образуване на стриктури при пациенти с БК (Brain et al., 2013) и развитието на този фенотип, който се характеризира с тежка чревна фиброза. (Seiderer et al., 2006).

miR-29 има за цел (мишени) гените на основните компоненти на ЕЦМ: колаген, еластин, фибрилини (FBN1) и пероксидазин (Cushing et al., 2015).

Антифибротичният ефект на miR-29 е демонстриран при миши модели по отношение на чревната фиброза чрез инхибиране на TGF $\beta$ -медирано производство и отлагане на ЕЦМ (Brain et al., 2013).

Тези отличителни характеристики правят miR-29 изключително подходящ потенциален кандидат за антифибротна терапия.

Резултатите от настоящото изследване показват, че експресията на miR-29 има 61.4% чувствителност и 63.3% специфичност при разграничаването на пациенти с хронични възпалителни заболявания на

червата от здрави контроли (AUC = 0.622 (0.493-0.751); p= 0.054). В литературата не бяха открити данни за чувствителността и специфичността на miR-29 при пациенти с IBD, но J. Wang и J. Gu (2012) при изследването на 74 пациента с КПК установяват, че miR-29 има 75 % специфичност и чувствителност (AUC = 0.803) (Wang and Gu, 2012 ). През 2016 г. Zhu et al. при пациенти с простатен карцином установяват 85 % чувствителност и 61 % специфичност на miRNAата (AUC = 0.777) (Zhu et al., 2016).

Изследването на серумната експресия на miR-29 при пациенти с БК показва значително повишени стойности (1.69) спрямо пациенти с ЯК (1.23) и здрави контроли (1.07). Подобни резултати при пациенти с БК се съобщават от Paraskevi et al. (Paraskevi et al., 2012), съответно  $1.89 \pm 0.39$  за пациенти с БК и  $0.85 \pm 0.44$  за пациенти с ЯК. От друга страна някои автори (Fasseu et al., 2010; Wu et al., 2008; Xu and Zhang, 2016) установяват, че експресията на miRNAата е повишена и при пациенти с ЯК, за разлика от настоящото изследване. При сравняването на експресията на miR-29 при пациенти с активен БК и в ремисия спрямо здрави контроли Fasseu et al. установяват повишена експресия (Fasseu et al., 2010), което се потвърждава и в настоящото проучване. В настоящото проучване подобни резултати са установени и при пациенти с ЯК.

Експресията на miR-29 според формата на протичане на БК показва понижена експресия при пациентите със стриктуриращ фенотип (1.92), като резултатите подкрепят тези в литературата (Zeng et al., 2019). По литературни данни понижена експресия на miR-29 при тежка болест и активност при пациентите с IBD спрямо здравите контроли се свързва с повишено фиброобразуване и стенолитични усложнения (Zeng et al., 2019).

Резултатите от настоящото проучване показват, че има повишена експресия на miR-29 както при пациентите с БК, така и при тези с ЯК спрямо здрави контроли, независимо от активността и постигнатата ремисия. Експресията на miR-29 се различава сигнификантно според локализацията и тежестта на заболяването при пациентите с ЯК.

### **miR-96\_1**

Малко проучена е ролята на експресията на miR-96 при IBD. Приложението на ГК при умерено до тежки форми на IBD е залегнало в стандартите за постигане на ремисия. (Torres et al., 2020)

Установено е, че miR-96 модулира транскрипционния фактор FoxO1/ 3, който участва в глюкокортикоидно-индуцираната апоптоза



(Sionov, 2013), като вероятно може да играе роля в регулирането на експресията на глюкокортикоидния рецептор (Riester et al., 2014).

В свое изследване Yuan et al. (Yuan et al., 2018) установяват, че miR-96 е свръхекспресирана в туморни тъкани. Ето защо базирайки се на установените от различни изследователски екипи данни за приложението на експресията на miR-96, бе поставен въпросът каква е точната ролята на тази miR при пациентите с IBD.

Прегледа на литературата показва, че miR-96 се използва предимно при пациенти с онкологични заболявания за оценка на различни характеристики на болестта (Pavlakis et al., 2017). Приложението на miR-96 при пациенти с IBD е ограничено до единични публикации.

В свое изследване Ahmed et al. (2009) при изследване на пациенти с БК и ЯК установяват, че miR-96 има повишена експресия при онези пациентите с ЯК, при които заболяването е прогресирало към КПК, като експресията на miRNA при тези пациенти е по-висока отколкото при пациентите с аденоми (Ahmed et al., 2009). Авторите стигат до извода, че изборът на внимателно подбрани miRNAs могат да разграничат спорадичния карцином на дебелото черво от колит, асоцииран карцином при пациенти с IBD.

Olaru et al. (2011) при мултицентрово изследване на 175 пациенти с IBD; пациенти с дисплазия при IBD; пациенти с колит, асоцииран карцином; пациенти със спорадичен КПК и здрави контроли, установяват, че експресията на miR-96 е 2.65 пъти по-висока при пациенти с дисплазия при IBD (Olaru et al., 2011).

В друго изследване на Xu et al. (2012) при изследване на 52 пациенти с КПК допускат, че miR-96 може функционира като микроонкоген в колоректалната канцерогенеза и регулира развитието и прогресията на КПК. (Xu et al., 2012) Изследователите установяват наличието на съществена разлика в експресията на miR-96 при пациенти с КПК и здрави контроли, като серумните нива на miRNA са 2.2 пъти по-високи в сравнение със здрави контроли ( $p=0.013$ ). Допълнително авторите установяват, че свръхекспресията на miR-96 корелира с чернодробни метастази, но не е открита зависимост между експресията на miRNA с други характеристики като пол, локализация, метастази в лимфните възли, диференциация или клиничен стадий (Xu et al., 2012).

В настоящото изследване също бе установена повишена експресия на miR-96 спрямо здрави контроли, като се намери зависимост между нивата на серумната експресия на miRNA с локализацията,

активността и приложеното лечение при пациентите с БК и локализацията и тежестта на заболяването при пациентите с ЯК. Установената в настоящото проучване свръхекспресията на miR-96 при висока активност и тежест на IBD, може да насочи вниманието на клинициста за персонализирано мониториране на активността при тези пациенти с оглед потенциалната възможност за преход към дисплазия.

Свръхекспресията на miR-96 се свързва с тежка БК с обширен обхват, умерена до тежка активност и приложение на кортикостероидно лечение. Тези резултати показват, че приложението на серумната експресия miRNA-96 е по-подходящо за стадиране, мониториране активността и персонализиране на лечението при пациентите с болест на Крон.

### **miR-142-5p\_1 и miR-142-3p\_2**

miR-142\_5p има съществена роля в множество патологични процеси: прогресия на тиреоидит на Хашимото, развитие на колоректален карцином и бъбречен карцином (Liu S, et al., 2017; Liu L, et al., 2017; Zhu et al., 2016).

Екип от автори установява, че miR-142\_5p има повишена експресия при пациенти с ЯК, като освобождава възпалителни молекули и потиска функцията на SOCS 1, като е необходимо да се изясни ролята на тези miRNAs във възпалението на колона (Han et al., 2018). Други автори установяват, че miR-142\_5p усилва диференциацията на Th1 клетките (Moein et al., 2019; Talebi et al., 2017), докато miR-142\_3p допринася за зреенето и диференциацията на неутрофилите (Fan et al., 2014)

От друга страна miRNA-142\_3p регулира синтеза на проинфламаторните NF-kB1, TNF- $\alpha$  и IL-6 в макрофагите, като се прицелва в гена IRAK1 и понижава белтъчната експресия на IRAK1 (Tahamtan et al., 2018; Xu et al., 2013). Zhai et al. през 2014 г. публикуват данни, че miRNA-142\_3p контролира автофагията чрез ATG16L1, като повишената експресия на miRNA-ата води до понижаване на автофагичната активност при пациенти с БК. (Zhai et al., 2014). Paraskevi et al. през 2012 г. установяват, че понижената експресия на miRNA-142\_3p се свързва с възпаление, което е регулирано от NOD2 гена, който се свързва с процесите на автофагия (Paraskevi et al., 2012).

На табл. 57 е представен сравнителен анализ на експресията на miR-142\_3p и miR-142\_5p между резултатите от настоящото изследване и тези от други автори. Schaefer et al. установяват съществена разлика в

повишената експресия на miR-142\_3p при пациенти с БК спрямо здрави контроли. Авторите установяват и съществена разлика в повишената експресия на miR-142\_5p спрямо здрави контроли както при пациенти с БК и ЯК.

**Табл. 57. Сравнителен анализ на пациентите с повишена и понижена експресия на miR-142\_3p и miR-142\_5p (брой пациенти)**

| Автор                 | Заболяване | Експресия на miR-142_3p |                    | Експресия на miR-142_5p |                    |
|-----------------------|------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
|                       |            | Понижена експресия      | Повишена експресия | Понижена експресия      | Повишена експресия |
| Schaefer et al., 2015 | БК         | 2<br>p=0.096            | 8<br>p=0.018       | 2<br>p=0.133            | 8<br>p=0.032       |
|                       | ЯК         | 1                       | 6<br>p=0.053       | -                       | 7<br>p=0.017       |
| Zahm et al., 2014     | ЯК         | -                       | 12<br>p=0.048      | -                       | -                  |
| А. Атанасова, 2021    | БК         | 11<br>p=0.005           | 24<br>p=0.01       | 11<br>p=0.005           | 24<br>p=0.01       |
|                       | ЯК         | 13<br>p=0.018           | 22<br>p=0.034      | 15<br>p=0.055           | 20<br>p=0.016      |

Zahm et al. установяват съществена разлика в повишената експресия на miR-142\_3p при пациенти с БК спрямо здрави контроли (Zahm et al., 2014). В настоящото изследване се установява съществена разлика на изследваните miRNAs и в двете групи пациенти с изключение на понижената експресия на miR-142\_5p при пациентите с ЯК.

Регулаторната роля на различните miRNAs в много клетъчни процеси, както и тяхната роля в процеса на възпаление при пациенти с IBD, заслужава проучване. Липсват изследвания в литературата, оценяващи диференциалната експресия на циркулиращи miRNAs и тяхната роля при IBD (Dutttagupta et al., 2012; Paraskevi et al., 2012; Wu et al., 2011; Zahm et al., 2011).

През 2013 г. Ivorra et al. публикуват данни за сигнификантно повишена експресия на miR-142\_5p при пациенти с ЯК спрямо контроли (1.71; p=0.024). (Ivorra et al., 2013) Резултатите от настоящото изследване също показват повишена експресия на miR-142\_3p и miR-142\_5p, както при пациенти с БК, така и при пациенти с ЯК спрямо здрави контроли.

В изследването на Zahm et al. (2014) се установява повишена експресия на miR-142\_3p при педиатрични пациенти с ЯК спрямо здрави

контроли. (Zahm et al., 2014). Тези резултати се потвърждават и в нашето изследване при възрастни пациенти с ЯК.

Schaefer et al. през 2015 г. установяват повишена експресия на miR-142\_3p при пациенти с ЯК и повишена експресия на miR-142\_5p при пациенти с БК (Schaefer et al., 2015). За разлика от Schaefer et al. в настоящото проучване установихме повишени нива на изследваните miRNAs при пациентите с БК.

Wohnhaas et al. установяват повишена експресия на miR-142\_5p при пациенти с БК (Wohnhaas et al., 2020). Авторите установяват близо 10 пъти по-висока експресия на miR-142\_5p при пациентите с БК спрямо здрави контроли.

При определянето на праговата стойност спрямо здрави контроли нашите резултати се доближават до тези на Zahm et al., които при miR-142\_3p съобщават за AUC=0.723, p=0.0078 с чувствителност 75.86 % и специфичност 66.67 % (Zahm et al., 2014). Чувствителността и специфичността на miR-142\_3p в настоящото изследване са съответно 65.7 % и 66.7 %.

В свое изследване Han et al., (2018) установяват, че miR-142\_5p има свръхекспресия при пациенти ЯК. Също така авторите установяват, че тази miRNA стимулира възпалението на колона. Нейната мишена е SOCS1. Установяват умерена обратнопропорционална зависимост между експресията на SOCS1 и тази на miR-142\_5p ( $r=-0.4835$ ;  $p=0.0167$ ). Авторите намират, че miR-142-5p може да инхибира експресията и освобождаването на възпалителни молекули чрез потискане на функцията на SOCS1. miR-142-5p е ключов регулатор при възпалението на дебелото черво и функционира като проинфламаторен фактор (Han et al., 2018). Действа също и като онкогенна микроRNA (oncomiR) и стимулира развитието на колоректален карцином (Liu et al., 2017).

В настоящото проучване експресията на miR-142\_3p и miR-142\_5p е значимо по-висока при пациенти с БК спрямо пациентите с ЯК и контролната група. При пациентите с БК не се установява разлика в експресията на двете miRNAs по отношение на локализацията, докато при пациентите с ЯК се установи съществена разлика в експресията на miR-142\_5p, която е повишена при ляв (E2) и екстензивен (E3) колит. Повишената експресия на miR-142\_3p е фактор за хронично персистиращият ход на ЯК. Високата активност на възпалението при БК, измерена чрез CDAI е свързана с повишена експресия на miR-142\_3p. Единичните съобщения и противоречиви резултати в литературата

показват необходимостта от провеждането на по-мощни кохортни изследвания сред пациентите с IBD.

#### **miR-144\_4**

Наскоро различни екипи от учени публикуваха данни, че повишената експресия на miR-144 е свързана с нарушена епително-барьерна функция на интестиналния тракт (Hou Q, et al., 2017; Moein et al., 2019; Tili E, et al., 2017). Мишени на тази miRNA са основно белтъци, изграждащи епителната бариера: белтъци на плътните връзки- occludin (OCLN)-(miR 144-3p), claudin CLDN-1(miR 144-5p), CLDN -4 (miR 144-5p), CLDN -8 (miR-144-5p) и ZO1 (miR-144-3p); адхезионни връзкови протеини- катенин алфа 1-(miR-144-3p); дезмозомни протеини- дезмоглеин 3 (miR-144-3p); антимикробни протеини, секретирани от панетовите клетки-англогенин (miR-144-3p) и сигнални пътища- С-тип лектинов домейн съдържащ 7A / дектин1 (miR -144-3p) (Tili et al., 2017).

Едно клинично проучване установява, че miR-144-3p, е с най-висока експресия сред педиатрични пациенти с GC-чувствителност (De Iudicibus et al., 2018), тъй като miR-144, miR-142 и miR-96 могат да разпознаят 3' некодиращите региони (НКР) на гена за GR (De Iudicibus et al., 2018, Hafner et al., 2010; Riester et al., 2014).

При редица неоплазми се наблюдава нарушена регулация в експресията на множество miRNAs, сред които и miR-144. Степента на повишаване на експресията маркира прехода от възпаление, дисплазия и КРК, като учени (Kalimutho et al., 2011) установиха, че при пациенти с КРК се наблюдава значимо повишаване експресия на miR-144 (Duong, 2018).

От публикуваните литературни данни става ясно, че miR-144-3p има участие в нарушената епително-барьерна функция на интестиналния тракт, инхибира активацията на автофагията, разпознава гена за глюкокортикоидния рецептор и повишава експресия си сред пациентите, които са чувствителни към глюкокортикоидно лечение. Тези характеристики на miR-144-3p я правят потенциален неинвазивен биомаркер за оценка на възпалението и отговора на лечението при пациентите с IBD.

Нарушената епително-барьерна функция, установена при миши модели (Hou et al., 2017) се свързва с активност на IBD и повишена експресия на miR -144. Тези резултати се потвърждават и в настоящото изследване при пациентите с активна БК и ЯК, където серумната

експресия на Hs\_miR -144\_4 е повишена спрямо установената прагова стойност при здрави контроли.

В изследване сред педиатрични пациенти е установено, че повишената експресия на miR-144 е свързана с ГК чувствителност (De Iudicibus et al., 2018). Тези резултати се потвърждават само отчасти от получените в настоящото изследване. Серумната експресия на Hs\_miR-144\_4 макар и несигнификантно е по-висока при пациентите с ЯК на кортикостероидно лечение. При сравнение праговата стойност при здрави контроли с експресията при пациентите на ГК лечение, се наблюдава повишена експресия на Hs\_miR-144\_4.

От друга страна се установи силна зависимост между свръхекспресията на Hs\_miR-144\_4 и лечението с 5-АСА при пациенти с БК, което показва, че тази терапия не е ефективна за постигане и поддържане на ремисия (Doherty et al., 2018; Lim et al., 2016).

Съчетанието между персистиращо възпаление, обширен обхват на заболяването и умерена към висока активност са известни в литературата рискови фактори за преход от възпаление към дисплазия и колит, асоцииран карцином при IBD (Kim and Chang, 2014). В тази връзка Lewis et al. установяват повишена експресия на miR-144-3p при пациенти с ЯК в биопсия от постинфламаторни полипи спрямо експресията при пациенти с ЯК без дисплазия. (Lewis et al., 2017) Независимо, че в настоящото изследване не се установи дисплазия при пациенти с IBD, продължителната висока експресия на Hs\_miR-144\_4 би следвало да насочи вниманието на клинициста към потенциалната възможност за преход от възпаление към дисплазия и КРК. Ето защо тези пациенти, които се представят при проследяване със свръхекспресия на Hs\_miR-144\_4 изискват друг план на мониториране с повишена онкологична бдителност.

При активност на IBD се установи съществена разлика в експресията на Hs\_miR-144\_4, която е значително по висока при пациентите с БК спрямо тези ЯК и здрави контроли. Пациентите с БК, с тънкочревна локализация (L1), с възпалителен фенотип (B1) на клинична изява и ИТМ <25кг/м2 имат повишена експресия на Hs\_miR-144\_4 спрямо здравите контроли. Установено бе, че при пациенти с БК повишената експресия на Hs\_miR-144\_4 корелира с лечението с mesalazine. При пациентите с ЯК, панколит (E3), хронично рецидивиращата форма на протичане, интестиналните усложнения и екстраинтестиналните прояви се установи повишена експресия на Hs\_miR-144\_4 спрямо здравите контроли. Тези резултати биха могли да се използват за следващи

проучвания при по-големи кохорти от пациенти с IBD за да се потвърди ролята на експресията на Hs\_miR-144\_4 като нов неинвазивен биомаркер за проследяване на активността и персонализиране на лечението.

### **miR-155\_2**

Експресията на miRNA-155 се свързва с различни сърдечно-съдови заболявания, възпаление и рак. Нейната разнообразна регулаторна роля, определя и интересът към тази miRNA, която се смята за една от най-проучените miRNA.

Експресията на miR-155 за първи път е съобщена в слезка и тимус на човек, а впоследствие и в черен дроб, бял дроб и бъбреци (Tam, 1997; Tam et al., 2001). След това се установява, че тази miRNA има абнормна повишена експресия в различни активирани имунни клетки (Landgraf et al., 2007), което разкрива важната роля на miR-155 в имунния отговор (Calame, 2007; Costinean et al., 2006; Rodriguez et al., 2007).

miR-155 реагира на множество възпалителни стимули, като TNF- $\alpha$ , IL-1b, интерферони, патоген, асоциирани молекулни модели (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) и увреда, асоциирани молекулни модели (damage-associated molecular patterns, DAMP) (O'Connell et al., 2007), алармини (напр. IL-1a) (Kurowska-Stolarska et al., 2017), и хипоксия (Bruning U, et al. (2011), както и TLR лиганди в моноцити/ макрофагилни клетки и (Mashima, 2015) В клетки (Thai et al., 2007)

Експресията на miR-155 се контролира от множество сигнални пътища. Регулаторните цитокини, включително TGF- $\beta$ , могат да индуцират или инхибират експресията на miR-155 (Kong et al., 2008; Pottier et al., 2009; Valeri et al., 2010). IL-10 намалява експресията на miR-155 чрез инхибиране на транскрипционния фактор Ets2

При IBD е нарушен контролът на отрицателна обратна връзка, която регулира възпалението за да се избегнат прекомерна активация на възпалителните сигнални пътища. SOCS1 е критичен отрицателен регулатор, който блокира сигналния път JAK / STAT (Yoshimura et al., 2007) и потиска IRAK4 в сигналния път TLR4 (Hawn et al., 2005). Бързото увеличаване на miR-155 потиска трансляцията на SOCS1 по време на ендотоксин, индуцираната възпалителната реакция, като позволява възпалението да продължи се да се поддържа без потискане. (Alhassa, 2017)

Ендогенните и синтетичните глюкокортикоиди са високоефективни за намаляване на острото възпаление чрез потискане на

експресията на miR-155 в глюкокортикоидния рецептор и / или чрез NF-kB (Chinenov et al., 2014; Zheng et al., 2012). Експресията на miR-155 се регулира от транскрипционен фактор, асоцииран с имунния отговор-FOXP3, който от своя страна регулира функцията на регулаторните Т клетки (Treg). Същевременно miR-155 регулира експресията на нива SATB1 и ZEB2 в клетките на Treg (Brown et al., 2018).

Chen Y, et.al, 2013 (Chen et al., 2013) разкриват, че витамин D – рецепторния сигнален път блокира активирането на NF-kB, което води до понижаване на miR-155. В резултат на това транслацията на SOCS1 се повишава, като по този начин се засилва регулацията на отрицателната обратна връзка на възпалителния отговор (Hart et al., 2011).

Най-малко 15% -20% от всички видове рак при човека, са свързани с хронично възпаление: заболявания като IBD, колоректален карцином; колит, асоцииран карцином (при улцерозен колит), хроничен гастрит и *H. pylori* (рак на стомаха) (Rath et al., 2015). Тъй като miR-155 въздейства на широк спектър от възпалителни медиатори, изследването на тази miRNA може да предложи нов поглед върху механизма на развитие на карцинома. Ето защо изследванията на експресията на miR-155, който може да разкрие потенциална връзка между възпалението и рака в стомашно-чревния тракт.

Редица изследвания показват, че експресията на miR-155 се увеличава при IBD, както при ЯК, така и при БК (Fasseu et al., 2010; Takagi et al., 2010; Wu et al., 2010) Тези резултати, кореспондират и с резултатите от настоящото проучване, където експресията на miR-155 е значително по-висока при пациентите с IBD, отколкото при здравите контроли. В друго проучване на Béres et al. (Béres et al., 2016) сред педиатрични пациенти с БК и ЯК, авторите установяват, че експресията на miR-155 е значително повишена в зоните с възпаление на лигавицата в сравнение със здрави контроли. Szűcs et al., съобщават за подобни резултати с повишена експресия на miR-155 (Szűcs et al., 2016), а при оценка на възпалението на стомаха и дуоденума в хода на инфекция с *H.pylori* се съобщава от Wan J et al. (Wan et al., 2016)

При пациенти с активен ЯК, miR-155 е с повишена експресия в сравнение със здрави индивиди, което е резултат от директно намаляване на експресията на FOXP3 гена, а това от своя страна може да активира NF-kB сигнален път и да повиши възпалителни цитокини и да поддържа възпалението (Kaser et al., 2010; Moschos et al., 2007). Тези резултати се потвърждават и от настоящото изследване.



Интересно е, че в тъкани и клетки от стомашен карцином, експресията на miR-155 намалява. Вероятно процесът на туморогенезата е сложен и може да протича чрез заглушаване или загуба на експресията на miR-155 (Wan et al., 2016). В същото време при пациентите с КПК е установена свръхекспресия на miR-155 (Qu, et al., 2015; Xiao et al., 2009).

В настоящото проуване пациентите с колонна локализация и персистиращо възпаление без постигане на ремисия имат значително по-висока експресия на miR-155. Известно е, че хроничното възпаление е в основата на IBD, но и при колит, асоциирания карцином при ЯК както и при КПК (Rath et al., 2015). Затова промяната в експресията на miR -155 в хода на мониториране на възпалителните процеси при IBD, трябва да се проследява с оглед ранното откриване на дисплазия. За да се оцени ролята на miR -155 в туморогенезата са необходими продължителни проспективни кохортни проучвания сред IBD пациентите, които да се наблюдават за да се валидира промяната в експресията на miR -155 при начало на дисплазия и преход в туморогенеза.

По отношение на локализацията и формата на протичане на IBD, други автори установяват, че повишената експресия на miR -155 в интестинални миофибробласти и в колонна мукоза са свързани с контрола на Th17 възпалителния път, с цел FOXO3a и IL-8, което води до повишаване и на фиброобразуването (Min et al., 2014; Pathak et al., 2015).

Тъй като е доказано, че miR-155 играе важна роля в контрола на възпалението и имунната регулация логично експресията на miRNAаата е значително по-висока при пациентите с активна болест, независимо от инструментите за оценка на активността.

Лечението с 5-АСА и биологични медикаменти е високо ефективно при пациенти с ЯК и води до ниски стойности на експресията на miR-155, близки до или под праговата стойност за здрави контроли. От друга страна при пациентите с БК на терапия с 5-АСА не се постигат такива ниски стойности на експресия на miR-155, тоест при това лечение има експресия miR-155 както при възпаление и вероятно трудно ще се постигне на ремисия.

По литературни данни лечението с кортикостероиди е високоефективно за подтискане на остро възпаление посредством промяна в експресията на miR-155 (Chinenov et al., 2014; Zheng et al., 2012). При нашите пациенти на фона на лечение с кортикостероиди за индукция на ремисия, се установи повишена експресия на miR-155, което може да се обясни с факта, че постигането на ремисия с кортикостероиди

не винаги води до потискане на възпалението в дългосрочен план и е свързано е с висок риск от рецидиви и усложнения.

В настоящото проучване повишената експресия на miR-155 при пациенти с IBD се свързва с колонна локализация, персистиращо възпаление, висока активност на заболяването, дефицит на витамин D и лечение с кортикостероиди. Понижена експресия на miR-155 до нива близки до тези на здрави контроли се наблюдава основно при пациенти с ЯК и постигната ремисия на фона на биологична терапия. Тъй като miR-155 има съществено значение за оценка на възпалителния процес и играе важна роля в туморогенезата, е необходимо продължителното проактивно мониториране на нейната експресия при пациенти с активна IBD, което може да разкрие потенциалната връзка между възпалението и рака в стомашно-чревния тракт.

### **miR-191\_1**

В областта на IBD, Lin et al. (Lin et al., 2013) докладват, че miR-191 може да бъде потенциален диагностичен биомаркер, който да разграничи ЯК от БК, тъй като е въввлечена в регулацията на вродения и придобит имунитет (Paraskevi et al., 2012). Някои автори свързват повишената експресия на miR-191 в тъкани от пациенти с Крон колит в сравнение със здрави контроли (Wu et al., 2010) Скорошни проучвания разкриват, че експресията на miR-191 има за цел Zonula occludens-1 и осъществява регулация на плътните връзки като редуцира увредите причинени от TNF- $\alpha$  (Bi et al., 2020; Li et al., 2020; Wang et al., 2017) и така участва в контрола на епителната бариера, увредата на която е ключов елемент в патогенезата на IBD.

В свое изследване Charman и Pekow установяват, че в тъканите на пациенти с БК има свръхекспресия на някои miRNAs сред, които се откроява и miR-191 (Charman and Pekow, 2015).

Резултатите от настоящото изследване показват, че експресията на miR-191\_1e сигнификантно по-висока при пациенти с активен БК спрямо здрави контроли. За подобни резултати съобщават и Wu et al., които описват, че в биопсия от колон сигмоидеум на пациенти с активен БК експресията на miR-191 е значително повишена, отколкото е при здрави контроли (Wu et al., 2011). В по-ранно изследване Wu et al. установяват, че експресията на miR-191 е повишена при пациенти с хронична активност на БК (Wu et al., 2010). Други автори също описват повишена експресия на miR-191 при пациенти с БК в сравнение със здрави контроли (Xu and

Zhang, 2016).

Paraskevi et al. установяват, че има съществена разлика в експресията на тази miRNAa между пациенти с БК и ЯК ( $p < 0.05$ ), като експресията на miRNAaта е значително по висока при пациентите с БК (съответно  $3.42 \pm 0.43$  за БК и  $0.84 \pm 0.37$  за ЯК) (Paraskevi et al., 2012). Подобни резултати се установяват и в настоящото изследване.

За разлика от Zeng et al., които установяват повишена експресия на miR-191 в лигавица от колон при пациенти с БК (Zeng et al., 2019), в настоящото проучване се установи повишена експресия на miRNAaта при пациенти с ангажиране на терминален илеум (L1) от основния възпалителен процес.

Поради ограничения брой и обхват на публикуваните изследвания не бяха намерени резултати за връзката между експресията на miR-191 и индексите за активност на заболяването, както и за връзката с други маркери на възпалението. В нашето изследване установихме, че при пациенти с БК повишената експресия на miR-191\_1 корелира умерено правопрпорционално с CDAI и FCP, като остава повишена спрямо здрави контроли дори и при постигане на ремисия на заболяването.

По отношение на пациентите с ЯК не се установи съществена разлика в експресията на miR-191\_1 според активността и локализацията, като само при пациентите хронично персистираща активност експресията на miRNAaта е значително по-висока. Друга зависимост в тази група пациенти е свързана с ЕИП.

От представените литературни данни и получените резултати от настоящото изследване може да се заключи, че серумната експресия на miR-191 може да бъде използвана като неинвазивен биомаркер за разграничаване на БК от ЯК. Резултатите показват, че експресията на тази miRNAa е значително по-висока при пациенти с активна БК, тънкочревна локализация, както и при пациенти с ЯК – хронично персистираща форма и ЕИП. При пациентите с БК miR-191 корелира с други неинвазивни биомаркери като FCP, както и оценъчни скали като CDAI.

### **miR-199a\_1**

Намалената експресия на miR-199-5p в Т клетките води до инхибиране на автофагията и увеличаване секретията на проинфламаторните цитокини. Свърхекспресията на miR-199-5p стимулира експресия на гени, свързани с автофагията и снижава нивата на TNF- $\alpha$ , IL-17 и IL-23. (Wang et al., 2017)

Wu et al. (2011) съобщават за повишена експресия на miR-199-3p в периферна кръв при пациенти с ЯК и повишена експресия на miR-199-5p при пациенти с БК (Wu, et al., 2011).

Chao Li през 2016 описва, че miR-199a влиза в групата на профибротичните miRNAs (Li, 2016). Най-много проучвания на нейната роля са извършени в областта на белодробната и чернодробна фиброза. Експозицията на TGF- $\beta$  стимулира експресията на miRNA-199 a-5p, която от своя страна може да стимулира активация на фибробласти с тяхната последваща, пролиферация, миграция, инвазия и деференциация в миофибробласти (Li, 2016). miR-199 потиска някои мезенхимните маркери, като таргетът ѝ е N-кадхерин (Suzuki and Miyazono, 2010).

През 2019 Boros et al. съобщават, че miR-199 оказва негативно въздействие на някои транскрипционни фактори като snail family transcriptional repressor -1 (SNAIL1), тирозин киназни рецепторни сигнални пътища, като AXL receptor tyrosine kinase (AXL) и хипоксия, индуциращ фактор (hypoxia inducible factor-1, HIF1a). При отпадане на този тип инхибиция и повишаване на експресията на група miRNAs, сред които и miRNA-199. Това води до загуба на апикално-базалния поларитет на клетката, разкъсване на връзките между епителните клетки и както и между епителните клетки и базалната ламина, преустройство на ЕЦМ, повишена подвижност на клетките и епително-мезенхимен преход (ЕМП). Според една съвременна хипотеза тези промени водят за появата на фистулизиращата форма на БК, но ЕМП се свързва и с развитието на т.нар. фенотип ракови стволови клетки (cancer stem cells) (Boros and Nagy, 2019).

През 2020 година Rashid et al. обобщават данните от различни проучвания и съобщават, че при пациентите с КРК има повишена експресия на група miRNAs, включително и miR-199-3p (Rashid et al., 2020).

Като се анализират данните от литературата се откроява възможността за приложението на тази miRNAa при системно мониториране на имуномедираното възпаление и ранна детекция на КАК.

В настоящото изследване се установи, че експресията на miR-199 при пациенти с БК и ЯК има както прилики, така и различия, които са съобщени и от други автори (Paraskevi et al., 2012; Wu et al., 2011). Wu et al. установяват, че експресията на miR-199 е повишена при пациенти с активен ЯК и БК в сравнение със здрави контроли (Wu et al., 2011). Paraskevi et al. също докладват за повишени нива на серумната експресия

на miR-199a-5p при пациенти с БК и ЯК (съответно  $7.26 \pm 1.24$  за БК и  $5.64 \pm 0.82$  за ЯК) (Paraskevi et al., 2012). За разлика от тези автори в настоящото изследване се установи, че високата експресия на miR-199 корелира с умерената тежест на заболяването при пациенти с ЯК и хронично персистиращата форма на протичане. В свое изследване Ahmed et al. установяват значително по-високи стойности в експресията на тази miRNAs при пациенти с КПК (Ahmed et al., 2009). В настоящото проучване се установи висока експресия на miR-199 при пациентите с хронично персистираща форма на протичане ЯК. Поради описаната в литературата връзка на високата експресия на miR-199 при пациенти с КПК (Rashid et al., 2020), уместно би било при пациенти с висока експресия, мониторирането да бъде на по-кратки интервали за да се предотврати или установи рано формирането на КАК. При пациентите с БК се установи, че тези в ремисия имат несигнификантно по-висока експресия на miR-199 спрямо тези в активност. От друга страна се установи, че циркулиращата miR-199 има по-високи стойности при пациентите с БК спрямо здрави контроли (съответно 2.39 за БК към 1.26 за здрави контроли), докато при пациентите с ЯК стойностите на серумната експресия на miRNAата е по-ниска в сравнение с тази на здравите контроли (съответно 1.08 за ЯК към 1.26 за здрави контроли). В свое изследване Iborra et al. установяват, че има съществена разлика в серумните нива на miR-199 при пациенти с ЯК спрямо здрави контроли (1.38;  $p=0.027$ ) (Iborra et al., 2013).

От друга страна Zeng et al. установяват, че експресията на miR-199 се повишава при пациенти с активна БК спрямо пациенти с БК, които са в ремисия (Zeng et al., 2019). Противоположно на тези резултати, в настоящото проучване експресията на miR-199 в ремисия в по-висока в сравнение с тази при пациентите с умерена активност на БК.

Други автори като Fasseu et al. (Fasseu et al., 2010) и Pekow и Kwon (Pekow and Kwon, 2012) намират, че експресията на miR-199 (miR-199a-3p, miR-199b-5p) се понижава в тъкан на дебелото черво при пациенти с ЯК спрямо пациенти с БК в ремисия. В настоящото изследване също се установява по-ниска експресия на miR-199 при пациентите с дебелочревна локализация и в двете групи пациенти. От друга страна при пациентите с БК високата експресия на miRNAата корелира с тънкочревната локализация (L1) на болестта.

В литературата не бяха намерени данни за връзката на експресията на тази miRNAа и възрастта при пациентите с IBD. В това

изследване се установи, че серумната експресия на miR-199 корелира правопрпорционално с възрастта при пациентите с БК.

Въпреки, че не беше установена съществена разлика в нивата на циркулиращата miR-199 според прилаганата терапия и двете групи пациенти, може да каже че експресията на miRNAата на фона на биологична терапия се повишава при пациентите с БК (2.63), като се доближава до нивата постигнати при ремисия (2.52). При пациентите с ЯК се наблюдава постигане на ремисия според експресията на miR-199 при лечение с 5-ACA (0.94).

Малката популация, различните извадки и методологията, използвана в публикуваните проучванията могат да обяснят различните модели на експресия на miRNAата, идентифицирани в нашата група.

### **miR-451\_1**

miR-451 е идентифицирана за първи път преди повече от десетина години в хипофизарна тъкан от човек (Altuvia et al., 2005).

Семейството на miR-451 включва hsa-miR-451a и hsa-miR-451b. Генът, кодиращ тази miRNA, се намира в 17 хромозома, 17qll.2 (chr17: 28861369-28861440 и 28861371-28861438). Зрели форми на miR-451 имат дължина 22 нуклеотида (Khordadmehr et al., 2019). miR-451 се експресира в различни тъкани, участва в множество физиологични и патологични процеси, включително диференциация на хемопоеичната система, ембрионално развитие, полярност на епителните клетки и развитие на нервната система (Bai and Wu, 2019). miRNA -451 има нарушена регулация при редица онкологични заболявания. Взема участие множество биологични процеси, свързани с неопластичните болести, като пролиферация, апоптоза, ангиогенеза, ЕМТ, лекарствена резистентност и метастазирание. Често действа като тумор супресорен ген при множество неопластични заболявания и модулира различни сигнални пътища пътища (Khordadmehr et al., 2019).

Има все повече доказателства за важната роля на miR - 451 при имуномедиирани заболявания. miR-451 е с повишена експресия в серум от пациенти със системен лупус еритематодес, болест на Грейвс и тиреоидит на Хашимото в сравнение с здрави контроли (Wang et al., 2012; Yamada, 2014). Вероятно тази miRNA участва в патогенезата на тези заболявания. IBD са пример за имуномедиирани заболявания с неясна патогенеза и трудна за проследяване активност, поради разнообразната клинична картина.

Малобройни са достъпните в научната литература публикации, които разглеждат ролята на експресията на miRNA-451 при пациентите с IBD.

Лечението с ГК е залегнало в препоръките на ECCO за постигане на ремисия при умерено- тежки до тежки форми на активност при пациенти с IBD. (Torres et al., 2020). Често отговорът към това лечение не може да се предвиди. При изследване ефекта от ГК лечение сред педиатрични пациенти с IBD De Iudicibus et al. установяват, че miR-451 има повишена експресия (De Iudicibus et al., 2018). Тази експресия може да служи за преценка на чувствителността към ГК лечение при IBD пациентите. Подобни резултати се установяват при пациентите с БК в настоящото проучване.

Серумните miRNA, се експресират в хода на възпаление на стомашно-чревния тракт, могат да повлияят регулаторните функции на витамин D и неговите сигнални пътища посредством обратна връзка. (Paraskevi et al., 2012; Zahm et al., 2011; Zhao et al., 2018). Тези литературни данни могат да обяснят връзката между понижените нива на Витамин D и повишената експресия на miR-451 установена в настоящото изследване при пациентите с БК и ЯК.

Проучванията относно нивата на Вит. В12 при пациентите с IBD са противоречиви (Erzin et al., 2008; Headstrom, 2008; Yakut et al., 2010).

Според Battat et al. (Battat et al., 2014) основния рисков фактор за дефицит на Вит. В12 е локализация на БК терминален илеум и докато при ЯК не се установява подобна зависимост. В настоящото проучване повишените нива на циркулиращата miRNA-451 се свързват с активна болест и локализация на болестта терминален илеум (L1) и дебело черво (L2). Ниските нива на Вит. В12 са свързани с намалена резорбция в терминален илеум и активна болест с повишена експресия на miRNA-451.

Хроничното персистиращо възпаление и невъзможността за постигане на ремисия при пациентите с IBD носят повишен риск от развитие на КАК. miRNAs са широко използвани като диагностични и прогностични биомаркери при карциноми на чревния тракт. miRNAs играят важна роля в контрола на сигналните пътища, участващи във всички етапи на възпалението и преход към КПК (Chivukula, et al., 2014; Liu and Chen, 2010). Редица автори са установили, че експресията на miR-451 е понижена при КПК (Chivukula et al., 2014); Liu and Chen, 2010). В настоящото проучване не са обхванати пациенти с КАК в хода на IBD, нито пациенти с дисплазия. Въпреки това екстраполацията на данните от

литературата показва, че ниската експресия на miRNA-451 се наблюдава при КРК. Тези резултати насочват клиницистите да мониторират проактивно пациенти, които имат такава ниска експресия на тази miRNAa при обширен обхват и тежка активност на БК или ЯК.

Повишените нива на miRNA-451 при пациенти с IBD се свързват с активна болест, тънчочревна локализация, дефицит на Витамин В12 и Витамин D и кортикостероидно лечение.

### **miR-1228-3p\_1**

miR-1228 първоначално е открита при бозайници (macacus Rhesus) и в мозъчни тъкани на човека (Berezikov et al., 2007), но нейната функция все още не е определена напълно и продължава да се изяснява.

Екип от учени в едно ново проучване установяват, че MMP1 има огромно значение за развитието на ЯК посредством регулиране на сигналния път miR-1228/ PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor), което дава перспектива за бъдещи проучвания (Yang et al., 2019).

Скоростни изследвания показват, че miR-637 и miR-1228 са в състояние да потиснат, алфа 1 веригата на колаген тип IV и костната морфогенна протеин-2, индуцирана киназа (Zhao et al., 2018). Индуциране експресията на miR-1228 от витамин D (25 (OH) D) може да повлияе положително на диференциацията на остеобластите, минералната обмяна и ремоделирането на костите. Тъй като при пациентите с IBD се наблюдават промени в костното здраве, дължащи се на самите заболявания и /или приложението на различни медикаменти, интересът в тази област на проучване нараства и заслужава нови по-задълбочени изследвания.

При ЯК MMP1 играят ключова роля за развитието на заболяването посредством регулацията на miR-1228/PPAR сигналния път. Известно от литературата е, че сигналният път PPAR $\gamma$  съществува в имунната система, мастната тъкан, свръхекспресиран в колонната тъкан (Willson et al., 2000) и участва в патогенезата на БК (Kong et al., 2018; Yao et al., 2017). Свръхекспресията на PPAR $\gamma$  в колонна тъкан може да обясни повишената експресия на miR-1228 при дебелочревната локализация на БК в настоящото изследване.

Различни автори установяват, че ниските нива на витамин D (25 (OH) D) могат да бъдат свързани с по-висока активност (Ham et al., 2014), тежка болестта, по-агресивен ход и лоша прогноза на IBD (Ananthakrishnan et al., 2014). В настоящото изследване се установи, че при



пациентите с БК ниската експресия на miR-1228, корелира с ниски нива на витамин D (25 (OH) D), високи нива на CRP и обширен обхват на заболяването. При пациентите с ЯК високата експресия на miR-1228 се свързва с повишени нива на CRP. От друга страна високата активност на IBD, измерена чрез индексите за активност се свързва с повишена експресия на miR-1228.

В настоящото изследване се установи повишена експресия на miR-1228 при активна болест (ЯК, БК), тънчочревна локализация (БК) и пенетриращ фенотип (БК), докато понижената експресия е свързана с имunosупресивна (БК) и биологична (ЯК) терапия.

### **5.5. Изследване на серумната експресия на съответните miRNAs:**

\*Hs\_miR-28\_1; \*Hs\_miR -29c\_1; \*Hs\_miR -96\_1; \*Hs\_miR -191\_1; \*Hs\_miR -451\_1; \*Hs\_miR -142-5p\_1; \*Hs\_miR -199a\_1; \*Hs\_miR -363\_1; \*Hs\_miR -144\_4; \*Hs\_miR -142-3p\_2; \*Hs\_miR -155\_2; \*Hs\_miR -16\_2; \*Hs\_miR -1228-3p\_1 и контролни: \*Hs\_RNU6-2\_11; Ce\_miR-39\_1 **при пациенти с IBD и се сравни със серумните нива на Витамин D (Задача 5)**

Установено е, че в основата на патогенезата на IBD, стои нарушеният баланс между регулаторните и провъзпалителни пътища на имунната система, както и нарушенията в целостта на епителната бариера, ето защо изследване нивата на витамин D има съществено значение за разкриване на процесите, които довеждат до развитието на БК и ЯК, като дава възможност за изграждане на нови терапевтични стратегии.

Сред пациентите- деца и възрастни с IBD, се съобщава се за висока честота на недостиг и дефицит на витамин D, (Caviezel et al., 2018; Sharifi et al., 2018; Strisciuglio et al., 2018), въпреки че данните са противоречиви (Garg et al., 2013; Veit et al., 2014).

Известно е, че малабсорбцията и възпалението, които участват в патогенезата на IBD, оказват влияние върху серумните нива на витамин D (Del et al., 2015; Frigstad et al., 2017; Torki et al., 2015).

Честотата на разпространение на дефицит на витамин D при IBD варира от 16 до 95%. Някои автори намират, че се среща по-често при БК, отколкото при ЯК. (O'Sullivan, 2015; Sadeghian et al., 2016; Suibhne et al., 2012).

Витамин D има важна роля в регулиране на имунната система (Mitchell et al., 2012).

Имунните клетки експресират VDRs и ензимите, необходими за превръщането на 25 хидроксивитамин D (25(OH) D) в дихидроксивитамин D 1,25 (OH)<sub>2</sub>D. Съобщава се, че ендогенно произведеният 1,25 (OH)<sub>2</sub>D (Mora et al., 2008) може да модулира придобития имуноен отговор чрез промяна на действията на активирани T и B клетки, а също така може да модулира вродения имуноен отговор чрез регулиране на макрофагите и зрението и функционирането на дендритните клетки (Mora et al., 2008).

Витамин D намалява Th1 / Th17 T клетки и провъзпалителни цитокини като IL-1, IL-6, IL-8, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , в полза на Th2 отговор, увеличава Tregs клетки, инхибира диференциация на дендритните клетки, спомага за поддържане на имуноен толеранс, като същевременно засилва вродени защитни имунони отговори (Kamen and Tangpricha, 2010).

Витамин D и неговият рецептор подпомагат целостта на епителната бариера на червата като потискат апоптозата на епителните клетки и така регулират процесите на възпаление (Bain and Mowat, 2014; Barbáchano et al., 2017; Bartels et al., 2013; Chen et al., 2014; Dionne, et al., 2017; Du et al., 2015; He et al., 2018; Huang et al., 2018; Li et al., 2015; Liu et al., 2013a; Liu et al., 2013b; Shi et al., 2016; Stio et al., 2016; Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2019).

В същото време, витамин D оказва негативен контрол над някои провъзпалителните пътища, като IL-23-рецепторният път, както и пътищата на TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  (Bain, 2014; Bartels et al., 2013; Bendix et al., 2017; Dionne et al., 2017; Konya et al., 2018; Zhang et al., 2012).

Витамин D оказва влияние и върху чревния микробиом (Ghaly et al., 2018; Schäffler et al., 2018).

Серумните miRNAs, се секретират в хода на възпалението на стомашно-чревния тракт и от своя страна могат да повлияят регулаторните функции на витамин D и неговите сигнални пътища посредством обратна връзка. (Paraskevi et al., 2012; Zahm et al., 2011; Zhao et al., 2018).

Ето защо са необходими допълнителни изследвания, които да разяснят взаимовръзките между нивата на витамин D в серум и циркулиращите miRNAs при пациенти с IBD.

В това проучване дефицитът на витамин D е преобладаващ при пациентите с IBD и изглежда е свързан с повишена активност на заболяванията. Обширно проучване на Ananthakrishnan при пациенти с

IBD успява да свърже ниските нива на витамин D с множество резултати, и по този начин добавя съществена информация към нарастващото количество доказателства, свързващи нивата на витамин D с активността на IBD (Ananthkrishnan, 2016).

В настоящото изследване активността на IBD, измерена със съответните индекси (CDAI, Partial Endoscopic Mayo Score), както и класическите биомаркери (CRP и FCP) показват обратнопропорционална умерена зависимост с нивата на витамин D.

Витамин D е имунен модулатор на вродената и придобита имунна система, и неговият дефицит при пациенти с IBD е свързан с повишен риск на рецидиви на заболяванията, хоспитализации и операции (Atanassova et al., 2019; Nielsen et al., 2018).

Ниските нива на Витамин D могат да бъдат свързани с по-голяма болестна активност (Ham M, et al. (2014), тежест на болестта, по-агресивен ход и лоша прогноза на заболяването (Ananthkrishnan et al., 2014).

1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> влияе върху експресията на някои miRNA в различни тъкани.

Доказано е, че miR-155 участва в различни етапи от патогенезата на IBD, като се установява свръхекспресия на тази miRNA в тъканите на пациенти с IBD (Liu et al., 2018; Moret-Tatay et al., 2016). В настоящото проучване експресията на miR-155 корелира с дефицита на Витамин D при пациентите с IBD.

Chen Y. et al. разкрива нов регулаторен механизъм, чрез който Витамин D рецепторният сигнален път контролира TLR4-медирано възпаление при IBD и имуномедирано заболявания. Този противовъзпалителен механизъм се опосредства от miR-155, чрез потискане регулацията, която снижава SOCS1. Това води до засилване на регулацията на отрицателна обратна връзка. Витамин D – рецепторният сигнален път инхибира miR-155 чрез транскрипционен механизъм (Chen et al., 2013). Този процес на потискане на експресията на miR-155 се доказва и в нашето изследване, като се установи обратно пропорционална зависимост между нивата на Витамин D и експресията на miR-155. Дефицита на Витамин D корелира с по-висока експресия на miR-155.

Серумните miRNAs имат значение при диагностиката и разграничаването на IBD. Schonauen et al. съобщават, че серумните концентрации на miR-16 са по-високи при пациенти с IBD, отколкото при здрави контроли, а нивата са по-високи при БК в сравнение с ЯК (Schonauen et al., 2018). В настоящото изследване няма съществена

разлика в серумната експресия на miR-16 от гледна точка на нивата на витамин D.

Към днешна дата ограничен брой доклади са документирали ефектите на серумни концентрации от 25 (OH) D върху експресията на miRNA и наличието на възпаление. Enquobahrie et al. описват промени в матрични RNA и miRNA в периферна кръв при 13 бременни жени с високи ( $\geq 31.7$  ng / mL) или ниски ( $\leq 25.5$  ng / mL) серумни концентрации от 25 (OH) D (Enquobahrie et al., 2011). Авторите установяват, че има зависимост между нивата на Витамин D, експресията на изследваните от тях miRNAs и развитието на възпалителни процеси.

В нашето изследване повишената експресия на две miRNAs (miR-28\_1 и miR-1228-3p\_1), корелира с нормалните нива на витамин D. При дефицит на витамин D установихме повишена експресия на miR-96\_1, miR-142-5p\_1, miR-155\_2, miR-199a\_1 и miR-451\_1.

Резултатите от проучвания, изследващи връзката между нивата на витамин D, активността на IBD и най-често използваните маркери на възпалението (Jørgensen et al., 2010; Jørgensen et al., 2013; Nam et al., 2014; Ulitsky et al., 2011), са противоречиви (Garg et al., 2013; Kelly et al., 2011). Това се потвърждава и в настоящото проучване. Установи се обратнопропорционална зависимост между нивата на CRP и витамин D при пациенти с БК от една страна, а от друга при пациентите с ЯК не се установи подобна зависимост. Активността на болестта (измерена чрез CDAI и Partial Mayo Score) и нивата на FCP и при двете болести корелират обратнопропорционално с нивата на витамин D.

Като и при двете заболявания- БК и ЯК, бяха установени зависимости между серумната експресия на различни miRNAs и нивата на витамин D.

Настоящите резултати показват, че 60.9 % от изследваните пациенти с ЯК са с дефицит на витамин D, като има съществена разлика в серумните нива при пациенти с активност и тези в ремисия. Някои автори установяват, че увеличението нивата на витамин D показва силна зависимост с намаляване маркерите за възпаление и резултатите от клиничната активност. В едно изследване дефицитът на витамин D е свързан с повишена активност на ЯК ( $p = 0,04$ ), като 68% от пациентите с дефицит на витамин D имат активно заболяване в сравнение с 33% от пациентите с нормални нива на 25(OH)D (Blanck and Abera, 2013).

Скорошно проучване показва, че серумните нива на 25-хидрокси витамин D от 35 ng / mL или по-малко при пациенти с ЯК в клинична

ремисия, са свързани с висока честота на последващ рецидив на болестта. Пациентите в ремисия със серумни нива  $<35 \text{ ng / mL}$  с изходно възпаление, имат по-голяма вероятност за по-ранен релапс от пациенти с нива  $> 35 \text{ ng / mL}$  (Gubatan et al., 2017). Повишаването на нивата на витамин D може да намали риска от рецидив на ЯК.

Изследване от Корея, установява отрицателна връзка между нивата на витамин D и CRP при пациенти с БК, докато при пациентите с ЯК не се наблюдава връзка между серумните нива на D и CRP (Jun et al., 2018). Други автори, като Abbas et al, (Abbas et al., 2015) доказват, че при пациенти с ЯК, има обратна зависимост между CRP и нивата на витамин D. В рандомизирано контролирано проучване на Sharifi et al, (Sharifi et al., 2016) нивата на CRP са по-ниски в групата на пациентите, получили витамин D в сравнение с плацебо. Намалването на FCP е значително по-високо в групата на лекувана с витамин D в сравнение с плацебо. В проучване, описано от Garg et al., (Garg et al., 2018) е наблюдавана значителна обратна зависимост между нивата на витамин D и FCP при пациенти с IBD. В резултатите от настоящото изследване не се установи зависимост между серумните нива на CRP и витамин D, подобно на корейското изследване. По отношение на FCP нашите резултати подкрепят тези на Garg et al., че съществува обратнопропорционална зависимост между витамин D и FCP.

Това е първото клинично изпитване при пациенти с ЯК, което оценява ефекта на серумните концентрации на витамин D върху експресията на някои циркулиращи miRNAs.

Paraskevi et al. идентифицират шест серумни miRNA (miR-16, miR-21, miR-28-5p, miR-151-5p, miR-155 и miR-199a-5p), чиято експресия се увеличава при пациенти с ЯК в сравнение със здрави контроли (Paraskevi et al., 2012).

Резултатите от настоящото изследване показаха зависимост само между шест miRNAs от тринадесетте изследвани успоредно с нивата на витамин D - miR -28\_1, miR -96\_1, miR-155\_2, miR-191\_1, miR-451\_1 и miR-1228-3p\_1. В литературата липсват данни за връзката между експресията на тези miRNAs и нивата на витамин D при пациенти с ЯК, с изключение на miR -155, която е една от най-често проучваните miRNAs.

Доказано е, че miR-155 регулира вродените имунни отговори и TLR сигнализацията (Yoshimura et al., 2007). SOCS1 е важен отрицателен регулатор, който блокира сигналния път JAK / STAT (Hawn et al., 2005; Yoshimura et al., 2007). Бързото увеличение експресията на miR155

потиска трансляцията на SOCS1 при възпаление и води до свърхвъзпалителна реакция. Два авторски колектива доказват, че витамин D и VDR сигнален път потискат активирането на NF- $\kappa$ B, което води до понижаване експресията на miR-155 (Mora et al., 2008; Yunzi et al., 2013). VDR сигнален път инхибира miR-155 чрез транскрипционен механизъм (O'Connell et al., 2009). Витамин D блокира индукцията на TNF- $\alpha$ , IL-6 и miR-155 в човешки полиморфонуклеарни клетки от периферна кръв (PBMC), чрез повишаване регулацията SOCS1 и потискане експресията на miR-155. SOCS1 се явява основен регулатор на обратната връзка на възпалението индуцирано от липополизахариди (LPS), при което се потискат сигналните пътища на TNF- $\alpha$ , IL-6 и IFN- $\gamma$ , основни за развитието на IBD (Chen et al., 2013). Резултатите от настоящото проучване потвърждават установената регулаторна връзка между експресията на miR-155 и прогресията на възпалението при дефицит на витамин D. От друга страна ние установихме, че дефицита на Витамин D (25(OH)D), носи най-голям риск за промяна в серумната експресия на miR-1228-3p\_1, което потвърждава значимостта на наскоро доказаните в литературата сигнални пътища miR-1228/PPARs за развитието на ЯК (Yang et al., 2019).

Индукцирането на miR-1228 от витамин D може да повлияе положително на диференциацията на остеобластите, минералната обмяна и ремоделирането на костите. Тъй като при пациентите с IBD се наблюдават промени в костното здраве, дължащи се на самите болести и /или приложението на различни медикаменти, интересът в тази област на проучване нараства и заслужава нови по-задълбочени изследвания. Към днешна дата ограничен брой съобщения са документирали ефектите на серумните концентрации на витамин D (25 (OH) D) върху експресията на miRNA, като се подчертава ролята на витамин D статуса и експресията на miRNAs върху възпалението, метаболитните процеси и развитието на органи и системи. (Mulligan et al., 2010; Zhao et al., 2019)

Все пак ролята на витамин D при пациенти с ЯК не е напълно изяснена. Не е уточнено дали ниските нива на витамин D водят до повишена активност на заболяването или са в резултат от тежестта на ЯК. Настоящото проучване показва значителна обратна връзка между нивата на витамин D и чревното възпаление, като не може да се определи причината и следствието. В литературата има данни от експериментални животински модели, които подкрепят връзката между ниските нива на витамин D и високата активност на болестта (Cantorna et al., 2000; Froicu

and Cantorna, 2007). Необходимо е да се планират добре обмислени проспективни кохортни проучвания сред пациенти с ЯК, за да се установи и докаже връзката между нивата на FCP, серумната експресия на витамин D и определени miRNAs, които впоследствие могат да послужат за изграждане на нови терапевтични режими.

Резултатите от нашето изследване потвърждават тези на други автори за високата честота на дефицит на витамин D сред пациентите с БК. В Ирландия 63% от пациентите с БК имат нива на 25-ОН витамин D <50 nmol / L (Suibhne et al., 2012). Честотата на недостиг на витамин D в Канада е 22% (<40 nmol / L) (Siffledeen et al., 2003). Японско проучване установи, че 27,3% от пациентите с БК са с недостиг на витамин D (<25 nmol / L) (Tajika et al., 2004).

Има сериозни доказателства в подкрепа на високото разпространение на значително по-ниските серумни нива на 25-ОН витамин D сред популацията на IBD, за които е доказано, че корелират с повишената активност на заболяването. При анализа на корелацията между серумните нива на витамин D и активността на БК резултатите от нашето проучване кореспондират с тези на Chatu et al. (Chatu et al., 2013). При всички пациенти с IBD нивата на CRP са с обратна зависимост с нивата на витамин D (Fu et al., 2012). Chatu et al. (2013) не откриват разлики в средните нива на витамин D сред пациентите с БК и ЯК; въпреки това, средното ниво на витамин D е значително по-ниско сред азиатската и афро-американската раса в сравнение с кавказката (Chatu et al., 2013).

Доказано е, че нивата на витамин D корелират отрицателно с активността на болестта, оценена чрез CDAI (Jørgensen et al., 2013). Joseph и др. (2009) показват, че пациентите с БК имат значително по-ниски нива на витамин D в сравнение с контроли (Joseph et al., 2009). Някои автори установяват, че по отношение на тежестта на заболяването, пациентите с лека активност на БК имат нива на витамин D, подобни на контролите. При пациентите с умерено-тежка БК, нивата на витамин D са значително по-ниски (Joseph et al., 2009). Освен това, Suibhne и др. (Suibhne et al., 2012) съобщават, че дефицитът на витамин D е често срещан сред пациентите с БК дори и в клинична ремисия. (Suibhne et al., 2012). Локализацията на болестта, активността или предишната резекция вероятно може да не са единствените фактори, които влияят върху бионаличността на витамин D (Farraye et al., 2011).

Досега има малък брой публикации, в които се изследва възможната връзка между 25ОНD и чревното възпаление с помощта на FCP (Garg et al., 2013). Garg M et al. в Австралия провеждат изследване сред 40 пациенти с БК и стигат до заключението, че съществува значителна обратна зависимост между концентрациите на 25ОНD и FCP (Garg et al., 2013). Тези резултати напълно кореспондират на резултатите от настоящото изследване.

Стойността на различно експресирани серумни профили на miRNAs като биомаркери за диагностика и мониторинг на IBD е широко проучена. Съществуват обаче сравнително ограничени познания относно връзката между експресията на отделни miRNAs при имуномедирирани заболявания и серумните нива на витамин D. А. Hsieh през 2016 г. публикува резултати от връзката между miR-142-3p и витамин D в миши модели. Авторът установява, че дефицитът на витамин D променя експресията на miR-142-3p, насочена към автофагичния ген ATG16L1, като допринася за повишената чувствителност към IBD (Hsieh, 2016). Друг автор, който изследва връзката между витамин D и някои miRNAs при пациенти с ревматоиден артрит установява обратна зависимост между двата фактора (Li, 2019). Въпреки хетерогенността на дизайна, методите и проучваните популации (миши модели и пациенти) резултатите показват, че съществува негативна връзка между витамин D и изследваните miRNAs. Резултатите от настоящото проучване също показват, че при повечето miRNAs (miR -96\_1, miR -142-5p\_1, miR-191\_1 и miR-199a\_1) връзката е обратна, докато само при две от изследваните miRNAs (miR-28\_1 и miR -1228-3p\_1) връзката е правопрпорционална.

В България изследването на връзката между витамин D и някои miRNAs при пациенти с БК се провежда за пръв път и малкия брой научни съобщения в световната база данни по този проблем е ограничаващ фактор за оценка на надеждността на получените резултати и сравнимостта им с тези от други изследвания. За да се преодолеят ограниченията е уместно да се извършат нови добре обмислени проучвания сред по-големи кохорти пациенти с БК, които да докажат с висока надеждност получените резултати.



## VI. ИЗВОДИ

1. Експресията на разглежданите miRNAs се различава при пациентите с БК и ЯК. При пациентите с БК експресията е сигнификантно по-висока от тази при пациентите с ЯК.
2. При изследване на експресията на miRNAs при двете групи пациенти според активността на заболяването се установи разлика не само в експресията на отделните miRNAs, но се откроява и специфичен за конкретното заболяване miRNA подтип.
3. Според локализацията (miR-199a, miR-96 и miR-155 за ЯК и miR-28, miR-142-5p, miR-191, miR-199a, miR-155, miR-1228-3p и miR-96 за БК) и формата на протичане (miR-155, miR-191 и miR-199a за ЯК и miR-16, miR-28, miR-142-3p, miR-142-5p и miR-1228-3p за БК) се установяват различни miRNAs за двете заболявания с различна посока на експресия спрямо праговите стойности.
4. Интестиналните усложнения и екстраинтестиналните прояви корелират с различни miRNAs при пациентите с БК и ЯК.
5. Давността на заболяването корелира с повишената експресия на различни miRNAs при пациентите с БК (miR-28 и miR-96) и ЯК (miR-144 и miR-155).
6. При лечение с кортикостероиди се наблюдава повишена експресия на miR-96 (БК), miR-142-3p(ЯК) и miR-155(ЯК), които са специфични за конкретното заболяване.
7. При пациенти с ЯК терапията с 5-АСА е свързана с понижена експресия на miR-16 и miR-142-5p, докато при пациенти БК има повишена експресия на miR-144.
8. При лечение с азатиоприн пациентите с БК имат понижена експресия на специфичните miRNAs (miR-28, miR-142-3p и miR-1228-3p), докато при пациентите с ЯК експресията на miR-96 е под праговата стойност, определена при здрави индивиди.
9. Биологичната терапия при пациентите с БК корелира с повишена експресия на miR-28, докато при пациентите с ЯК стойностите на miR-1228-3p се доближават до праговите стойности при здрави индивиди.
10. Повишената експресия на miR-28 при пациентите с БК е специфичен маркер за постигната ремисия и корелира с понижени нива на CRP,

FCP, постигната ремисия, оценена чрез CDAI, нормално ниво на серумно желязо, витамин B12 и витамин D.

11. Съществува зависимост между серумната експресия на miR-142-5p, miR-96, miR-199a и нивата на витамин D при пациенти с IBD. Все още не е ясно дали дефицитът на витамин D е свързан с появата на IBD, но дефицитът на витамин D има висока честота на разпространение сред пациентите с IBD.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В съвременната медицина miRNAs намират все по-широко приложение като неинвазивни биомаркери от диагностицирането до проследяването хода на различни заболявания, включително и IBD. От друга страна miRNAs намират приложение и в иновативни терапии при редица болести.

Докато в литературата съществуват множество публикации за приложението на miRNAs в диагностиката и лечението на различни онкологични заболявания, то в областта на имуномедираните болести и IBD публикациите са ограничени с противоречиви резултати, различни панели и методики на екстракция на miRNAs, различни популации от пациенти с различна давност на заболяването и поставени в различни терапевтични режими. Това значително затруднява съпоставянето на данните и избора на подходящ панел от miRNAs, който да бъде валидиран за разграничаване на БК от ЯК и здрави контроли сред българската популация.

Резултатите от настоящото изследване показваха, че в изборния панел от miRNAs има такива, които са специфични за оценка на активност и ремисия, както и за разграничаване на пациентите според Монреалската класификация, така и при използваните различни оценъчни системи и прилагани терапевтични режими.

Поради липсата на валидирани стойности бяха определени прагови стойности на miRNAs при здрави контроли, който послужиха за ориентир в посоката на експресия и въз основа на тези резултати се установи, че при пациентите с БК има свърхекспресия на разглежданите miRNAs, докато при пациентите с ЯК експресията е понижена, доближаваща се до праговете стойности на здравите контроли.

Установиха се различни miRNA-подписи за активност и ремисия на двете заболявания, като за БК специфичната miRNA за постигната ремисия е miR-28, чиято експресия е повишена, докато повишената експресия на miR-29c и miR-142-5p са специфични за постигната ремисия при пациентите с ЯК. От друга страна с активност на БК се свързва свърхекспресията на шест miRNAs (miR-16, miR-29c, miR-96, miR-142-3p, miR-191 и miR-451), докато при пациентите с ЯК има само една специфична miRNA, чиято повишена експресия се свързва с активност (miR-155).

Тънкочревната локализация се свързва с повишена експресия на четири miRNAs (miR-28, miR-142-5p, miR-191 и miR-199a), докато дебелочревната локализация корелира с повишената експресия на miR-155 и miR-1228-3p. От друга страна при обширен обхват има свръхекспресия на miR-96. При пациенти с пенетриращ фенотип има свръхекспресия на miR-142-3p, miR-142-5p и miR-1228-3p.

При пациентите с ЯК и проктит се наблюдава понижена експресия на miR-199a, която се доближава до установената прагова стойност за здрави контроли. Понижена експресия на miR-96 се установява при пациентите с лявостранен колит, докато при тези с обширно засягане на дебелото черво има свръхекспресия на miR-155. Свръхекспресията на miR-155, miR-191 и miR-199a е рисков фактор за развитието на хронично персистираща форма на протичане на ЯК.

Изследването на експресията на разглежданите miRNAs според интестиналните усложнения и екстраинтестинални прояви показва разнопосочност на резултатите при пациентите с ЯК и БК.

Едно от големите предизвикателства пред клинициста е при дебют на IBD да разграничи промените, установени чрез образните и клинични методи с каква давност са. При пациентите с БК повишената експресия на miR-96 се свързва с давност на заболяването до 5 г., а повишената експресия на miR-28 е свързана с по-голяма давност на заболяването.

При пациентите с ЯК прогностична роля за давност на заболяването до 6 г. има повишената експресия на miR-155 и miR-144, които в повечето случаи са свързани с активна болест.

От гледна точка на прилаганото лечение при пациентите с БК на биологична терапия може да се каже, че е постигната ремисия при повишената експресия на miR-28, докато понижената експресия на тази miRNA при лечение с имуносупресори (Азатиоприн) показва, че това лечение не е довело до ремисия. Лечението с 5-АСА и кортикостероиди се свързва с персистираща активност на болестта и повишена експресия на miR-96 и miR-144.

При пациентите с ЯК лечението с биологична терапия и имуносупресори (Азатиоприн) води до постигане на ремисия и понижена експресия на miR-96 и miR-1228-3p до стойности близки до и под праговете. Терапията с 5-АСА е ефективна при пациентите с ЯК тъй като се наблюдава понижена експресия на miR-16 и miR-142-5p, които са свръхекспресирани при активност. При лечение с кортикостероиди за

постигане на ремисия има свръхекспресия на miR-142-3p и miR-155, които в настоящото изследване се свързват с активна болест.

Ограниченията в това проучване са малкия брой пациенти, отсъствието на пациенти с БК и висока активност на заболяването, различната давност на болестта и факта, че проучването показва моментната експресия на miRNAs. Поради ограничения брой изследвания в областта на IBD са необходими обширни кохортни проучвания, които да валидират установените резултати и да разгледат промените на съответните miRNAs в динамика.

## **VIII. ПРИНОСИ**

### **Приноси с теоретичен характер**

1. За пръв път в България е отразено подробно и изчерпателно приложението на miRNAs при възрастни пациенти с IBD.
2. Извършено е достоверно, точно и подробно описание на експресията на miRNAs при IBD пациенти в стадий на ремисия.
3. Изчерпателно е отразена експресията на miRNAs според характеристиката на пациентите с IBD и провежданото лечение.

### **Приноси с практико-приложен характер**

1. Определени са прагови стойности за разграничаване на експресията на miRNAs.
2. Изготвен е специфичен профил на пациентите с БК и ЯК въз основа на експресията на miRNAs.
3. Установени са специфични miRNAs за ремисия и активност, локализация, форма на протичане и проведено лечение.
4. Извършен е задълбочен анализ на експресията на miRNAs според нивата на Витамин D.

### **Приноси с оригинален характер**

1. За пръв път в България е изследван панел от miRNAs за оценка на IBD при възрастни пациенти.
2. За пръв път в България при възрастни пациенти с IBD е изследвана ролята на miRNAs, които са доказали своята ефективност за характеризирани пациенти с онкологични заболявания (miR-16, miR-28, miR-96, miR-155, miR-199, miR-363 и miR-451).
3. За пръв път в България е описана експресията на изследваните miRNAs спрямо прилаганата терапия при пациенти с IBD.
4. За пръв път в България е доказана зависимост между експресията на определени miRNAs и дефицита на Витамин D при пациенти с IBD.

## IX. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Атанасова А. Биомаркери при хронично възпалително заболяване на червата - настояще и бъдеще. Варненски медицински форум, Том 9, № 2 (2020), 7-19
2. Атанасова А. Влиянието на miRNAs върху регулацията на имунната система при възпалителни заболявания на червата. Варненски медицински форум, Том 9, № 2 (2020), 20-32
3. Atanasova A. Different faces of inflammation, considered upon the expression of microRNA-155. Book of proceedings. Symposium "Alumni Club and Friends" – MU-Varna, 06-08.03.2020, 62-73
4. Atanassova A, Chervenkov T. Role of the Serum Vitamin D Levels and Some Circulating miRNAs in Patients with Ulcerative Colitis. BEST: IJHAMS Journal, 2020/12, ISSN(E): 2454 4728, 1-10
5. Атанасова А. Изследване на връзката между индекса на телесна маса и някои циркулиращи микроРНК при пациенти с болест на Crohn. Варненски медицински форум, т. 10, 2021, online first, pp.6
6. Атанасова А. Експресията на microRNA-199 - нов потенциален биомаркер за имуномедицирано възпаление. Варненски медицински форум, т. 10, 2021, online first, pp.6
7. Атанасова А., Тенева М. Изразът на miR-191 - съвременен биомаркер за разграничаване на улцерозен колит от болестта на Crohn. Известия на Съюза на учените - Варна. Серия медицина и екология. 2021, Online First, pp.5
8. Атанасова А., Тенева М. На границата на възпалението и фиброзата - серумна експресия на miR 29 при пациенти с възпалително чревно заболяване. Известия на Съюза на учените - Варна. Серия медицина и екология. 2021, Online First, pp.6
9. Атанасова А. Експресия на микрорибонуклеинова киселина 1228 сред пациенти с хронични възпалителни болести на червата. Варненски медицински форум, 2021, online first, pp.6
10. Атанасова А. Серумна експресия на микрорибонуклеинови киселини при пациенти с болест на Крон – специфичен РНК профил. Български медицински журнал, 2021, бр. 1, 33-38