



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-3-0-3

УДК 577.218:616.1

Циркулирующие микроРНК тромбоцитарного происхождения как потенциальные биомаркеры STEMI у пациентов с гипертонической болезнью

А.В. Желанкин¹ , Д.А. Стоногина² , А.С. Аксельрод³ 

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства»,

ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435, Российская Федерация

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы»,

ул. Коломенский проезд, д. 4, г. Москва, 115446, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»,

ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, 119991, г. Москва, Российская Федерация

Автор для переписки: А.В. Желанкин (zhelankin.andrey@gmail.com)

Резюме

Актуальность: Циркулирующие микроРНК (ц-микроРНК) тромбоцитарного происхождения в последнее десятилетие активно изучаются как перспективные биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), так как активация тромбоцитов занимает ключевое место в патогенезе ССЗ. **Цель исследования:** Сравнить профили ц-микроРНК тромбоцитарного происхождения у пациентов с неосложненной гипертонической болезнью (ГБ) и у пациентов с ГБ и острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST (STEMI). **Материалы и методы:** В исследование было включено 20 пациентов с неосложненной ГБ и 15 пациентов с наличием ГБ и STEMI. Не менее 90% участников в каждой группе принимали антиагрегантную терапию. У каждого пациента был взят образец крови в пробирку с антикоагулянтом СТАД и получена плазма крови с помощью двухэтапного центрифугирования. Степень гемолиза образцов плазмы была определена спектрофотометрически. Из образцов плазмы была выделена микроРНК, которая использовалась для обратной транскрипции и определения относительного уровня восьми основных ц-микроРНК тромбоцитарного происхождения (miR-223-3p, miR-126-3p, miR-21-5p, miR-24-3p, miR-320a-3p, miR-191-5p, miR-150-5p и miR-23a-3p) с помощью количественной ПЦР по технологии TaqMan Advanced (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Были рассчитаны нормированные относительные уровни экспрессии для каждой ц-микроРНК. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ (тест Манна-Уитни). **Результаты:** Группы пациентов не различались по возрасту, ИМТ, количеству тромбоцитов, липидному профилю и степени гемолиза образцов плазмы. Не было обнаружено различий между соотношением микроРНК тромбоцитарного и эритроцитарного происхождения между группами пациентов. Не было обнаружено статистически значимых различий в относительных

уровнях ц-микроРНК между группами исследования. Анализ главных компонент и тепловой карты экспрессии микроРНК в образцах показал деление образцов на группы в большей степени по степени гемолиза, чем по наличию/отсутствию STEMI. **Заключение:** В исследованной выборке пациентов с ГБ влияние гемолиза образцов плазмы на профили ц-микроРНК тромбоцитарного происхождения было более выражено, чем наличие STEMI.

Ключевые слова: микроРНК; инфаркт миокарда; STEMI; биомаркеры; гипертоническая болезнь

Для цитирования: Желанкин АВ, Стоногина ДА, Аксельрод АС. Циркулирующие микроРНК тромбоцитарного происхождения как потенциальные биомаркеры STEMI у пациентов с гипертонической болезнью. Научные результаты биомедицинских исследований. 2024;10(3):351-373. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-3-0-3

Circulating platelet-derived microRNAs as potential biomarkers of STEMI in patients with hypertension

Andrey V. Zhelankin¹ , Daria A. Stonogina² , Anna S. Akselrod³ 

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency,

1a Malaya Pirogovskaya St., Moscow, 119435, Russia

² Yudin City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department,

4 Kolomensky Drю, Moscow, 115446, Russia

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,

8-2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia

Corresponding author: Andrey V. Zhelankin (zhelankin.andrey@gmail.com)

Abstract

Background: Circulating extracellular platelet-derived microRNAs have been actively studied over the last decade as promising biomarkers of cardiovascular disease (CVD), since platelet activation plays a key role in the pathogenesis of CVD. **The aim of the study:** To compare platelet-derived microRNA profiles in patients with uncomplicated hypertension (HT) and in patients with HT and acute myocardial infarction with ST-segment elevation (STEMI). **Materials and methods:** The study included 20 patients with uncomplicated HT and 15 patients with HT and STEMI. At least 90% of the participants in each group received antiplatelet therapy. A blood sample was collected from each patient in a CTAD anticoagulant tube and blood plasma was obtained by two-step centrifugation. The degree of hemolysis of the plasma samples was determined spectrophotometrically. MicroRNAs were isolated from plasma samples and used for reverse transcription and quantification of relative levels of eight main circulating extracellular platelet-derived microRNAs (miR-223-3p, miR-126-3p, miR-21-5p, miR-24-3p, miR-320a-3p, miR-191-5p, miR-150-5p and miR-23a-3p) by quantitative PCR using the TaqMan Advanced technology (Thermo Fisher Scientific, USA). Normalized relative expression levels for each miRNA were calculated. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (Mann-Whitney test). **Results:** Patient groups did not differ in age, BMI, platelet count, lipid profile and degree of hemolysis of plasma samples. No differences were found between the ratio of platelet-derived and erythrocyte-derived microRNA between patient groups. No statistically significant differences were found in the relative levels of circulating microRNA between the study

groups. Principal component analysis and heatmap analysis of microRNA expression in the samples showed a division of the samples into groups based more on the degree of hemolysis than on the presence/absence of STEMI. **Conclusion:** In the studied sample of hypertensive patients, the effect of hemolysis of plasma samples on circulating platelet-derived microRNA profiles was more significant than the presence of STEMI.

Keywords: microRNAs; myocardial infarction; STEMI; biomarkers; hypertension

For citation: Zhelankin AV, Stonogina DA, Akselrod AS. Circulating platelet-derived microRNAs as potential biomarkers of STEMI in patients with hypertension. Research Results in Biomedicine. 2024;10(3):351-373. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-3-0-3

Введение. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из наиболее распространенных причин как общей, так и сердечно-сосудистой смертности в мире [1, 2, 3]. Формой ИБС, требующей неотложной госпитализации, является острый коронарный синдром (ОКС). Как нестабильная стенокардия, так и острый инфаркт миокарда (ОИМ) с подъемом сегмента ST (STEMI) и ОИМ без подъема сегмента ST (NSTEMI) могут привести к фатальному осложнению ИБС – внезапной сердечной смерти (ВСС).

Гипертоническая болезнь (ГБ) является общепризнанным и широко распространенным фактором риска ОКС и сопутствующих фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых осложнений [4, 5].

Таким образом, профилактика и оценка риска ОКС являются важнейшими задачами в области общественного здравоохранения. Наиболее распространенной причиной ишемии при ОКС является эрозия нестабильной атеросклеротической бляшки и формирование на ее поверхности окклюзирующего тромба [6]. Ключевую роль в патогенезе ОКС играют тромбоциты, что служит фундаментальной основой для широкого внедрения в настоящее время двойной антитромбоцитарной (антиагрегантной) терапии аспирином и ингибиторами рецепторов P2Y₁₂ [7]. Повышенная активация тромбоцитов является ранним маркером ОКС [8, 9]. Уровень ряда белковых биомаркеров активации тромбоцитов, таких как P-селектин, растворимый гликопротеин V (sGPV), бета-тромбоглобулин (β-TG), липопротеин-ассоциированная фосфолипаза A2 (Lp-PLA2), секреторная

фосфолипаза A2 (sPLA2), растворимый лиганд CD40 (sCD40L), а также средний объем тромбоцитов и наличие крупных тромбоцитов, изменены у пациентов с наличием ИБС по сравнению с контрольными группами [10, 11, 12]. Метаболические пути, регулирующие активность тромбоцитов и приводящие к коронарной окклюзии, занимают центральное место в патогенезе ОКС. Поиск новых биомаркеров (в том числе небелковых), отражающих состояние тромбоцитов и их активацию, является приоритетной задачей в исследованиях для диагностики и прогноза ОКС.

Некодирующие РНК представляют большой интерес в качестве небелковых биомаркеров ССЗ, так как они участвуют в регуляции процессов патогенеза ССЗ и могут быть обнаружены в биологических жидкостях [13]. К некодирующим РНК относятся короткие некодирующие РНК (в частности, микроРНК), длинные некодирующие РНК и кольцевые РНК. За последнее десятилетие внеклеточные циркулирующие микроРНК (ц-микроРНК) были описаны как потенциальные биомаркеры различных патологических состояний, что выделило изучение ц-микроРНК для диагностических и прогностических целей как отдельную масштабную область постгеномных исследований для биомедицины [14]. Стабильность микроРНК в плазме, их связь с патогенезом сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и специфическое изменение их профилей при различных сердечно-сосудистых патологиях позволяют рассматривать ц-микроРНК в качестве перспективных диагностических биомаркеров в кардиологии.

Ассоциация ц-микроРНК с наличием таких ССЗ, как фибрилляция предсердий, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда подтверждается большим количеством исследований, опубликованных за последнее десятилетие [15, 16, 17]. Некоторые микроРНК участвуют в регуляции патологических процессов в атерогенезе [18]. Как и в случае с белковыми биомаркерами ОКС, изменения в циркулирующих уровнях микроРНК могут происходить как в результате различных процессов, связанных с атерогенезом, так и в результате повреждения миокарда [18, 19].

В последнее время особый фокус исследования ц-микроРНК при сердечно-сосудистых заболеваниях сместился на изучение микроРНК как маркеров активации тромбоцитов. Во внеклеточной фракции микровезикул, которые являются одними из основных носителей ц-микроРНК, большую часть представляют микровезикулы тромбоцитарного происхождения [20, 21]. Выделяют отдельную группу ц-микроРНК, ассоциированных с тромбоцитами и их функцией и участвующих в регуляции сосудистого гомеостаза и воспаления. Наиболее часто в этом отношении упоминаются около десятка микроРНК, включая miR-223-3p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-21-5p, miR-24-3p, miR-23a-3p, miR-191-5p и miR-320a-3p, которые также входят в топ 10 микроРНК, обнаруживаемых в тромбоцитах [22-26]. Наличие этих микроРНК в плазме в первую очередь обусловлено их тромбоцитарным происхождением, в частности за счет секреции микроРНК-содержащих микровезикул при активации тромбоцитов [26, 27, 28]. Было показано, что относительные уровни таких микроРНК в плазме изменяются при активации тромбоцитов, а также при приеме лекарственных препаратов, влияющих на функцию тромбоцитов, в частности антикоагулянтов и антиагрегантов [29, 30, 31]. Наиболее распространенной микроРНК в тромбоцитах явля-

ется miR-223-3p. Она регулирует экспрессию рецептора P2Y12, который имеет решающее значение для агрегации тромбоцитов, секреции гранул, а также роста и стабильности тромба [23, 25, 32]. Для miR-126 также была подтверждена роль в регуляции функций тромбоцитов за счет влияния на экспрессию P2Y12, а также регуляции выработки тромбина [33, 34]. Предположение о том, что микроРНК, ассоциированные с тромбоцитами, могут также быть биомаркерами различных ССЗ, подтверждается рядом исследований. В частности, было показано, что уровни miR-126 и miR-223 коррелируют с функциональными тестами тромбоцитов у пациентов с ОКС и могут быть использованы для оценки реакции на антитромбоцитарную терапию [35, 36, 37]. Было обнаружено, что уровни этих ц-микроРНК в плазме обладают высокой предсказывающей ценностью для сердечно-сосудистых событий у пациентов с ССЗ [38, 39]. Было показано, что уровни miR-223, miR-126 и miR-150 изменены в плазме у пациентов с ОИМ по сравнению с контрольной группой [40]. Кроме того, внутриклеточные уровни экспрессии miR-223 и miR-126 были снижены более чем в 2 раза в тромбоцитах с высокой активацией по сравнению со слабоактивированными тромбоцитами у пациентов с ОКС на фоне приема антиагрегантной терапии, что позволяет предполагать возможность их специфической секреции из тромбоцитов в плазму [41].

Так как на изучение ц-микроРНК могут влиять различные пре-аналитические факторы [23, 42], некоторые предыдущие исследования были сфокусированы на подборе условий для минимизации этого влияния при изучении микроРНК, ассоциированных с тромбоцитами. Было показано, что тип антикоагулянта в пробирке для забора крови при получении плазмы может повлиять на активацию тромбоцитов *in vitro* и привести к смещению профилей ц-микроРНК тромбоцитарного происхождения [22, 43]. Исследования показали, что

при изучении ц-микроРНК предпочтительнее использовать антикоагулянты на основе цитрата. Также крайне важно оценивать степень гемолиза в образцах плазмы, так как избыточное разрушение эритроцитов может привести к смещению профилей ц-микроРНК, увеличивая долю микроРНК эритроцитарного происхождения [43].

В данном исследовании мы изучали, каким образом наличие STEMI – одного из типов ОКС – у пациентов с наличием гипертонии влияет на профили ц-микроРНК, ассоциированных с активацией тромбоцитов и имеющих потенциальное тромбоцитарное происхождение в плазме. Проводя совокупный анализ большинства микроРНК тромбоцитарного происхождения, мы учитывали опыт предыдущих исследований по влиянию пре-аналитических факторов на уровни ц-микроРНК в плазме.

Материалы и методы исследования. Набор участников исследования был проведен в соответствии с этическими принципами Хельсинской декларации. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом Сеченовского Университета 07.07.2022, протокол № 14-22. От каждого участника исследования было получено письменное добровольное информированное согласие на участие. Диагноз пациентов ставился врачами-кардиологами Университетской клинической больницы (УКБ) №1 Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Сеченовского Университета и ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы».

В исследование были включены мужчины и женщины в возрасте от 40 до 90 лет, из которых сформированы две группы: пациенты с неосложненной ГБ (эссенциальная форма артериальной гипертонии (АГ)), у которых по результатам амбулаторного обследования (нагрузочное тестирование) не было показаний для проведения коронароангиографии (КАГ) и пациенты с вери-

фицированной ранее ГБ, экстренно госпитализированные в отделение интенсивной терапии и реанимации стационара в связи с развитием ОИМ с подъемом сегмента ST (STEMI).

Проводился стандартный осмотр пациента с регистрацией артериального давления (АД) и суточное мониторирование АД, по результатам которого, в соответствии с клиническими рекомендациями Российского кардиологического общества «Артериальная гипертония у взрослых» (2020), верифицировалась артериальная гипертония (АГ). Определялись среднесуточные значения систолического (САД) и диастолического (ДАД) давления, среднесуточная ЧСС, а также среднедневные и средне-ночные значения АД и степень снижения АД в ночные часы. Далее пациентам с АГ назначалась гипотензивная терапия, не препятствующая проведению нагрузочного теста (бета-адреноблокаторы и недигидропиридиновые антагонисты кальция не использовались). После суточного мониторирования АД (СМАД) проводилась трансторакальная эхокардиография (УЗИ сердца), определялись размеры камер сердца, состояние клапанного аппарата, степень регургитации на всех клапанных структурах, наличие диастолической дисфункции левого желудочка, фракция выброса левого желудочка. При этом исключалось наличие нарушений локальной и глобальной сократимости. Пациенты с АГ и гипертрофией миокарда левого желудочка (ГЛЖ) расценивались, как пациенты со 2 стадией ГБ. После проведения СМАД и УЗИ сердца проводился нагрузочный стресс-тест: в группу пациентов с неосложненной ГБ были отобраны больные, у которых результат этого теста был отрицательным (без признаков стресс-индуцированной ишемии миокарда) и, таким образом, вероятность значимого коронарного атеросклероза была низкой, следовательно, не было показаний к проведению коронароангиографии. У этих пациентов в анамнезе не

было инсультов и транзиторных ишемических атак. Ни один из пациентов этой группы не предъявлял жалобы на дискомфорт или давящие боли в области сердца, связанные с нагрузкой. Однако с учётом того, что ГБ является фактором риска ИБС, в том числе немой ишемии миокарда, всем пациентам с ГБ проводился нагрузочный тест.

Критериями исключения из исследования были: любая тяжелая сопутствующая патологии (острая и декомпенсированная хроническая легочная, почечная и печеночная недостаточность; декомпенсированный сахарный диабет); впервые выявленное онкологическое заболевание или рецидив имеющейся ранее злокачественной опухоли; алкогольная и наркотическая зависимость; неспособность или нежелание дать письменное согласие на участие в исследовании.

У каждого участника исследования были проанализированы: пол, возраст, индекс массы тела (ИМТ), степень и стадия ГБ, наличие ОИМ, уровень тропонина при подтверждении ОИМ, показатели липидного спектра крови (общий холестерин; холестерин липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и низкой плотности (ЛПНП)), варианты лекарственной терапии: прием антиагрегантов (клопидогрела и/или аспирина), ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), статинов, β -адреноблокаторов, блокаторов кальциевых каналов, наличие нарушения толерантности к глюкозе или сахарного диабета. Все пациенты со STEMI догоспитально получали клопидогрел и/или аспирин. В соответствии с консенсусом, принятым для универсальной диагностики ОИМ [44], повышение уровня кардиального тропонина выше 99 перцентиля от верхней границы нормы считалось признаком повреждения миокарда. Так как важным параметром, влияющим на активацию тромбоцитов *in vivo* и на профили микроРНК в плазме, является прием антиагрегантов [29, 30, 31], набор групп был организован таким образом, чтобы более 80% пациентов из каждой

группы систематически принимали антиагрегантную терапию (ацетилсалициловая кислота (АСК) и/или клопидогрел) во время участия в исследовании. Такая особенность набора групп была введена для минимализации возможного сдвига профилей микроРНК из-за неоднородности групп по фактору наличия антиагрегантной терапии, так как данный вид терапии присутствует у подавляющего большинства пациентов с ИБС и ОИМ.

Для забора крови использовались вакуумные пробирки VACUETTE (Greiner Bio-One, Австрия) с СТАD-системой (лимонная кислота, теофиллин, аденозин и дипиридамол) с двойной стенкой 3,5 мл, крышка голубая, 13x75 мм. Ранее было показано, что данный тип пробирок вносит наименьший сдвиг между ц-микроРНК тромбоцитарного и эритроцитарного происхождения и приводит к наименьшей активации тромбоцитов *in vitro* [22, 43]. У каждого участника исследования одновременно натощак в утреннее время (с 08:00 до 12:00) был произведен забор венозной крови. Забор крови производился в строгом соответствии с протоколом. У пациентов с наличием STEMI забор крови производился в течение 10 минут после госпитализации до назначения антиагрегантов-ингибиторов P2Y₁₂, рекомендованных при лечении STEMI (тикагрелор или прасугрел) в стационаре, и до проведения коронароангиографии с внутривенным введением гепарина. Сразу после забора крови пробирка переворачивалась как минимум 10 раз и хранилась при комнатной температуре до первого центрифугирования. Пробирки были подвергнуты центрифугированию на скорости 2500 г в течение 10 мин при комнатной температуре в портативной настольной центрифуге Apexlab 80-2S. После центрифугирования, верхняя фаза плазмы над лейкоцитарной пленкой для каждого образца была перенесена в стерильную коническую пробирку объемом 15 мл. Пробирки были подвергнуты вторичному центрифугированию на скорости 2500 г в течение 10 мин при

комнатной температуре в центрифуге Apexlab 80-2S. После центрифугирования, две аликвоты надосадочной жидкости в количестве 600 мкл от каждого образца были перенесены в две микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл. Эти пробирки были подписаны и помещены в низкотемпературный холодильник, и хранились при температуре -80°C до выделения микроРНК. Отдельная аликвота плазмы от каждого образца объемом 20 мкл была отобрана в микропробирку объемом 200 мкл и использовалась для спектрофотометрической оценки степени гемолиза эритроцитов с использованием системы NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). 2 мкл плазмы помещались на кювету спектрофотометра, и проводилось измерение оптической плотности на длинах волн 385 нм (референсное значение) и 414 нм (пик оксигемоглобина). На основании этих значений для каждого образца был рассчитан коэффициент гемолиза (Hemolysis score, HS) в соответствии с методикой Appierto и соавторов [45]. Коэффициенты гемолиза приведены в таблице 1 с метаданными участников исследования. Критерием исключения для образцов плазмы являлось наличие визуально детектируемого гемолиза в образце плазмы (красный или розоватый оттенок образца) и/или значение HS, превышающее 0,2.

Для выделения микроРНК использовался набор NextPrep Magnazol cfRNA Isolation Kit (Perkin Elmer, США). Фракция ц-микроРНК была выделена из 600 мкл плазмы в соответствии с рекомендациями производителя набора. Финальный объем образца микроРНК составлял 15 мкл. Образцы микроРНК были помещены в низкотемпературный холодильник и хранились при температуре -80°C до этапа анализа экспрессии микроРНК с помощью количественной ПЦР.

Образцы микроРНК в количестве 2 мкл были использованы для синтеза кДНК с помощью набора TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher

Scientific Inc., США). Были проанализированы 10 микроРНК, для которых ранее были показаны наиболее вероятные источники происхождения в плазме: 8 микроРНК тромбоцитарного происхождения (miR-223-3p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-21-5p, miR-24-3p, miR-23a-3p, miR-191-5p и miR-320a-3p) и 2 микроРНК эритроцитарного происхождения (miR-451a и miR-92a-3p), а также референсная микроРНК miR-16-5p.

С помощью наборов TaqMan Fast Advanced Master Mix и TaqMan Advanced miRNA Assays A25576 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) была проведена количественная ПЦР с использованием прибора QuantStudio 5 в 96-луночных ПЦР-планшетах MicroAmp с оптической пленкой, в режиме "Fast" со следующей программой: активация фермента -20 с при 95°C ; 45 циклов, денатурация -1 с при 95°C , отжиг/элонгация -20 с при 60°C . Данные ПЦР получали с помощью программы QuantStudio Design and Analysis Software v1.4.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Значения пороговых циклов (C_q) рассчитывали с использованием автоматического значения "Baseline" и экспериментально установленного значения "Threshold", равного 0,1 для всех анализируемых мишеней микроРНК. Измерения C_q проводились в одной технической копии для каждой мишени микроРНК в отдельном образце. При отсутствии сигнала и кривой амплификации, значение C_q принималось равным 45. Расчет относительных уровней экспрессии ц-микроРНК производился на основе их значений C_q и значения C_q референсной микроРНК miR-16-5p по формуле: $\text{exp(miRNA)} = 2^{(C_q(\text{микроРНК}) - C_q(\text{miR-16-5p}))}$, где exp(miRNA) – относительный уровень экспрессии микроРНК, $C_q(\text{miRNA})$ – пороговый цикл амплификации данной микроРНК, $C_q(\text{miR-16-5p})$ – пороговый цикл амплификации референсной микроРНК. В качестве референсной микроРНК была выбрана miR-16-5p, так как ее уровень относительно стабилен в плазме, и

она широко используется в качестве референсной микроРНК в исследованиях ассоциации ц-микроРНК с патологиями [46, 47]. Однако, использование данной микроРНК в качестве референсной имеет свои ограничения. Из литературных данных известно, что уровень miR-16-5p может повышаться вследствие гемолиза образцов, так как miR-16-5p входит в топ 10 микроРНК эритроцитов [48, 49]. Использование данной микроРНК в качестве референсной является ограничением данного исследования, однако оно частично преодолевается тем фактом, что мы измеряли степень гемолиза образцов с помощью спектрофотометрии, а также оценивали влияние гемолиза на соотношение микроРНК эритроцитарного и тромбоцитарного происхождения во всех исследованных образцах. Влияние гемолиза эритроцитов на ц-микроРНК оценивалось на основе выявленного методом ПЦР соотношения miR-451a и miR-23a-3p как разницы между значениями Cq по формуле: $miR\ Ratio = Cq(hsa-miR-23a-3p) - Cq(hsa-miR-451a)$, как было описано ранее Blondal и соавторами [50]. Соотношение между микроРНК эритроцитарного и тромбоцитарного происхождения (RBC-Platelet miRNA Ratio), рассчитывалось как разница между средними значениями Cq всех анализируемых микроРНК, потенциально ассоциированных с эритроцитами (miR-451a, miR-92a-3p и miR-16-5p), и всех микроРНК, потенциально ассоциированных с тромбоцитами (miR-223-3p, miR-126-3p, miR-150-5p, miR-21-5p, miR-24-3p, miR-23a-3p, miR-191-5p и miR-320a-3p).

Статистический анализ и визуализация данных проводились с помощью программы IBM SPSS Statistics (версия 26) и программной среды R с использованием пакетов PCATools, pheatmap и ggplot2. Для проверки нормального распределения сравниваемых величин использовался тест Колмогорова-Смирнова (при $p > 0,05$ гипотеза об отсутствии нормального распределения отвергалась). Для величин с нормальным

распределением для получения статистической значимости различий между группами исследования использовался t-тест (t-критерий Стьюдента), для величин с отсутствием нормального распределения (относительные уровни микроРНК) – непараметрический тест Манна-Уитни. Коэффициенты статистической значимости различий для порядковых качественных величин были получены с помощью Хи-квадрат. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ для каждого использованного статистического теста. Для всех образцов в данном исследовании использовался один и тот же лабораторный процесс и протокол анализа данных.

Результаты и их обсуждение. Были сформированы следующие группы исследования:

1. Пациенты с наличием неосложненной ГБ без ИБС ($n = 20$, код группы: НТ);
2. Пациенты с наличием ГБ и STEMI ($n = 15$, код группы: МІ).

Общие и клинические характеристики групп пациентов приведены в таблице 1. Пациенты с наличием STEMI имели более высокий средний возраст ($p < 0,05$, t-тест), что согласуется с эпидемиологическими данными по представленности ОИМ в различных возрастных группах [3]. Между группами исследования не было выявлено статистически значимых различий в ИМТ, количестве тромбоцитов, параметрами липидного профиля и степени гемолиза образцов плазмы ($p > 0,05$, t-тест). Распределение вышеуказанных характеристик в группах исследования приведено на рисунке 1. В каждой группе не менее половины пациентов имели гиперхолестеринемию (повышенный уровень холестерина более чем 5 ммоль/л). Подавляющее большинство пациентов с неосложненной ГБ принимали аспирин, статины и ИАПФ. В отличие от пациентов с неосложненной ГБ, большинство пациентов с наличием STEMI помимо аспирина принимали клопидогрел как компонент двойной антиагрегантной терапии.

Таблица 1

Общие и клинические характеристики групп пациентов

Table 1

Table 1. General and clinical characteristics of the study groups

Группа исследования	HS	MI	Статистическая значимость различий	
			p	Тип теста
Количество участников	20	15	-	-
Возраст, лет ± SD	59,9 ± 10,7	68,3 ± 12,9	0,04	t-тест
Пол (м/ж)	10/10	12/3	0,07	Хи-квадрат
ИМТ, кг/м ² ± SD	29,4 ± 5,5	26,4 ± 5,9	0,09	t-тест
Тромбоциты, *10 ⁹ клеток/л ± SD	243 ± 53	242 ± 46	0,97	t-тест
Коэффициент гемолиза HS	0,09 ± 0,04	0,08 ± 0,05	0,68	t-тест
Липидный профиль плазмы				
Общий холестерин, ммоль/л ± SD	5,43 ± 1,36	5,41 ± 1,7	0,97	t-тест
ЛПНП, ммоль/л ± SD	3,28 ± 1,02	3,24 ± 1,08	0,90	t-тест
ЛПВП, ммоль/л ± SD	1,38 ± 0,39	1,34 ± 0,42	0,76	t-тест
Наличие гиперхолестеринемии	10	10	0,32	Хи-квадрат
Прием лекарственных препаратов				
Клопидогрел	2	11	<0,01	Хи-квадрат
АСК (аспирин)	15	14	0,15	Хи-квадрат
ИАПФ	19	4	<0,01	Хи-квадрат
Статины	16	8	0,09	Хи-квадрат
β-адреноблокаторы	9	3	0,12	Хи-квадрат
Блокаторы кальциевых каналов	4	2	0,60	Хи-квадрат
Наличие СД или нарушение толерантности к глюкозе	1	1	0,83	Хи-квадрат

Примечание: SD, стандартное отклонение; ИМТ, индекс массы тела; ЛПНП, холестерин липопротеидов низкой плотности; ЛПВП, холестерин липопротеидов высокой плотности; АСК, ацетилсалициловая кислота; ИАПФ, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента; СД, сахарный диабет. Статистическая значимость различий приведена для сравнения с использованием t-теста для непрерывных величин с нормальным распределением и для сравнения с использованием Хи-квадрат для качественных характеристик.

Note: SD, standard deviation; BMI, body mass index; LDL, low-density lipoprotein cholesterol; HDL, high-density lipoprotein cholesterol; ASA, acetylsalicylic acid; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitors; DM, diabetes mellitus. Statistical significance of differences is given for comparison using a t-test for continuous variables with a normal distribution and for comparison using chi-squared for qualitative characteristics.

Все микроРНК уверенно детектировались во всех образцах с помощью ПЦР со средними значениями Cq от 15,1 ± 3,3 для микроРНК с наибольшей экспрессией miR-451a до 24,9 ± 3,0 для микроРНК с наиболее низкой экспрессией miR-23a-3p.

Был проведен анализ главных компонент (РСА) на основании логарифмов нормализованных уровней экспрессии микроРНК. Первая главная компонента (PC1) объясняла 71,4% вариативности уровней микроРНК в выборке (Рис. 2, А). Визуализация главных компонент PC1 и PC2 (Рис. 2, Б)

не показала разделения на кластеры в соответствии с группами исследования. Был проанализирован вклад таких характеристик, как возраст, HS, группа исследования и батч-эффект (номер запуска ПЦР-прибора, в течение которого была одновременно проанализирована каждая группа образцов) в формирование главных компонент в РСА. Было выявлено, что наибольший вклад в вариативность профилей микроРНК вносит степень гемолиза (HS) (Рис. 2, В).

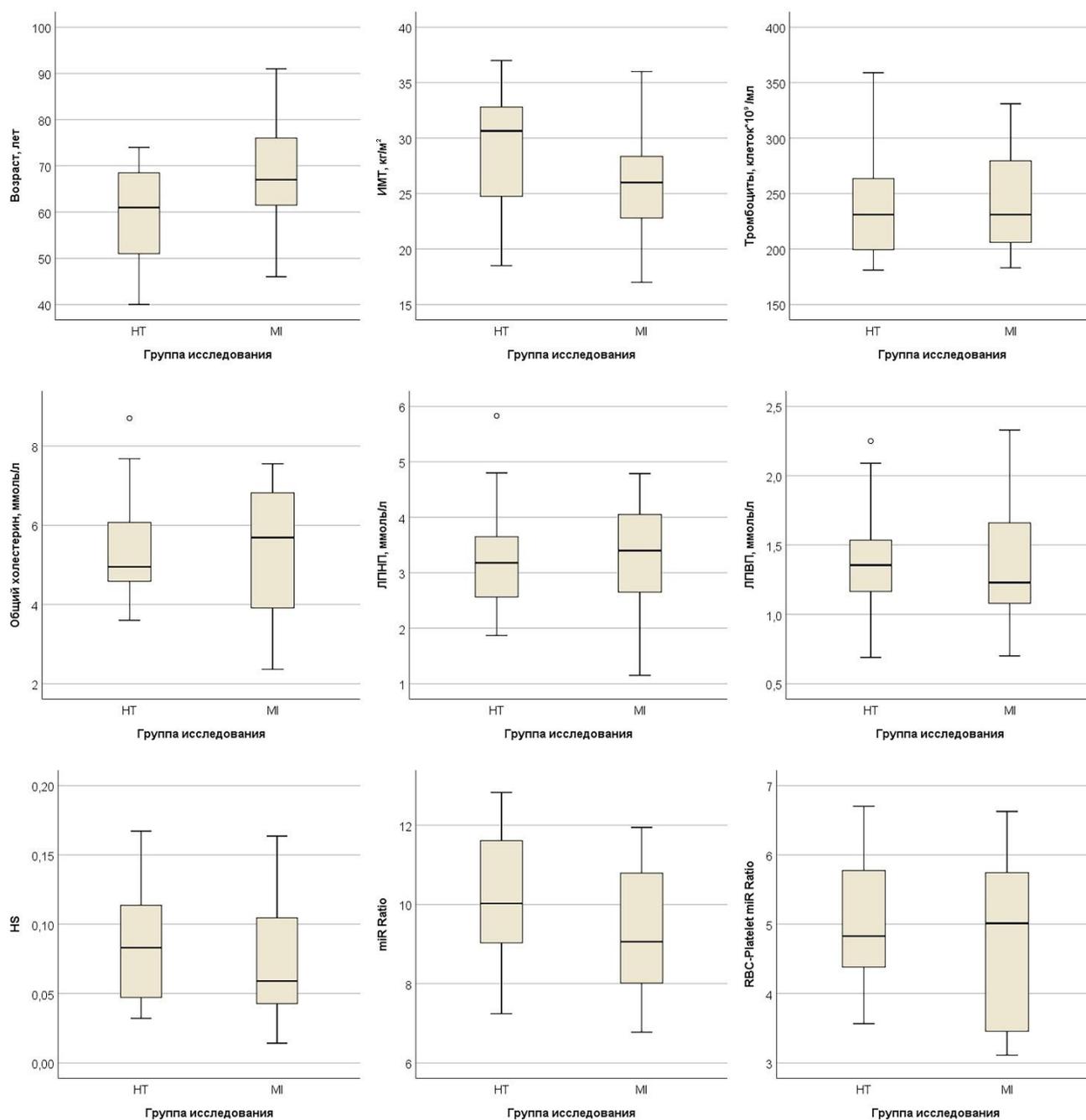


Рис. 1. Распределение характеристик пациентов в группах исследования. Столбцы распределения («ящики» и «усы») представляют собой медиану и границы квартилей. Точки представляют выбивающиеся из распределения образцы. НТ – пациенты с гипертонической болезнью без ИБС (n = 20), МИ – пациенты с гипертонической болезнью с наличием STEMI (n = 15). ИМТ, индекс массы тела; ЛПНП, холестерин липопротеидов низкой плотности; ЛПВП, холестерин липопротеидов высокой плотности; HS, коэффициент гемолиза.

Fig. 1. The distribution of patient characteristics across the study groups. The columns of the distribution ("boxes" and "whiskers") represent the median and quartile boundaries. The dots represent the outliers. НТ - hypertensive patients without STEMI (n = 20), MI - hypertensive patients with the presence of STEMI (n = 15). BMI, body mass index; LDL, low-density lipoprotein cholesterol; HDL, high-density lipoprotein cholesterol; HS, hemolysis score.

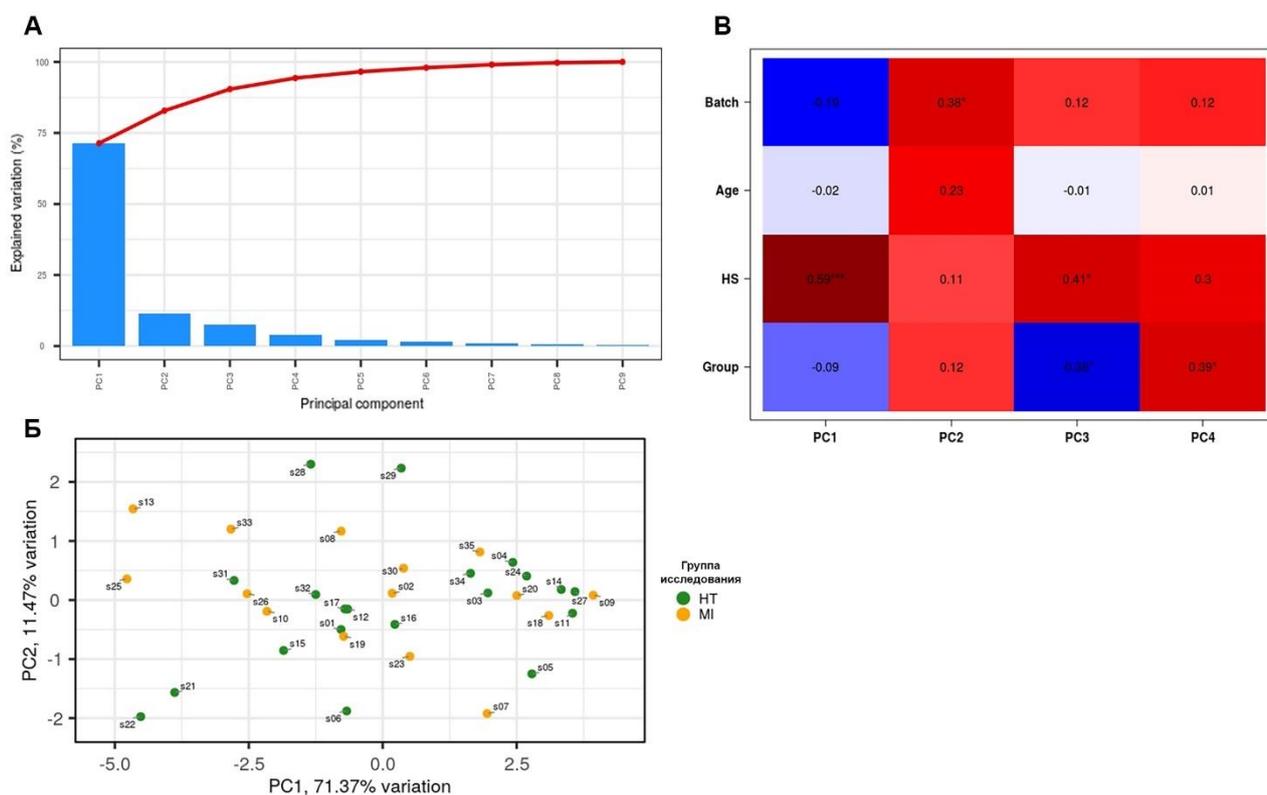


Рис. 2. Анализ главных компонент (PCA) на основании логарифмов нормализованных уровней экспрессии микроРНК. А. Вклад главных компонент в вариабельность экспрессии микроРНК. Explained variation, процент объясняемой вариабельности; Principal component, главная компонента. Б. График PC1-PC2. Точки и подписи точек соответствуют номерам образцов. В. Вклад характеристик групп исследования в формирование главных компонент в PCA. Age, возраст; HS, коэффициент гемолиза; Group, группа исследования; Batch, батч-эффект (номер запуска ПЦР-прибора, в течение которого была одновременно проанализирована каждая группа образцов).

Fig. 2. Principal component analysis (PCA) based on logarithms of normalized microRNA expression levels. A. Contribution of principal components to microRNA expression variability. Б. PC1-PC2 plot. Dots and dot captions correspond to sample IDs. В. Contribution of the characteristics of the study groups to the formation of the principal components in the PCA. HS, hemolysis score; Batch, batch effect for independent PCR runs.

Так как степень гемолиза в образцах плазмы могла влиять на профили микроРНК, мы проанализировали, как степень гемолиза, измеренная спектрофотометрически [45], соотносилась с характеристиками гемолиза, полученными с помощью анализа микроРНК и сдвигом между микроРНК эритроцитарного и тромбоцитарного происхождения (miR Ratio [50] и RBC-Platelet miR Ratio). Между группами иссле-

дования не было обнаружено статистически значимых различий для коэффициента гемолиза, измеренного спектрофотометрически (HS), а также для величин miR Ratio и RBC-Platelet miR Ratio ($p < 0,05$, тест Манна-Уитни, распределение величин в группах исследования показано на рисунке 1). Были обнаружены высокие корреляции между HS и данными величинами (коэффициент корреляции по Спирману 0,732 и

0,706, соответственно, $p < 0,01$). На рисунке 3 представлены графики зависимости между HS и miR Ratio (А), и между HS и RBC-Platelet miR Ratio (Б). Полученные данные согласуются с предыдущими наблюдениями о влиянии степени гемолиза

на профили ц-микроРНК, в частности с тем, что даже при незначительном повышении степени гемолиза увеличиваются уровни некоторых ц-микроРНК эритроцитарного происхождения [22, 49-52].

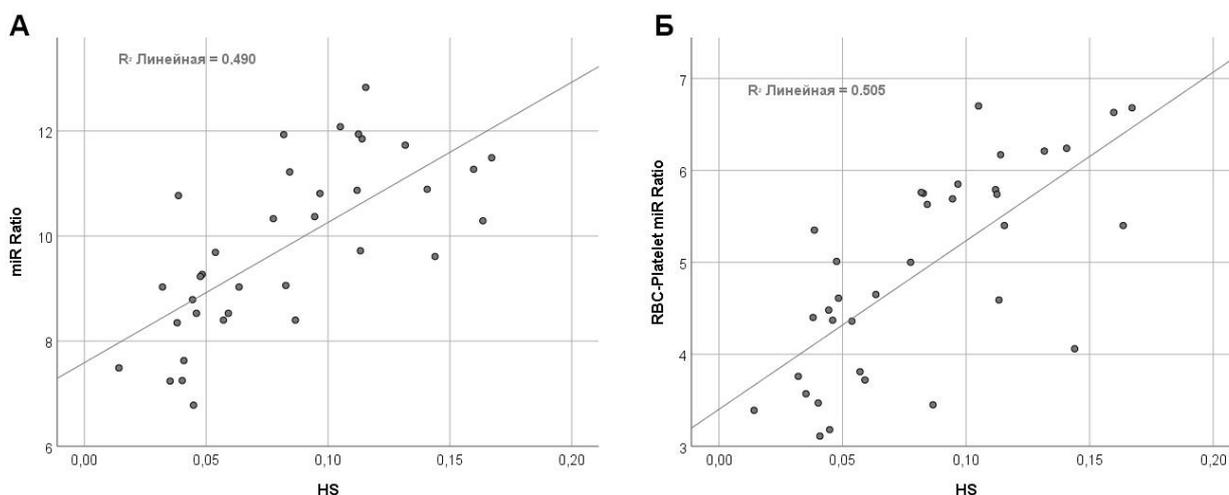


Рис. 3. А. График зависимости между HS и miR Ratio. Б. График зависимости между HS и RBC-Platelet miR Ratio. Точки соответствуют индивидуальным образцам. На графиках показана линия тренда и указаны значения линейной R^2 .

HS, коэффициент гемолиза.

Fig. 3. A. Dot plot of the relationship between HS and miR Ratio.

B. Dot plot of the relationship between HS and RBC-Platelet miR Ratio. The dots correspond to individual samples. The graphs show the trend line and indicate the values of linear R^2 .

HS, hemolysis score.

Мы не обнаружили статистически значимых различий в относительных уровнях проанализированных микроРНК между сравниваемыми группами пациентов (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$). Распределение относительных уровней всех проанализированных микроРНК в группах исследования показано на рисунке 4. Перцентили для относительных уровней экспрессии микроРНК и значения p -value для теста Манна-Уитни приведены в таблице 2. Из всех проанализированных микроРНК, для miR-223-3p обнаружился наиболее заметный тренд на повышение уровня экспрессии у пациентов со STEMI (повышение на 18%), однако без статистически значимых разли-

чий между группами сравнения. Полученные данные не подтверждают данные предыдущих исследований, показавших изменение уровней ряда ц-микроРНК тромбоцитарного происхождения при ОКС [38, 40, 53]. В данном исследовании не оценивалось влияние антиагрегантной терапии на профили ц-микроРНК, так как подавляющее большинство пациентов в каждой группе (более 80%) принимали антиагреганты. Возможно, прием антиагрегантной терапии некоторым образом «сгладил» профили микроРНК тромбоцитарного происхождения у пациентов с наличием и отсутствием STEMI за счет подавления активации тромбоцитов.

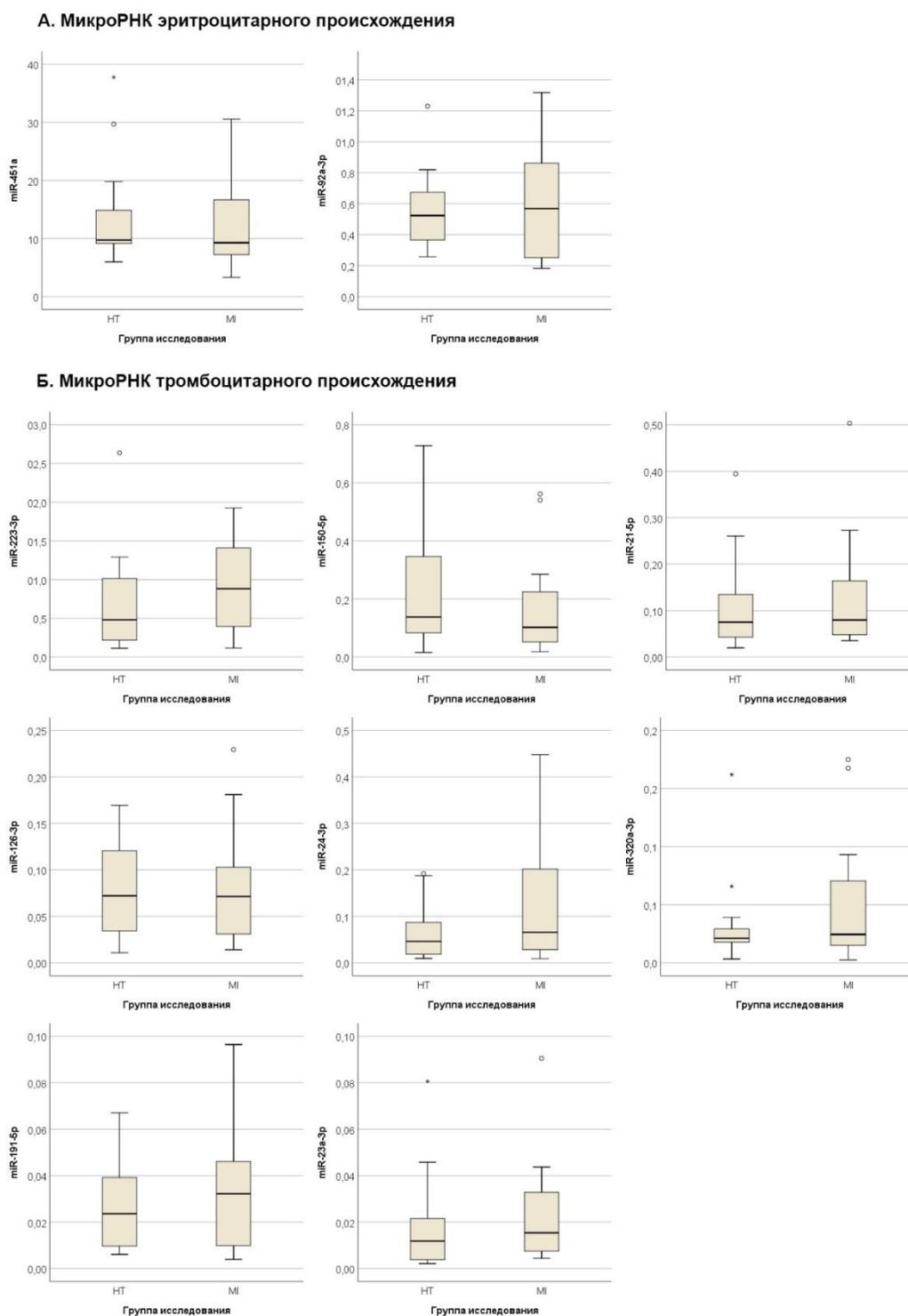


Рис. 4. Распределение относительных уровней экспрессии всех проанализированных микроРНК в группах исследования. А. МикроРНК эритроцитарного происхождения. Б. МикроРНК тромбоцитарного происхождения. Столбцы распределения («ящики» и «усы») представляют собой медиану и границы кватрилей. Точки или звездочки (*) обозначают выбивающиеся из распределения образцы. Ось Y на графиках представляет относительный уровень микроРНК в плазме.

Fig. 4. Distribution of relative expression levels of all analyzed microRNAs in the study groups. A. MicroRNAs of erythrocyte origin. B. MicroRNAs of platelet origin. The columns of the distribution ("boxes" and "whiskers") represent the median and quartile boundaries. Dots or asterisks (*) indicate outliers. The Y-axis represents the relative level of microRNA in plasma.

Таблица 2

Экспрессия ц-микроРНК в группах исследования

Table 2

Expression of c-microRNAs in the study groups

МикроРНК	Группа исследования						p-value
	НТ			МІ			
	Процентиль			Процентиль			
	25	50	75	25	50	75	
miR-451a	8,9945	9,7547	15,9170	6,8841	9,2655	17,5201	0,499
miR-92a-3p	0,3482	0,5240	0,6947	0,2470	0,5684	0,8888	0,610
miR-223-3p	0,2142	0,4799	1,0565	0,3820	0,8800	1,4099	0,191
miR-24-3p	0,0183	0,0461	0,0870	0,0277	0,0655	0,2310	0,364
miR-320a-3p	0,0174	0,0211	0,0292	0,0140	0,0244	0,0932	0,542
miR-191-5p	0,0088	0,0236	0,0401	0,0096	0,0322	0,0535	0,521
miR-126-3p	0,0308	0,0722	0,1247	0,0231	0,0714	0,1162	0,805
miR-150-5p	0,0750	0,1380	0,3522	0,0439	0,1020	0,2850	0,419
miR-21-5p	0,0414	0,0751	0,1438	0,0462	0,0796	0,1648	0,657
miR-23a-3p	0,0038	0,0119	0,0223	0,0061	0,0154	0,0348	0,169

Примечание: проценти́ли приведены для относительных уровней экспрессии микроРНК. Значения p-value приведены для парных сравнений с помощью теста Манна-Уитни.

Note: Percentiles are given for relative microRNA expression levels. The p-values are given for Mann-Whitney pairwise test.

Для того чтобы понять, каким образом образцы распределялись на группы в зависимости от профиля ц-микроРНК плазмы, была построена тепловая карта на основании относительных уровней проанализированных микроРНК в плазме участников исследования (Рис. 5). На тепловую карту были добавлены характеристики групп исследования: пол, возраст, батч-эффект и характеристики, отражающие степень гемолиза: HS, miR Ratio и RBC-Platelet miR Ratio. Кластеризация образцов на тепловой карте не соответствовала делению на группы исследования. Обособленная группа из 13 образцов, составляющая верхнюю часть тепловой карты, характеризовалась сниженными уровнями микроРНК тромбоцитарного происхождения. Данная группа не была однородной ни по полу, ни по возрасту, ни по влиянию батч-эффекта, однако образцы в этой группе имели повышенные значения коэффициента гемолиза и

соотношения между микроРНК эритроцитарного и тромбоцитарного происхождения (Рис. 5). Еще одна группа образцов, находящаяся в середине тепловой карты (образцы s21, s22, s13 и s25), имела повышенные уровни практически всех проанализированных микроРНК. Образцы в этой группе имели низкие значения коэффициента гемолиза и соотношения между микроРНК эритроцитарного и тромбоцитарного происхождения. Оставшаяся группа образцов ($n = 18$), занимающая нижнюю часть тепловой карты, была гетерогенной как по всем характеристикам метаданных, так и по параметрам, характеризующим гемолиз. Проанализировав распределение характеристик, связанных с гемолизом в этих трех подгруппах образцов, мы обнаружили статистически значимое повышение HS, miR Ratio и RBC-Platelet miR Ratio в первой подгруппе ($n = 13$) по сравнению с другими подгруппами (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$, Рис. 6).

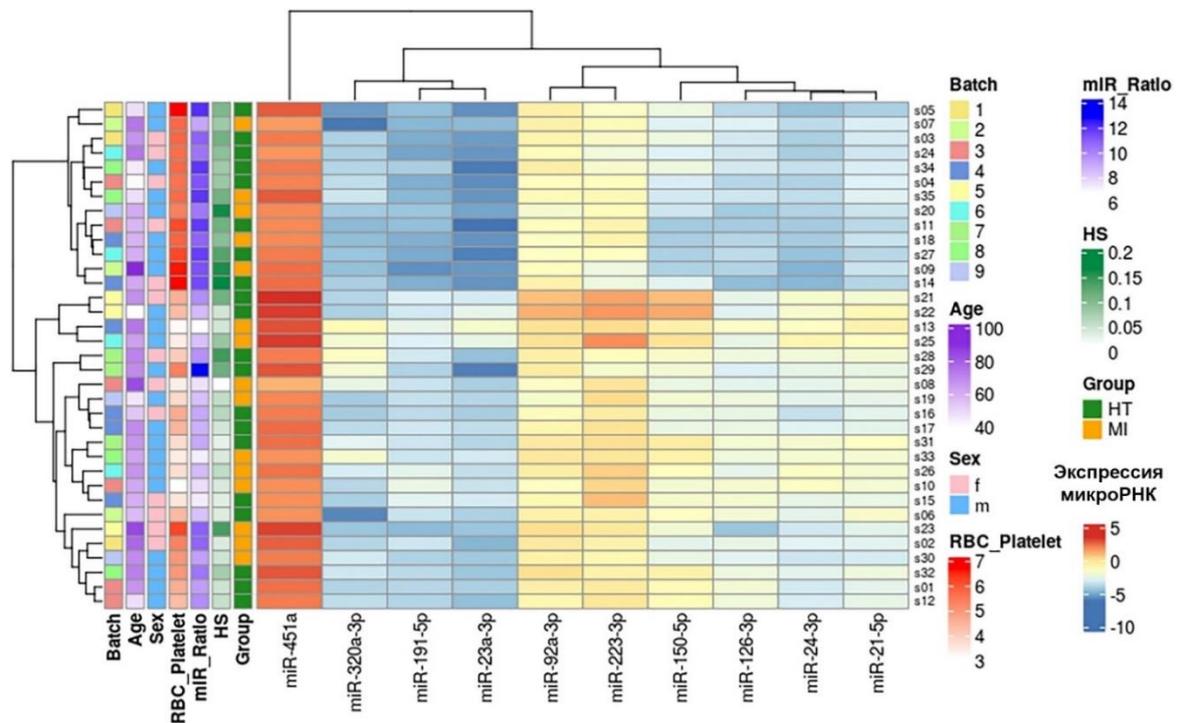


Рис. 5. Тепловая карта относительных уровней экспрессии микроРНК. Строки представляют индивидуальные образцы. Age, возраст; HS, коэффициент гемолиза; Group, группа исследования; Batch, батч-эффект; Sex, пол; RBC_Platelet, RBC-Platelet miR Ratio; miR_Ratio, miR Ratio.

Fig. 5. Heatmap of the normalized microRNA expression levels. The rows represent individual samples. RBC_Platelet, RBC-Platelet miR Ratio; miR_Ratio, miR Ratio; HS, hemolysis score.

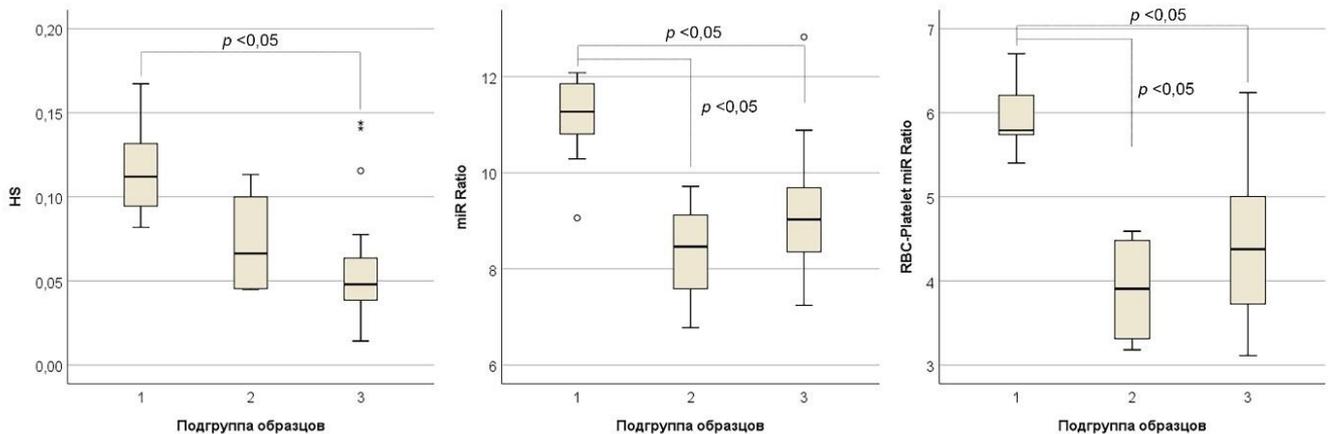


Рис. 6. Распределение величин, связанных с гемолизом образцов плазмы, в подгруппах исследования на основании тепловой карты. Столбцы распределения («ящики» и «усы») представляют собой медиану и границы квартилей. Точки или звездочки (*) обозначают выбивающиеся из распределения образцы. Отмечены парные сравнения, имеющие статистически значимые различия (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$).

Fig. 6. Distribution of values associated with hemolysis of plasma samples in the study subgroups based on the heatmap. The columns of the distribution ("boxes" and "whiskers") represent the median and quartile boundaries. Dots or asterisks (*) indicate outlier samples in the distribution. Pairwise comparisons with statistically significant differences are marked (Mann-Whitney test, $p < 0.05$).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что в исследованной выборке пациентов кардиологической клиники гемолиз образцов плазмы и его влияние на соотношение микроРНК эритроцитарного и тромбоцитарного происхождения были более выраженными факторами влияния на профили микроРНК, чем наличие STEMI у пациентов с гипертонической болезнью.

Данное исследование имеет ряд ограничений. Из факторов, характеризующих состояние тромбоцитов, было проанализировано только их общее количество, которое является одной из характеристик общего анализа крови. Мы не анализировали параметры активации тромбоцитов, их средний объем и долю крупных тромбоцитов, так как данные виды анализа требуют дополнительных условий и не проводятся по умолчанию пациентам кардиологической клиники. Ограничение, касающееся выбора референсной микроРНК для нормализации данных, было описано выше. Кроме того, мы не анализировали кардиоспецифичные микроРНК, такие как miR-1 или miR-133, которые могут быть индикаторами повреждения миокарда по аналогии с сердечными тропонинами [16, 19, 54]. Малая выборка пациентов с наличием STEMI была обусловлена невключением ряда образцов из-за наличия выраженного гемолиза плазмы (визуально обнаруживаемый гемолиз или HS >0,2). Вследствие малого размера выборки пациентов с наличием STEMI, данная группа не была дополнительно стратифицирована по клиническим характеристикам.

Заключение. В данном исследовании мы впервые одновременно проанализировали большую часть спектра микроРНК, ассоциированных с тромбоцитами и их активацией, в группе пациентов с наличием и отсутствием STEMI на фоне ГБ. Методология исследования была построена на новейших знаниях о влиянии пре-аналитических факторов на профили ц-микроРНК. Для снижения потенциального влияния активации тромбоцитов *in vitro*, при получении плазмы крови использовались пробирки с СТАД. Группы были стандартизованы по

критерию приема антиагрегантной терапии. Мы не обнаружили статистически значимых различий в относительных уровнях ц-микроРНК тромбоцитарного происхождения между группами пациентов с неосложненной ГБ без ИБС (n = 20) и пациентов со STEMI на фоне ГБ (n = 15). Было показано, что соотношение между ц-микроРНК тромбоцитарного и эритроцитарного происхождения коррелирует со степенью гемолиза образцов плазмы. Анализ профилей ц-микроРНК показал, что разделение образцов на группы в зависимости от степени гемолиза было более выражено, чем разделение на группы по наличию STEMI. Таким образом, степень гемолиза определяла различия в профилях микроРНК в большей степени, чем наличие STEMI у пациентов с ГБ. Отсутствие различий между группами для некоторых микроРНК тромбоцитарного происхождения, рассматриваемых как потенциальные биомаркеры ОИМ, может быть обусловлено как спецификой методологии данного исследования, так и влиянием пре-аналитических факторов на профили ц-микроРНК плазмы.

Информация о финансировании

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-00114).

Financial support

The research was supported by RSF (project No. 21-75-00114).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Li Z, Lin L, Wu H, et al. Global, Regional, and National Death, and Disability-Adjusted Life-Years (DALYs) for Cardiovascular Disease in 2017 and Trends and Risk Analysis From 1990 to 2017 Using the Global Burden of Disease Study and Implications for Prevention.

- Frontiers in Public Health. 2021;9:559751. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.559751>
2. Roth GA, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2018;392(10159):1736-1788. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)
 3. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2023;147(8):e93-e621. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001123>
 4. Kringeland E, Tell GS, Midtbø H, et al. Stage 1 hypertension, sex, and acute coronary syndromes during midlife: the Hordaland Health Study. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2022;29(1):147-154. DOI: <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwab068>
 5. Konstantinou K, Tsioufis C, Koumelli A, et al. Hypertension and patients with acute coronary syndrome: Putting blood pressure levels into perspective. *Journal of Clinical Hypertension*. 2019;21(8):1135-1143. DOI: <https://doi.org/10.1111/jch.13622>
 6. Björkegren JLM, Lusis AJ. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell*. 2022;185(10):1630-1645. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.004>
 7. Mangieri A, Gallo F, Sticchi A, et al. Dual antiplatelet therapy in coronary artery disease: from the past to the future prospective. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics*. 2020;35(2):117-129. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12928-020-00642-w>
 8. Hałucha K, Rak-Pasikowska A, Bil-Lula I. Protective Role of Platelets in Myocardial Infarction and Ischemia/Reperfusion Injury. *Cardiology Research and Practice*. 2021;2021:5545416. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/5545416>
 9. Fuentes E, Moore-Carrasco R, de Andrade Paes AM, et al. Role of Platelet Activation and Oxidative Stress in the Evolution of Myocardial Infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2019;24(6):509-520. DOI: <https://doi.org/10.1177/1074248419861437>
 10. Wang J, Tan GJ, Han LN, et al. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2017;14(2):135-150. DOI: <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2017.02.008>
 11. Kamińska J, Koper OM, Siedlecka-Czykier E, et al. The utility of inflammation and platelet biomarkers in patients with acute coronary syndromes. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018;25(7):1263-1271. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.015>
 12. Baidildinova G, Nagy M, Jurk K, et al. Soluble Platelet Release Factors as Biomarkers for Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;8:684920. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.684920>
 13. Viereck J, Thum T. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circulation Research*. 2017;120(2):381-399. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308434>
 14. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, et al. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15(9):541-563. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0035-x>
 15. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018;39(7):1073-1084. DOI: <https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>
 16. Kaur A, Mackin ST, Schlosser K, et al. Systematic review of microRNA biomarkers in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Cardiovascular Research*. 2020;116(6):1113-1124. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz302>
 17. Melak T, Baynes HW. Circulating microRNAs as possible biomarkers for coronary artery disease: a narrative review. *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2019;30(2):179-194.
 18. Churov A, Summerhill V, Grechko A, et al. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(22):5547. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20225547>
 19. Schulte C, Barwari T, Joshi A, et al. Comparative Analysis of Circulating Noncoding RNAs Versus Protein Biomarkers in the Detection of Myocardial Injury. *Circulation Research*. 2019;125(3):328-340. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314937>
 20. Arraud N, Linares R, Tan S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(5):614-627. DOI: <https://doi.org/10.1111/jth.12554>

21. Puhm F, Boilard E, Machlus KR. Platelet Extracellular Vesicles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021;41(1):87-96. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314644>
22. Zhelankin AV, Iulmetova LN, Sharova EI. The Impact of the Anticoagulant Type in Blood Collection Tubes on Circulating Extracellular Plasma MicroRNA Profiles Revealed by Small RNA Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(18):10340. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms231810340>
23. Gutmann C, Mayr M. Circulating microRNAs as biomarkers and mediators of platelet activation. *Platelets*. 2022;33(4):512-519. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2022.2042236>
24. Pedersen OB, Grove EL, Kristensen SD, et al. MicroRNA as Biomarkers for Platelet Function and Maturity in Patients with Cardiovascular Disease. *Thrombosis and Haemostasis*. 2022;122(2):181-195. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1730375>
25. Procyk G, Klimczak-Tomaniak D, Sygitowicz G, et al. Circulating and Platelet MicroRNAs in Cardiovascular Risk Assessment and Antiplatelet Therapy Monitoring. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(7):1763. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm11071763>
26. Krammer TL, Zeibig S, Schrottmaier WC, et al. Comprehensive Characterization of Platelet-Enriched MicroRNAs as Biomarkers of Platelet Activation. *Cells*. 2022;11(8):1254. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11081254>
27. Krammer TL, Mayr M, Hackl M. microRNAs as promising biomarkers of platelet activity in antiplatelet therapy monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(10):E3477. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21103477>
28. Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, et al. MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity: The Clot Thickens. *Circulation Research*. 2017;120(2):418-435. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309303>
29. Paseban M, Marjaneh RM, Banach M, et al. Modulation of microRNAs by aspirin in cardiovascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2020;30(5):249-254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.08.005>
30. Krammer TL, Kollars M, Kyrle PA, et al. Plasma levels of platelet-enriched microRNAs change during antiplatelet therapy in healthy subjects. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1078722. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1078722>
31. Czajka P, Fitas A, Jakubik D, et al. MicroRNA as Potential Biomarkers of Platelet Function on Antiplatelet Therapy: A Review. *Frontiers in Physiology*. 2021;12:652579. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.652579>
32. Pordzik J, Piszczak K, De Rosa S, et al. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:74. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00074>
33. Garcia A, Dunoyer-Geindre S, Zapilko V, et al. Functional Validation of microRNA-126-3p as a Platelet Reactivity Regulator Using Human Haematopoietic Stem Cells. *Thrombosis and Haemostasis*. 2019;119(2):254-263. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1676802>
34. Zapilko V, Fish RJ, Garcia A, et al. MicroRNA-126 is a regulator of platelet-supported thrombin generation. *Platelets*. 2020;31(6):746-755. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1775804>
35. Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, et al. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function. *Circulation Research*. 2016;118(3):420-432. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.305663>
36. Becker KC, Kwee LC, Neely ML, et al. Circulating MicroRNA Profiling in Non-ST Elevated Coronary Artery Syndrome Highlights Genomic Associations with Serial Platelet Reactivity Measurements. *Scientific Reports*. 2020;10(1):6169. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63263-6>
37. McManus DD, Freedman JE. MicroRNAs in platelet function and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2015;12:711-717. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.101>
38. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0145930. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145930>
39. Fourdinier O, Schepers E, Metzinger-Le Meuth V, et al. Serum levels of miR-126 and miR-223 and outcomes in chronic kidney disease patients. *Scientific Reports*. 2019;9:4477. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41101-8>

40. Li S, Guo LZ, Kim MH, et al. Platelet microRNA for predicting acute myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2017;44:556-564. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11239-017-1537-6>

41. Liu J, Qin L, Wang Z, et al. Platelet-derived miRNAs as determinants of the antiplatelet response in clopidogrel-treated patients with ACS. *Thrombosis Research*. 2020;186:71-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.12.016>

42. Felekis K, Papanephytous C. Challenges in Using Circulating Micro-RNAs as Biomarkers for Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(2):561. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21020561>

43. Mussbacher M, Krammer TL, Heber S, et al. Impact of Anticoagulation and Sample Processing on the Quantification of Human Blood-Derived microRNA Signatures. *Cells*. 2020;9(8):1915. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9081915>

44. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):e618-e651. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617>

45. Appierto V, Callari M, Cavadini E, et al. A lipemia-independent NanoDrop®-based score to identify hemolysis in plasma and serum samples. *Bioanalysis*. 2014;6(9):1215-1226. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.13.344>

46. Binderup HG, Madsen JS, Heegaard NHH, et al. Quantification of microRNA levels in plasma – Impact of preanalytical and analytical conditions. *PLoS ONE*. 2018;13(7):0201069. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201069>

47. Poel D, Buffart TE, Oosterling-Jansen J, et al. Evaluation of several methodological challenges in circulating miRNA qPCR studies in patients with head and neck cancer. *Experimental and Molecular Medicine*. 2018;50(3):e454. DOI: <https://doi.org/10.1038/emm.2017.288>

48. Doss JF, Corcoran DL, Jima DD, et al. A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes. *BMC Genomics*. 2015;16:952. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2156-2>

49. Smith MD, Leemaqz SY, Jankovic-Karasoulos T, et al. Haemolysis Detection in MicroRNA-Seq from Clinical Plasma Samples. *Genes*. 2022;13(7):1288. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13071288>

50. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*. 2013;59(1):S1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.015>

51. Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SCH, et al. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Frontiers in Genetics*. 2013;4:94. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00094>

52. Pizzamiglio S, Zanutto S, Ciniselli CM, et al. A methodological procedure for evaluating the impact of hemolysis on circulating microRNAs. *Oncology Letters*. 2017;13(1):315-320. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5452>

53. Zhelankin AV, Stonogina DA, Vasiliev SV, et al. Circulating Extracellular miRNA Analysis in Patients with Stable CAD and Acute Coronary Syndromes. *Biomolecules*. 2021;11(7):962. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11070962>

54. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circulation Cardiovascular Genetics*. 2011;4(4):446-454. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCGENET-ICS.110.958975>

References

1. Li Z, Lin L, Wu H, et al. Global, Regional, and National Death, and Disability-Adjusted Life-Years (DALYs) for Cardiovascular Disease in 2017 and Trends and Risk Analysis From 1990 to 2017 Using the Global Burden of Disease Study and Implications for Prevention. *Frontiers in Public Health*. 2021;9:559751. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.559751>

2. Roth GA, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2018;392(10159):1736-1788. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)

3. Tsao CW, Aday AW, Almarazooq ZI, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2023;147(8):e93-e621. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001123>

4. Kringeland E, Tell GS, Midtbø H, et al. Stage 1 hypertension, sex, and acute coronary syndromes during midlife: the Hordaland Health Study. *European Journal of Preventive Cardiology*.

- 2022;29(1):147-154. DOI: <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwab068>
5. Konstantinou K, Tsioufis C, Koumelli A, et al. Hypertension and patients with acute coronary syndrome: Putting blood pressure levels into perspective. *Journal of Clinical Hypertension*. 2019;21(8):1135-1143. DOI: <https://doi.org/10.1111/jch.13622>
6. Björkegren JLM, Lusis AJ. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell*. 2022;185(10):1630-1645. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.004>
7. Mangieri A, Gallo F, Sticchi A, et al. Dual antiplatelet therapy in coronary artery disease: from the past to the future prospective. *Cardiovascular Intervention and Therapeutics*. 2020;35(2):117-129. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12928-020-00642-w>
8. Hałucha K, Rak-Pasikowska A, Bil-Lula I. Protective Role of Platelets in Myocardial Infarction and Ischemia/Reperfusion Injury. *Cardiology Research and Practice*. 2021;2021:5545416. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/5545416>
9. Fuentes E, Moore-Carrasco R, de Andrade Paes AM, et al. Role of Platelet Activation and Oxidative Stress in the Evolution of Myocardial Infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2019;24(6):509-520. DOI: <https://doi.org/10.1177/1074248419861437>
10. Wang J, Tan GJ, Han LN, et al. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2017;14(2):135-150. DOI: <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2017.02.008>
11. Kamińska J, Koper OM, Siedlecka-Czykier E, et al. The utility of inflammation and platelet biomarkers in patients with acute coronary syndromes. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018;25(7):1263-1271. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.015>
12. Baidildinova G, Nagy M, Jurk K, et al. Soluble Platelet Release Factors as Biomarkers for Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;8:684920. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.684920>
13. Viereck J, Thum T. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circulation Research*. 2017;120(2):381-399. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308434>
14. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, et al. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15(9):541-563. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0035-x>
15. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018;39(7):1073-1084. DOI: <https://doi.org/10.1038/aps.2018.30>
16. Kaur A, Mackin ST, Schlosser K, et al. Systematic review of microRNA biomarkers in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Cardiovascular Research*. 2020;116(6):1113-1124. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz302>
17. Melak T, Baynes HW. Circulating microRNAs as possible biomarkers for coronary artery disease: a narrative review. *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2019;30(2):179-194.
18. Churov A, Summerhill V, Grechko A, et al. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(22):5547. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20225547>
19. Schulte C, Barwari T, Joshi A, et al. Comparative Analysis of Circulating Noncoding RNAs Versus Protein Biomarkers in the Detection of Myocardial Injury. *Circulation Research*. 2019;125(3):328-340. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314937>
20. Arraud N, Linares R, Tan S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(5):614-627. DOI: <https://doi.org/10.1111/jth.12554>
21. Puhm F, Boilard E, Machlus KR. Platelet Extracellular Vesicles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021;41(1):87-96. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314644>
22. Zhelankin AV, Iulmetova LN, Sharova EI. The Impact of the Anticoagulant Type in Blood Collection Tubes on Circulating Extracellular Plasma MicroRNA Profiles Revealed by Small RNA Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(18):10340. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms231810340>
23. Gutmann C, Mayr M. Circulating microRNAs as biomarkers and mediators of platelet activation. *Platelets*. 2022;33(4):512-519. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2022.2042236>

24. Pedersen OB, Grove EL, Kristensen SD, et al. MicroRNA as Biomarkers for Platelet Function and Maturity in Patients with Cardiovascular Disease. *Thrombosis and Haemostasis*. 2022;122(2):181-195. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1730375>
25. Procyk G, Klimczak-Tomaniak D, Sygitowicz G, et al. Circulating and Platelet MicroRNAs in Cardiovascular Risk Assessment and Antiplatelet Therapy Monitoring. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(7):1763. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm11071763>
26. Krammer TL, Zeibig S, Schrottmaier WC, et al. Comprehensive Characterization of Platelet-Enriched MicroRNAs as Biomarkers of Platelet Activation. *Cells*. 2022;11(8):1254. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11081254>
27. Krammer TL, Mayr M, Hackl M. microRNAs as promising biomarkers of platelet activity in antiplatelet therapy monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(10):E3477. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21103477>
28. Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, et al. MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity: The Clot Thickens. *Circulation Research*. 2017;120(2):418-435. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309303>
29. Paseban M, Marjaneh RM, Banach M, et al. Modulation of microRNAs by aspirin in cardiovascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2020;30(5):249-254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.08.005>
30. Krammer TL, Kollars M, Kyrle PA, et al. Plasma levels of platelet-enriched microRNAs change during antiplatelet therapy in healthy subjects. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1078722. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1078722>
31. Czajka P, Fitas A, Jakubik D, et al. MicroRNA as Potential Biomarkers of Platelet Function on Antiplatelet Therapy: A Review. *Frontiers in Physiology*. 2021;12:652579. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.652579>
32. Pordzik J, Piszczak K, De Rosa S, et al. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:74. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00074>
33. Garcia A, Dunoyer-Geindre S, Zapolko V, et al. Functional Validation of microRNA-126-3p as a Platelet Reactivity Regulator Using Human Haematopoietic Stem Cells. *Thrombosis and Haemostasis*. 2019;119(2):254-263. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1676802>
34. Zapolko V, Fish RJ, Garcia A, et al. MicroRNA-126 is a regulator of platelet-supported thrombin generation. *Platelets*. 2020;31(6):746-755. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1775804>
35. Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, et al. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function. *Circulation Research*. 2016;118(3):420-432. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.305663>
36. Becker KC, Kwee LC, Neely ML, et al. Circulating MicroRNA Profiling in Non-ST Elevated Coronary Artery Syndrome Highlights Genomic Associations with Serial Platelet Reactivity Measurements. *Scientific Reports*. 2020;10(1):6169. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63263-6>
37. McManus DD, Freedman JE. MicroRNAs in platelet function and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2015;12:711-717. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.101>
38. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0145930. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145930>
39. Fourdinier O, Schepers E, Metzinger-Le Meuth V, et al. Serum levels of miR-126 and miR-223 and outcomes in chronic kidney disease patients. *Scientific Reports*. 2019;9:4477. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41101-8>
40. Li S, Guo LZ, Kim MH, et al. Platelet microRNA for predicting acute myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2017;44:556-564. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11239-017-1537-6>
41. Liu J, Qin L, Wang Z, et al. Platelet-derived miRNAs as determinants of the antiplatelet response in clopidogrel-treated patients with ACS. *Thrombosis Research*. 2020;186:71-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.12.016>
42. Felekkis K, Papanephytous C. Challenges in Using Circulating Micro-RNAs as Biomarkers for Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(2):561. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21020561>

43. Mussbacher M, Krammer TL, Heber S, et al. Impact of Anticoagulation and Sample Processing on the Quantification of Human Blood-Derived microRNA Signatures. *Cells*. 2020;9(8):1915. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9081915>

44. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20):e618-e651. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617>

45. Appierto V, Callari M, Cavadini E, et al. A lipemia-independent NanoDrop(®)-based score to identify hemolysis in plasma and serum samples. *Bioanalysis*. 2014;6(9):1215-1226. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.13.344>

46. Binderup HG, Madsen JS, Heegaard NHH, et al. Quantification of microRNA levels in plasma – Impact of preanalytical and analytical conditions. *PLoS ONE*. 2018;13(7):0201069. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201069>

47. Poel D, Buffart TE, Oosterling-Jansen J, et al. Evaluation of several methodological challenges in circulating miRNA qPCR studies in patients with head and neck cancer. *Experimental and Molecular Medicine*. 2018;50(3):e454. DOI: <https://doi.org/10.1038/emm.2017.288>

48. Doss JF, Corcoran DL, Jima DD, et al. A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes. *BMC Genomics*. 2015;16:952. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2156-2>

49. Smith MD, Leemaqz SY, Jankovic-Karasoulos T, et al. Haemolysis Detection in MicroRNA-Seq from Clinical Plasma Samples. *Genes*. 2022;13(7):1288. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13071288>

50. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*. 2013;59(1):S1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.015>

51. Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SCH, et al. The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Frontiers in Genetics*. 2013;4:94. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00094>

52. Pizzamiglio S, Zanutto S, Ciniselli CM, et al. A methodological procedure for evaluating the impact of hemolysis on circulating microRNAs. *Oncology Letters*. 2017;13(1):315-320. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5452>

53. Zhelankin AV, Stonogina DA, Vasiliev SV, et al. Circulating Extracellular miRNA Analy-

sis in Patients with Stable CAD and Acute Coronary Syndromes. *Biomolecules*. 2021;11(7):962. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11070962>

54. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circulation Cardiovascular Genetics*. 2011;4(4):446-454. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCGENET-ICS.110.958975>

Статья поступила в редакцию 4 мая 2023 г.

Поступила после доработки 15 марта 2024 г.

Принята к печати 19 апреля 2024 г.

Received 4 May 2023

Revised 15 March 2024

Accepted 19 April 2024

Информация об авторах

Андрей Викторович Желанкин, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека, отдел биомедицины и геномики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: zhelankin.andrey@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3014-2005>.

Дарья Алексеевна Стоногина, врач-кардиолог ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: stonogina.d@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1508-4257>.

Анна Сергеевна Аксельрод, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: 7402898@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3604-4975>.

Information about the authors

Andrey V. Zhelankin, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher at the Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Biomedicine and Genomics, Lopukhin Federal Research and Clinical

Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, E-mail: zhelankin.andrey@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3014-2005>.

Daria A. Stonogina, Cardiologist, Yudin City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department, Moscow, Russia, E-mail: stonogina.d@gmail.com, ORCID: [https://](https://orcid.org/0000-0002-1508-4257)

orcid.org/0000-0002-1508-4257.

Anna S. Akselrod, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Professor at the Department of Cardiology, Functional and Ultrasound Diagnostics, Sklifovskiy Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, E-mail: 7402898@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3604-4975>.