



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

**Факултет «Фармация»
Катедра «Химия и биохимия»
Сектор «Биохимия»**

Георги Маринов Големанов

**Носителство на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI -1 и полиморфизъм
PL A1/A2 в гена на тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa, като възможни
рискови фактори за репродуктивни проблеми при жени със синдром на
поликистозни яйчници**

**АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
за присъждане на образователна и научна степен “доктор”**

Област на висше образование:

4. „Природни науки, математика и информатика“

Професионално направление: 4. 3 „Биологически науки“

Докторска програма „Биохимия“

Научни ръководители:

Проф. Регина Комса - Пенкова, д. б. н.

Проф. Д-р Катя Ковачева, д. м.

Научни рецензенти:

Проф. Татяна Влайкова, д. б. н.

Проф. Диана Иванова, д. б. н.

Плевен

2021

Дисертационният труд е представен на 131 машинописни страници и съдържа 30 фигури и 36 таблици. Библиографията обхваща 126 литературни източници (на латиница), като са включени и 2 проложения.

Докторантът работи като асистент в сектор „Биохимия“, дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по „Химия и биохимия“ при факултет „Фармация“ към Медицински университет - Плевен.

Всички включени в дисертацията изследвания са извършени в: Катедра по Химия и биохимия към Медицински университет г. Плевен

Част от изследователската работа по дисертационния труд е изработена и финансирана, в рамките на 5 научно-изследователски проекта към НИИ при МУ – Плевен (проекти № 23/2013; № 21/2015; № 15/2016; 21/2016; № 20/2017):

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на.....2021 г. От часа в Катедра по Химия и биохимия, Медицински университет гр. Плевен, ул. Свети Климент Охридски 1, гр. Плевен.

Материалите по защитата са на разположение в Катедра «Химия и биохимия» при МУ- гр. Плевен.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРЪЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

АГЕ – Агарозна гел електрофореза

АМХ – Анти-Мюлеров хормон

АР – Андрогенен рецептор

ВС – Вторичен стерилитет

ИР – Инсулинова резистентност

ИТМ – Индекс на телесната маса

ЛХ – Лутеинизиращ хормон

МС – Метаболитен синдром

ПЗБ – Повтарящи се загуби на бремеността

ПС – Първичен стерилитет

РЗБ – Рана загуба на бремеността

РП – Репродуктивни проблеми

СПА – Спонтанни аборти

СПКЯ – Синдром на поликистозните яйчници

ФСХ – Фоликулостимулиращ хормон

ХИ – Хиперинсулинемия

Съкращения на латиница:

FVL – Фактор 5 Лайден

GIPr – Гликопротеин

GnRH – Гонадотропин рилийзинг хормон

MTHFR – Метилентетрахидрофулат редуктаза

PAI-1 – Плазминоген активатор инхибитор 1

PCR – Полимеразно верижна реакция

PTM – Протромбин

SHBG – Секс-хормон свързващ глобулин

t-PA – Тъканно плазминогенен активатор

СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение.....	1
Основна цел.....	2
Задачи.....	2
Материали и методи.....	3
1. Постановка и клиничен контингент на проучването.....	3
2. Клинични критерии за включване в проучването.....	3
3. Методи на изследването.....	4
3. 1. Лабораторни методи.....	4
3. 2. Изолирането на геномна ДНК по метод на солевата екстракция.....	4
3. 3. Оценка на качеството на екстрахираната ДНК и определяне на нейната концентрация.....	4
3. 4. Основни принципи на Полимеразно-верижната реакция (PCR)	5
3. 5. Качествен и количествен контрол на PCR.....	5
4. Директен ДНК анализ. Потвърждаващи методи за откриване на известни полиморфизми и мутации.....	5
4. 1. Рестрикционен анализ.....	5
4. 2. Алелспецифичен анализ.....	6
4. 3. Визуализиращи методики при извършване на ДНК анализ.....	6
5. Принцип за определяне носителството на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI -1	6
6. Принцип за определяне носителството на полиморфизъм PLA2 на тромбоцитния гликопротеин GPIIb / IIIa Rs5918 в INGB3.....	6
7. Статистически анализ на данните.....	7
Резултати и обсъждане.....	8
1. Клинични характеристика на пациентите	8
2. Честота на генотипи 5G/5G, 5G/4G и 4G/4G в гена на PAI-1 в пациентската група жени със СПКЯ и в контролната група.....	9
2. 1. Честота на генотипи 5G/5G, 5G/4G и 4G/4G на PAI-1 в групите жени със СПКЯ, жени със СПКЯ и РП, подгрупите и в контролната група.....	11
2. 2. Сравняване честотата на генотип 5G/5G на PAI-1 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група.....	12
2. 3. Сравняване честотата на генотип 5G/4G на PAI-1 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група.....	13

2. 4. Сравняване честотата на генотип 4G/4G на PAI-1 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група.....	13
2. 5. Сравняване честотата на генотип 4G/4G на PAI-1 в двете групи жени със СПКЯ с репродуктивни проблеми и без такива.....	14
2. 6. Честота на алелите 5G и 4G на полиморфизъм PAI-1 в основните групи и подгрупи, сравнени с тези в контролната група.....	15
3. Проучване честотата на полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C).....	17
3. 1. Честота на генотипи A1/A1, A1/A2 и A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в пациентската група жени със СПКЯ и в контролната група.....	17
3. 2. Честота на генотипи A1/A1, A1/A2 и A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в групите жени със СПКЯ, жени със СПКЯ и РП, подгрупите и в контролната група.....	18
3. 3. Сравняване честотата на генотип A1/A1 на полиморфизъм PLA1/A2 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група.....	18
3. 4. Сравняване честотата на генотип A1/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група.....	19
3. 5. Сравняване честотата на генотип A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група.....	19
3. 6. Сравняване честотата на генотип A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в групите жени със СПКЯ с репродуктивни проблеми и без такива.....	20
3. 7. Честота на алелите A1 и A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в основните групи и подгрупи, сравнени с тези в контролната група.....	20
4. Проучване честотата на двойно носителство на генотип 4G/4G PAI-1 и генотип A2/A2 P1 (1565T/C).....	22
4.1. Сравняване честотата на двойно носителство на генотип 4G/4G PAI-1 и генотип A2/A2 P1 в групите жени със СПКЯ, СПКЯ и РП и подгрупите, с тази в контролната група.....	22
Обобщение от собствено изследване.....	24
Изводи.....	25
Приноси.....	26
Научни публикации и съобщения.....	27
Благодарности.....	28
SUMMARY.....	39

ВЪВЕДЕНИЕ

Наричана в миналото синдром на Stein–Leventhal, поликистозата на яйчниците отдавна се е превърнала от типично гинекологично заболяване, в мултисистемна ендокринопатия с мултифакторна етиология. Синдромът на поликистозните яйчници (СПКЯ) е едно от най-честите ендокринни заболявания при жените, свързано с менструални нарушения, ановулаторен инфертилитет, андрогенизъм, хистологични и ехографски данни за кистозни яйчници, наднормено тегло, хирзутизъм и съпътстващи репродуктивни проблеми. СПКЯ е сложно комплексно заболяване с не докрай изяснена етиология и каскадна патофизиологична изява, което предизвиква все още многобройни и разнопосочни научни търсения за по-детайлно разгадаване етиологията му и връзката с репродуктивните проблеми, често съпътстващи синдрома.

Все повече се налага виждането, че само около една трета от жените със СПКЯ отговарят на така наречените класически критерии, докато останалите жени попадат в един широк спектър от разностранни клинични изяви. Жените със СПКЯ попадат в рисковите групи на метаболитните синдромни фактори, като инсулинова резистентност (ИР), хиперхолестеролемия, хипертриглицеридемия, риск от сърдечни заболявания, репродуктивни проблеми (РП), диабет и висок индекс на телесна маса (ИТМ). Тези фактори, доста често са налице още в млада възраст, което говори, че хроничните нарушения в хормоналния и метаболитния статус, характерни за синдрома, предразполагат към репродуктивни проблеми в бъдеще, водещи до съществени здравни и социални рискове в репродуктивна възраст.

Недостатъчни са данните в международната научна литература, по отношение изследване на генетичните фактори за предиспозиция към СПКЯ. От друга страна, ограничен е броят на научните изследвания, проучващи връзката на полиморфизми в гените на някои фактори за тромбофилия със СПКЯ и съпътстващите го репродуктивни проблеми. Основен обект на тези проучвания са някои от по-честите генетични дефекти за тромбофилия, като Фактор 5 Лайден (FVL), генетичен вариант G20210A на протромбина (PTM) и C677T на метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR), като доста оскъдна е информацията, относно полиморфизмите на плазминоген активатор-инхибитор 1 (PAI-14G/5G) и тромбоцитен гликопротеин IIb/IIIa (PL A1/A2).

По тази причина и при липсата на достоверни статистически данни за Българската популация, ние насочихме нашия интерес към изследване на тези два по-рядко проучвани генетични дефекти и асоциацията им със заболяването СПКЯ и някои негови усложнения. Настоящият дисертационен труд се опитва да допринесе за един по-широк поглед в генетичната етиология на СПКЯ и ролята на някои генетични фактори за повишаване риска, както за развитие на заболяването, така и за свързаните с него репродуктивни проблеми. Получените познания, от тази научна разработка, биха подобрили възможностите за навременно генетично консултиране и откриване на жените с генетично предразположение, за ранна диагностика на тази патология и профилактика на репродуктивните усложнения при тези жени.

ОСНОВНА ЦЕЛ

Проучване ролята на полиморфизми 4G/5G в гена на PAI -1 и PL A1/A2 в гена на тромбоцитен гликопротеин Пб/Ша, като възможни фактори за предразположение към синдром на поликистозни яйчници, както и за повишаване на риска за репродуктивни проблеми при жени с това заболяване, в Българската популация.

ЗАДАЧИ

1. Проучване на асоциацията между полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 и СПКЯ, с оглед оценка ролята на генетичния вариант за повишаване риска за развитие на заболяването.
 - 1.1. Изследване честотата на носителство на генотипи 5G/5G, 4G/5G, 4G/4G при жени със СПКЯ, сравнени с тези в контролната група.
 - 1.2. Изследване честотата на носителство на алели 5G и 4G при жени със СПКЯ, сравнени с тези в контролната група.
2. Проучване на асоциацията между полиморфизъм PL A1/A2 в гена на тромбоцитния гликопротеин Пб/Ша и СПКЯ, с оглед оценка ролята на генетичния вариант за повишаване риска за развитие на заболяването.
 - 2.1. Изследване честотата на носителство на генотипи A1/A1, A2/A1, A2/ A2 при жени със СПКЯ, сравнени с тези в контролната група.
 - 2.2. Изследване върху честотата на носителство на алели A1 и A2 при жени със СПКЯ, сравнени с тези в контролната група.
3. Проучване ролята на носителството на полиморфизъм PAI-1 4G/5G, като фактор повишаващ риска за репродуктивните проблеми при жени със СПКЯ.
 - 3.1. Изследване честотата на носителство на генотипи 5G/5G, 4G/5G, 4G/4G, в основните групи и подгрупи жени със СПКЯ и различни по характер репродуктивни проблеми, сравнени с честотата определена в контролната група.
 - 3.2. Изследване честотата на носителство на алели 5G и 4G в основните групи и подгрупи жени със СПКЯ и различни по характер репродуктивни проблеми, сравнени с честотата определена в контролната група.
4. Проучване ролята на носителството на полиморфизъм PL A1/A2, като фактор повишаващ риска за репродуктивните проблеми при жени със СПКЯ.
 - 4.1. Изследване честотата на носителство на генотипи A1/A1, A2/A1, A2/ A2, в основните групи и подгрупи жени със СПКЯ и различни по характер репродуктивни проблеми, сравнени с честотата определена в контролната група.
 - 4.2. Изследване честотата на носителство на алели A1 и A2 в основните групи и подгрупи жени със СПКЯ и различни по характер репродуктивни проблеми, сравнени с честотата определена в контролната група.
5. Проучване ролята на двойното носителство на полиморфизми PAI-1 4G/4G и PL A2/A2, като фактор повишаващ риска за репродуктивните проблеми при жени със СПКЯ.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Постановка и клиничен контингент на проучването

Проучването се извърши в периода 2016г. – 2019 г. в Медицински Университет гр. Плевен, факултет Фармация, катедра „Химия и Биохимия” – сектор Биохимия. В проучването се селектираха две групи, група от 129 жени със СПКЯ и контролна група от 99 жени без СПКЯ. Подбора на групите бе осъществен от научните ръководители, докторанта, както и с помощта на екип на центъра за репродуктивна медицина „Репромед“ – гр. Плевен. Изследването на генетичните полиморфизми бе извършено в лабораторията за ДНК анализ към МУ – гр. Плевен, сектор Биохимия.

Всички жени от пациентската и контролна групи са дали съгласие за извършване на изследването съобразно етичните норми при провеждане на терапевтично и нетерапевтично изследване върху хора постановени от Комисията по етика на научно-изследователската дейност -КЕНИД при МУ- гр. Плевен.

2. Клинични критерии за включване в проучването

В проучването са включени жени само от българската популация. В таргетната група се селектираха 129 бр. жени със СПКЯ съгласно ревизираните критерии на Европейското дружество по човешка репродукция и ембриология и на Американското дружество за репродуктивна медицина на приетия консенсус в Ротердам през 2003 г. Възрастта на пациентската и контролната група е в рамките от 18 до 45 години, като средната възраст за жените със СПКЯ е 28.9 години, а на контролната група – 32.3 години. Изследваната група на жените със СПКЯ разделихме на основни и подгрупи с цел проучването да бъде по-пълно и задълбочено. Разделянето бе основано върху наличните репродуктивните инциденти и проблеми, които жените в основната група със СПКЯ имаха. Така се образуваха следените групи:

- Основна група на жени със СПКЯ (n=129)
- Група I – Жени със СПКЯ и РП (n=66)
- Подгрупа 1 – Жени със СПКЯ и първичен стерилитет (n=19)
- Подгрупа 2 – Жени със СПКЯ и вторичен стерилитет (n=15)
- Подгрупа 3 – Жени със СПКЯ и ранни СПА (n=18)
- Подгрупа 4 – Жени със СПКЯ и късни СПА (n=14)
- Група II – Жени със СПКЯ без РП (n=63)
- Контролна група жени (n=99)

Периода на ранните СПА е определен, като инциденти на СПА преди или в 12 гестационна седмица, късните СПА са определени след 12 гестационна седмица. Сроковете са съобразени с изискванията на специалистите акушер-гинеколози.

В контролната група са включени отново само жени от българската популация 99 на брой, без анамнеза за СПКЯ и ПКЯ, първичен и вторичен стерилитет, хирзутизъм, хиперандрогенемия, олиго и аменория, ранни или късни СПА, както и без фамилно обременяване по отношение на СПКЯ и ПКЯ.

3. Методи на изследването

Всички пациентки със СПКЯ и контролната група бяха анкетирани с въпроси от еднотипна анкетна карта специално разработена за нуждите на проучването съдържаща информация за антропометрични данни, фамилна обремененост, придобити фактори, както и инциденти на репродуктивни проблеми, участниците в проекта попълниха собственоръчно анкетната карта. Беше попълнен и фиш за медицинско направление за ДНК анализ и изследване на факторите за тромболитичните мутации. Всички изследвани пациентки са дали писмено информирано съгласие за изследването, като изцяло и напълно на пациентките и контролите е дадена пълна информация относно целите на проучването и евентуалните бъдещи ползи от научното изследване.

3. 1. Лабораторни методи

На всички пациентки и контроли се взеха по 2 бр. вакутейнери, с венозна кръв от 7 до 9 мл, от обучен персонал, при спазване на правилата за вземане на венозна кръв, вакутейнерите съдържат EDTA (0,084 ml 15% EDTA Becton, Dickinson and Company).

3. 2. Изолирането на геномна ДНК по метод на солевата екстракция

Изолирането на геномна ДНК, се постига чрез разрушаване на клетъчните и ядрените мембрани на левкоцитите, както и освобождаването на ДНК от хистоновите белтъци с помоща на различни буферни разтвори и реактиви. Белтъците се отстраняват с помоща на протеинази и детергенти. ДНК молекулите могат да се екстрахират в органични разтворители като фенол и хлороформ или да се изолират с помоща на 6М NaCl. Процедурата по излиране на ДНК стандартно по протокол със солева екстракция продължава в рамките на 24 часа.

3. 3. Оценка на качеството на екстрахираната ДНК и определяне на концентрация

За да се гарантира качеството на солево екстрахираната ДНК и в следствие на полимеразно-верижната реакция (PCR) е необходима предварителна оценка на количеството и. Измерването на концентрацията на геномната ДНК се извършва спектрофотометрично. Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната $\lambda = 260$ nm. от пуриновите и пиримидиновите бази в ДНК. Предварително ДНК се денатурира за

наблюдаване на хиперхромен ефект. Концентрациите на изолираните ДНК от настоящето изследване са измервани на спектрофотометър модел: BioPhotometer plus Eppendorf.

3. 4. Основни принципи на Полимеразно-верижната реакция (PCR)

Полимеразната верижна реакция (PCR) е основен метод, използван в молекулярната биология и молекулната диагностика. Състои се в *in vitro* ензимно размножаване (амплификация) на избрани нуклеотидни последователности, ограничени от известни секвенции. Полимеразно-верижната реакция, се основава на принципа на репликация на ДНК в клетката, като *in vitro* се амплифицира (умножава) определен регион от ДНК, който подлежи на изследване. Посредством използване на къси (олигонуклеотидни) последователности, разпознаващи по комплиментарност изследваният участък наречени праймери. Извършва се изграждане на копия на ДНК с помощта на термостабилна ДНК полимераза. Целта на реакцията е да се получат достатъчно количество ДНК от региона, който изследваме и който впоследствие ще се използва в редица качествени реакции за доказване и откриване на търсената мутация. Много често самата PCR може да бъде диагностичен метод за доказване носителството на генетични изменения - Алел-специфична PCR.

Умножаването на изходната ДНК се осигурява чрез повтарящи се цикли на нагряване и охлаждане извършващи се *in vitro* в апарати с термо-циклични блокове. Методът е разработен от Kary Mullis през 1985г.

3. 5. Качествен и количествен контрол на PCR

Продуктите на PCR се идентифицират с помощта на молекулни маркери. При провеждане на агарозна електрофореза, маркерът се нанася успоредно с анализираните проби, като по такъв начин се определя дължината на продукта. Методът дава възможност и за ориентировъчна оценка на добива на ДНК.

4. Директен ДНК анализ. Потвърждаващи методи за откриване на известни полиморфизми и мутации

В настоящата разработка са използвани два метода за директен ДНК анализ на мутации:

- Рестрикционен анализ
- Алел специфичен анализ.

4. 1. Рестрикционен анализ

Рестрикционният анализ представлява качествена реакция за доказване или отхвърляне на търсената мутация, при което PCR продуктите се инкубират със специфичен ензим – ендонуклеаза (рестриктаза). При използването на рестриктазата тя се подбира така, че да разпознава определена последователност в ДНК и да я среже на два по малки фрагмента.

Наличието на мутация в изследваният регион на ДНК създава или премахва рестрикционно място в PCR продукта. PCR продукта съдържащ мутация има различна дължина и различна електрофоретична подвижност.

4. 2. Алелспецифичен анализ

Алел специфичният анализ е вариант на стандартна полимеразно-верижна реакция, в която специфичността е повишена, чрез използването на допълнителен алел-специфичен праймер. Праймерът се подбира с такава последователност, че успешно да хибридизира само и единствено при наличие на търсената мутация в ДНК, когато той е праймер за мутантен алел или да хибридизира само при липсата на мутация, когато е праймер за нормален алел. За всяка проба от индивид изследван за носителство на една мутация се извършват успоредно две полимеразно – верижни реакции, едната с праймер за мутантен алел другата с праймер за нормален алел. Конститутивните праймери при стандартната полимеразно – верижна реакция също се добавят за да се амплифицира ДНК последователност извън изследваният регион.

4. 3. Визуализиращи методики при извършване на ДНК анализ

В това изследване повечето от пробите от пациентките след PCR и рестрикционен анализ бяха отчитани с помоща на агарозна гел-електрофореза, представляваща електрофоретично разделяне на фрагменти от ДНК върху агарозен гел. За интерпретирането на резултатите бяха използвани агарозни гелове с различна процентна концентрация в зависимост от търсената мутация и дължината на PCR продукта. По-късите последователности от ДНК се придвижват с по-голяма скорост в гела в сравнение с фрагментите с по-голяма дължина на базовите двойки. Подвижността на ДНК фрагментите се поддържа с помоща на постоянно физиологично рН на средата от 7,4, при което състояние ДНК е заредена отрицателно. Необходимото рН на средата се определя от TBE буфер-електрофоретичен буфер.

5. Принцип за определяне носителството на 4G/5G полиморфизъм в гена на PAI -1

Полиморфизмът 4G/5G в гена на PAI-1 представлява загуба/делеция на един нуклеотид на 675 място в последователността на промотора на гена на PAI-1. В единият случай се открива GGGG (4G) повтореност, а при другия GGGGG (5G) повтореност. Установяването на носителство на 4G или 5G алел се извършва с помоща на високо специфична двойка праймери, като всеки един от двата праймера е синтезиран да разпознава или само 4G или 5G последователността. Към реакцията се добавят и двойка конститутивни праймери, които са показател за качеството на PCR. Конститутивната двойка праймери ограничава PCR продукт от 270 bp, а специфичните праймери продукт от 170 bp. Синтеза съответно на 4G или 5G продукт се осъществява в съответствие с генетичният статус а индивида. Липсата на съответния алел води до отсъствие на амплификационен продукт. За всеки изследван индивид се осъществяват две паралелни PCR реакции – една с 4G и другата с 5G праймера, като и в двете реакции присъстват конститутивните праймери. Визуализацията на резултата се извършва след електрофоретично разделяне на ДНК фрагментите върху 3% агарозен гел и паралелно разглеждане на двете PCR реакции на всеки индивид.

6. Принцип за определяне носителството на полиморфизъм PLA2 на тромбоцитния гликопротеин GPIIb / IIIa Rs5918 в INGB3

Замяната на базата тимин (Т) с цитозина (С) на 1565 позиция в гена на тромбоцитният гликопротеин IIb/IIIa води до създаване на рестрикционно място на ензима MspI. След извършване на полимеразна верижна реакция (PCR) и последваща инкубация на продуктите от изследвания ДНК регион с MspI алелите съдържащи мутацията се разрязват от ензима и

остават с по-малка дължина от ДНК фрагментите несъдържащи мутацията. Визуализацията на резултата се извършва след електрофоретично разделяне на ДНК фрагментите върху 3,5% агарозен гел. Msp I разпознава нуклеотидната секвенция 5' C_TCGG 3'. Наличието на една ивица от 266 b.p показва хомозиготно състояние на Pl A1/A1 алела, докато наличието на две ивици от 221 b.p и 45 b.p – хомозиготно състояние по Pl A2/A2 алела.

Едновременното наличие на две ивици на агарозния гел / от 266 и 221 b. p / индикира хетерозиготно носителство на полиморфизма A1/A2, поради малката си дължина, фрагментът от 45 b.p реално не се наблюдава. Рестрикцията се извършва за 4 -12 часа на 37⁰C. Тества се на 3% агарозен гел с 1x TBE буфер.

7. Статистически анализ на данните

Честотите на алелите и полиморфизмите са изчислени за основната група, всяка подгрупа и за групата на контролите. Използван е статистическият пакет за социални науки (SPSS) Windows version19.0, както и Clinical and Economic Software, EpiMax Table Calculator - Princeton, New Jersey USA. При статистическата обработка на данните за честота са изчислени статистическата значимост на данните определени при $p < 0.05$, интервал на доверителност и относителен риск **OR (95% CI)**, както и **Chi Square** тест за промяна.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Клинични характеристика на пациентите

Жените със СПКЯ в основната група, са от Българската популация и са селектирани в зависимост от вида на клиничната картина, съгласно критериите на Ротердамския консенсус, покриващи изявите: олиго или аменорея и/или хиперандрогенемия, както и поликистозни яйчници доказани с ултразвукови диагностички, хирзутизъм, затлъстяване, алоpecia, акне и др.

При всички пациентки, включени в работната група, се изискваше допълнителна информация, относно наличието на съпътстващи изяви на репродуктивни проблеми като, първичен и вторичен стерилитет, както и ранни (<12 г.с.) или късни (>12 г.с.) спонтанни аборти. Критерии за сформирание на контролната група бяха: изключване на клинични прояви, свързани със СПКЯ, както и репродуктивни проблеми (стерилитет, спонтанни аборти, мъртви раждания).

Поради широкият диапазон от клинични изяви на СПКЯ и големият брой на изследваните генотипни честоти направихме допълнително подразделяне на пациентките със СПКЯ, окончателно оформихме следните групи и подгрупи:

Пациентска група - Жени със СПКЯ - (n=129)

Група I - Жени със СПКЯ и РП - (n=66)

- **Подгрупа 1** - Жени със СПКЯ с първичен стерилитет - (n=19)
- **Подгрупа 2** - Жени със СПКЯ с вторичен стерилитет - (n=15)
- **Подгрупа 3** - Жени със СПКЯ и ранни СПА (<12 г.с.) - (n=18)
- **Подгрупа 4** - Жени със СПКЯ и късни СПА (>12 г.с.) - (n=14)

Група II - Жени със СПКЯ без РП - (n=63)

Контролна група - (n=99)

Висока сигнификантност се отбелязва по отношение на признака затлъстяване: установен при 24.81% (32/129) от жените със СПКЯ и в 5.05% (5/99) от контролите, **Chi Square 14.660, p= 0.000, OR – 6.202, 95%CI 2.182 – 18.983** (табл. 1). В случая, ИТМ е съобразен със средните възрастови граници и за двете групи, които са съответно: 28.9 ± 6.9 год. и 32.3 ± 9.4 год., като ИТН от 25.00 до 30.00 се счита за наднормено тегло, а от 30.10 до 40.00 – за затлъстяване.

От клиничните характеристики в пациентската група, прави впечатление големият относителен дял на жени с олигоменорея - 48.06 % (62/129) или с аменорея - 34.11% (44/129), което съответства на включването на тези клинични признаци, в критериите на Ротердамския консенсус за диагностика на синдрома.

Таблица 1. Антропометрични и клинични характеристики на жените със СПКЯ и контролите

Характеристики:	СПКЯ (n=129)	Контролна група (n=99)	p-value p<0.005
Антропометрични:			
Възраст (години)	28.9 ± 6.9	32.3 ± 9.4	
ИТМ (kg/m ²)	25.22	22.33	
Наднормено тегло (%)	47 (36.43%)	14 (14.14%)	0.001*
Затлъстяване (%)	32 (24.81%)	5 (5.05%)	0.000*
Клинични:			
Хирзутизъм (%)	24 (18.60%)		
Олигоменорея (%)	62 (48.06 %)		
Аменорея (%)	44 (34.11%)		
Първичен стерилитет (%)	19 (14.73 %)		
Вторичен стерилитет (%)	15 (11.63%)		
СПА (ранни) (%)	18 (13.95%)		
СПА (късни) (%)	14 (10.85%)		

*сигнификантна стойност

От общо 129 жени в пациентската група, при 66 (51.16%) имаше репродуктивни нарушения: стерилитет - при 51.51% (34/66) от тях, спонтанни аборти – 48.48% (32/66). Преобладаващи сред репродуктивни проблеми, бяха първичен стерилитет и ранни СПА с дялове, съответно 14.73 % (19/129) и 13.95% (18/129) от жените със СПКЯ.

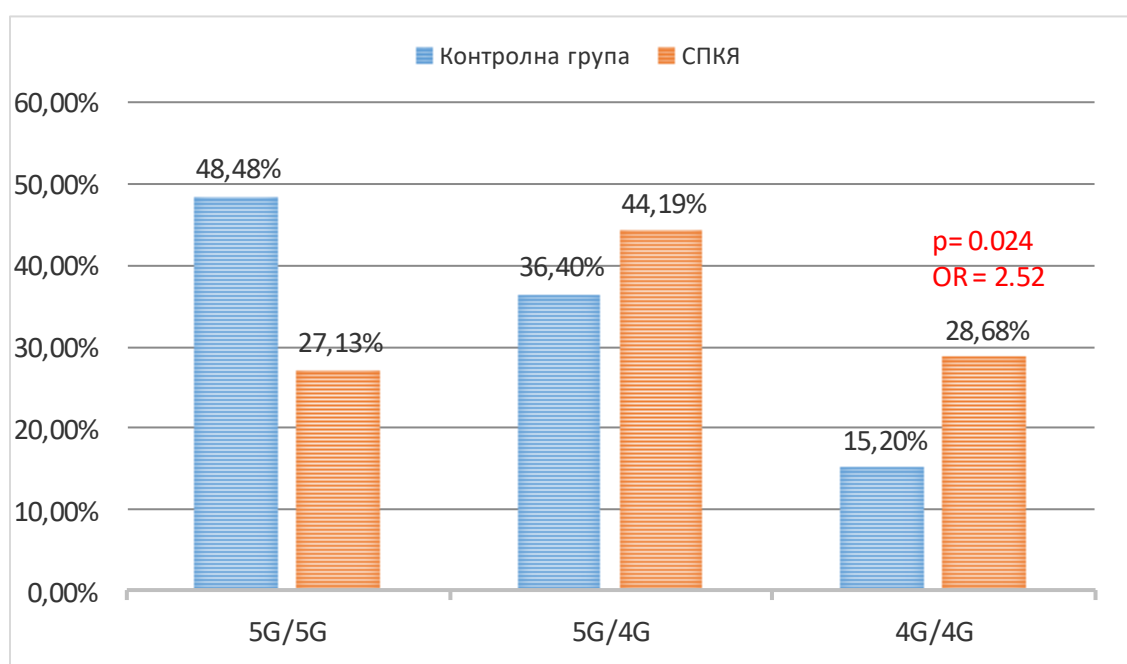
2. Честота на генотипи 5G/5G, 5G/4G и 4G/4G в гена на PAI-1 в пациентската група жени със СПКЯ и в контролната група

Сред основните задачи на настоящето проучване беше да определим честотата на полиморфизъм 4G/5G в гена на PAI-1 при жени със СПКЯ, като я сравним с тази в контролната група, за да проучим асоциацията, а по този начин и ролята на този генетичен вариант, в предиспозицията за развитие на това заболяване (табл. 2)(фиг. 1).

Таблица 2. Честота на генотипи 5G/5G, 5G/4G, 4G/4G на полиморфизъм PAI-1(-675 I/D, 5G/4G) при жени със СПКЯ и контролната група

PAI-1(-675 I/D, 5G/4G)	Контролна група (n=99)			СПКЯ (n=129)		
Генотипове	5G/5G	5G/4G	4G/4G	5G/5G	5G/4G	4G/4G
n (%)	48 (48.48%)	36 (36.40%)	15 (15.2%)	35 (27.13%)	57 (44.19%)	37 (28.68%)
p-value (p < 0.05)				0.291	0.292	0.024*
OR-95%CI				1.47 (0.753-2.885)	1.38 (0.782-2.458)	2.52 (1.102-4.649)
Chi Square				1.115	1.114	5.082

*сигнификантна стойност



Фигура 1. Честота на носителство на генотипи 5G/5G, 5G/4G и 4G/4G в % в групата на жените със СПКЯ и контролната група

Установихме, че честотата на носителство на генотип 5G/5G (хомозиготи по дивият алел) при жените със СПКЯ е по-ниска 27.13% (35/129), от тази намерена в контролната група - 48.48% (48/99) ($p=0.291$, OR=1.47), като не се отчита сигнификантност на различията (фиг. 1).

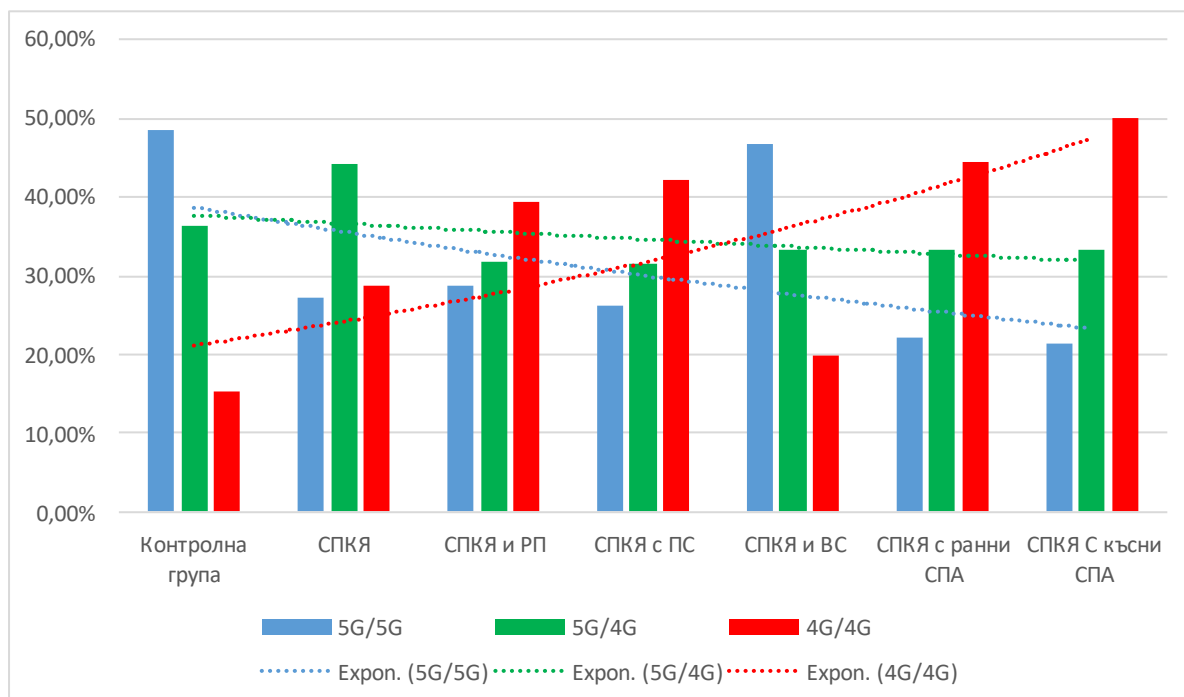
Честотата на генотип 4G/5G (хетерозиготи по мутантния алел) беше по-висока 44.19% (57/129) в пациентската група, в сравнение с контролната група - 36.40% (36/99), ($p=0.292$, OR=1.38), също без статистическа значимост. Най-убедителни и статистически значими различия между двете изследвани групи бяха установени, по отношение хомозиготи по мутантния алел 4G, като при жените със СПКЯ честотата на генотип 4G/4G беше 28.68% (37/129), а в контролната група - 15.2% (15/99), $p=0.024$ и OR=2.52.

2. 1. Честота на генотипи 5G/5G, 5G/4G и 4G/4G на PAI-1 в групите жени със СПКЯ, жени със СПКЯ и РП, подгрупите и в контролната група

За да проучим ролята на полиморфизъм PAI-1 4G/5G, като фактор повишаващ риска за различен тип репродуктивни проблеми при жени със СПКЯ, от включените в проучването общо Жени със СПКЯ - ($n=129$), отделихме Група I - Жени със СПКЯ и РП - ($n=66$) и Група II - Жени със СПКЯ без РП - ($n=63$). В зависимост от типа на репродуктивния проблем, група I подразделихме в подгрупи (табл. 3).

Таблица 3. Честота на носителство на генотипи 5G/5G, 5G/4G и 4G/4G на полиморфизъм PAI-1(-675 I/D, 5G/4G) в основни групи и подгрупи

PAI-1(-675 I/D, 5G/4G)	Контролна група ($n=99$)	Група СПКЯ ($n=129$)	Група I СПКЯ с РП ($n=66$)	Подгрупа 1 СПКЯ с ПС ($n=19$)	Подгрупа 2 СПКЯ с ВС ($n=15$)	Подгрупа 3 СПКЯ със СПА (<12 г.с.) ($n=18$)	Подгрупа 4 СПКЯ със СПА (> 12 г.с.) ($n=14$)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
5G/5G	48 (48.48%)	35 (27.13%)	19 (28.79%)	5 (26.32%)	7 (46.67%)	4 (22.22%)	3 (21.43%)
5G/4G	36 (36.40%)	57 (44.19%)	21 (31.82%)	6 (31.58%)	5 (33.33%)	6 (33.33%)	4 (33.33%)
4G/4G	15 (15.20%)	37 (28.68%)	26 (39.39%)	8 (42.11%)	3 (20.00%)	8 (44.44%)	7 (50.00%)



Фигура 2. Честота на носителство на генотипи 5G/5G, 5G/4G и 4G/4G в % в основните групи, подгрупи и контролната група

Нашето проучване (фиг. 2) установи, че около половината 66 (51%) от изследваните жени със СПКЯ имат различни по характер репродуктивни проблеми: включващи първичен стерилитет 19 жени (28,79%), вторичен стерилитет 15 жени (22,73%), ранни спонтанни аборти 18 жени (27,27%) и късни СПА 14 жени (21,21%). Стерилитетът и спонтанните аборти са сред основни нарушения в репродукцията при това заболяване, с близки по величина дялове, съответно 51,5% и 48.5% от пациентките със СПКЯ.

2. 2. Сравняване честотата на генотип 5G/5G на PAI-1 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група

Честотата на генотип 5G/5G е 28.79% (19/66) в групата на жените със СПКЯ и РП, при сравнение с тази 48.48% (48/99) в контролната група, при статистическа значимост на данните, $p=0.018$ и OR – 0.43. Тези резултати демонстрират обратна асоциация на генотип 5G/5G с репродуктивни проблеми при жените със СПКЯ.

Таблица 4. Сравняване честотата на носителство на генотип: 5G/5G, в основните групи и подгрупите, сравнени с контролната група

PAI-1(-675 I/D, 5G/4G)	Контролна група (n=99)	Група СПКЯ (n=129)	Група I СПКЯ с РП (n=66)	Подгрупа 1 СПКЯ с ПС (n=19)	Подгрупа 2 СПКЯ с ВС (n=15)	Подгрупа 3 СПКЯ със СПА (<12 г.с.) (n=18)	Подгрупа 4 СПКЯ със СПА (> 12 г.с.) (n=14)
Генотип	5G/5G	5G/5G	5G/5G	5G/5G	5G/5G	5G/5G	5G/5G
n (%)	48 (48.48%)	35 (27.13%)	19 (28.79%)	5 (26.32%)	7 (46.67%)	4 (22.22%)	3 (21.43%)
P value (p<0.05)		0.291	0.018*	0.126	1.000	0.071	0.105
OR-95%CI		1.47 (0.753-2.885)	0.43 (0.209-0.876)	0.38 (0.109-1.246)	0.93 (0.276-3.106)	0.34 (0.078-1.086)	0.29 (0.060-1.221)
Chi Square		1.115	5.580	2.334	0.000	3.257	2.616

*сигнификантна стойност

2. 3. Сравняване честотата на генотип 5G/4G на PAI-1 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група

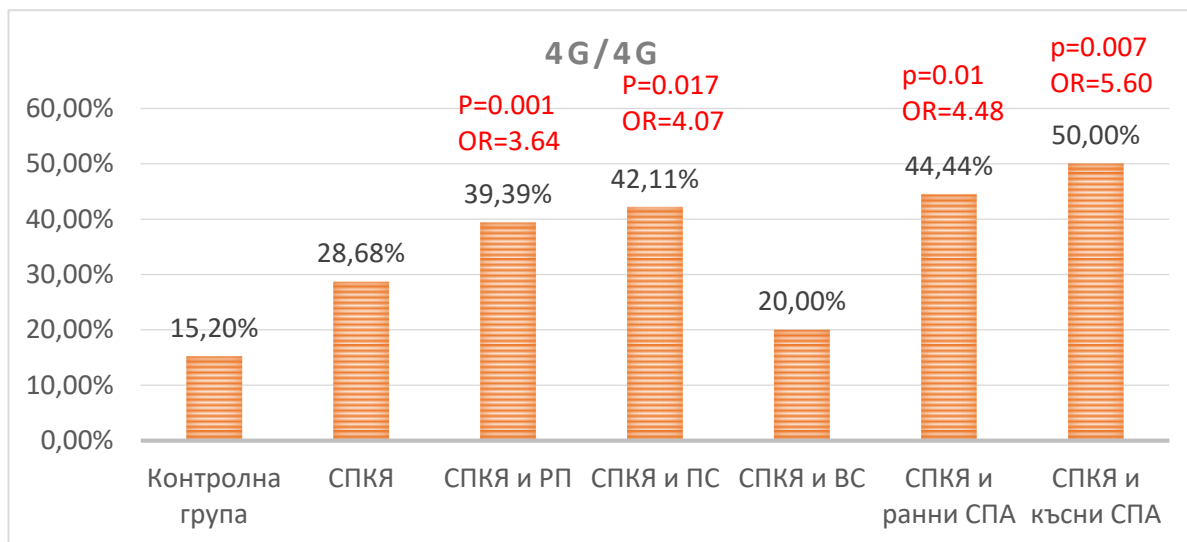
Резултатите не показаха статистически значими различия в честотата на носителство на този генотип, в различните групи и подгрупи, сравнени с тези в контролната група. По този начин не се отчита значение на изолираното носителство на този генотип 5G/4G, като фактор покачващ относителния риск за репродуктивни проблеми при жените със СПКЯ.

2. 4. Сравняване честотата на генотип 4G/4G на PAI-1 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група

Получихме резултати с висока статистическа значимост и висок относителен риск на носителството във всички групи и подгрупи, с изключение на подгрупа 2 жени със СПКЯ и вторичен стерилитет честота 20.0% (3/15), **p=0.921, OR=1.40**. В останалите групи получихме следните резултати: Група Общо жени със СПКЯ - 28.68% (37/129), **p=0.024, OR=2.52**. Група I жени със СПКЯ и РП - 39.39% (26/66), **p=0.001, OR=3.64**. Подгрупа 1 жени със СПКЯ и с първичен стерилитет - 42.11% (8/19), **p=0.017, OR=4.07**. Подгрупа 3 жени със СПКЯ и ранни СПА (<12 г.с.) - 44.44% (8/18), **p=0.011, OR=4.48**. Подгрупа 4 жени със СПКЯ и късни СПА (>12 г.с.) - 50.00% (7/14), **p=0.007, OR=5.60**.

Нашите резултати демонстрират, статистически значимо по-висока честота на носителството на генотип 4G/4G при жените със СПКЯ и РП, при най-висок относителен риск за подгрупите 3 и 4: с ранни СПА (**OR=4.48**) и най-вече с късни СПА (**OR=5.60**) (фиг. 3). Тези данни говорят, че статистически достоверно, носителството на генотип 4G/4G при жени със СПКЯ значително увеличава риска за СПА, в по-голяма степен късни аборти (след първи триместър на бременността).

Също така, данните сочат, висок относителен риск за носителство на генотип 4G/4G и при пациентки в подгрупата с първичен стерилитет. Така, носителството на генотип 4G/4G при жени със СПКЯ, сигнификантно асоциира с повишен риск за репродуктивните проблеми при пациентките с това заболяване.



Фигура 3. Честота на носителство на генотипи 4G/4G в % в основните групи, подгрупи и контролната група

2. 5. Сравняване честотата на генотип 4G/4G на PAI-1 в двете групи жени със СПКЯ с репродуктивни проблеми и без такива

Анализът на данните при жените със СПКЯ показва, че честотата на 4G/4G сред тези от тях с проявени РП е 39.39% (26/66), докато сред пациентките без РП – 17.46% (11/63), при **OR-3.073, p=0.011**, т.е. при жените със СПКЯ, относителният риск за носителство на генотип 4G/4G в групата с РП е 3 пъти по-висок, в сравнение с групата без РП. Така, статистически достоверно, носителството на този полиморфизъм в генотип 4G/4G, при жените със СПКЯ, асоциира с 3 пъти по-висок риск за репродуктивни неудачи (табл. 5).

Таблица 5. Сравняване честотата на 4G/4G PAI-1 при пациентките със СПКЯ и РП и тези със СПКЯ и без РП

PAI-1 (-675 I/D, 5G/4G)	Група I СПКЯ РП (n=66)	Група II СПКЯ без РП (n=63)
Генотип:	4G/4G	4G/4G
n (%)	26 (39.39%)	11 (17.46%)
p-value (p< 0.05)	0.011*	
OR-95%CI	3.07 (1.267-7.560)	
Chi Square	6.546	

***сигнификантна стойност**

В заключение дотук, в настоящето проучване установихме, че статистически достоверно, генотип 4G/4G на PAI-1 се среща 2,5 пъти по-често сред жени със СПКЯ, в сравнение със здравите контроли. Данни показват, че носителството на генотип 4G/4G, би могло да се счита за фактор повишаващ риска за развитие на СПКЯ, така този генетичен полиморфизъм би могъл да се спрегне, като играещ роля в полигенната етиология на това заболяване. Още по-висока степен на асоциация, този генотип демонстрира при жените със СПКЯ и РП, което насочва към значението на този генетичен вариант за репродуктивните проблеми (най-вече спонтанни аборти), свързани с това заболяване.

2. 6. Честота на алелите 5G и 4G на полиморфизъм PAI-1 в основните групи и подгрупи, сравнени с тези в контролната група

При сравняването (табл. 6) на честотата на алел 4G в основните групи и подгрупи на пациентките, с честотата в контролната група и статистическата обработка на данните получихме резултати с висока статистическа значимост и висок относителен риск на носителството във всички групи и подгрупи, с изключение на подгрупа 2 жени със СПКЯ и вторичен стерилитет честота 37.0%, $p=0.879$, $OR=1.158$. В останалите групи получихме следните резултати: Група Общо жени със СПКЯ - 51%, **$p=0.001$, $OR=2.063$** . Група I жени със СПКЯ и РП - 55%, **$p=0.000$, $OR=2.475$** . Подгрупа 1 жени със СПКЯ и с първичен стерилитет - 58%, **$p=0.008$, $OR=2.750$** . Подгрупа 3 жени със СПКЯ и ранни СПА (<12 г.с.) - 61%, **$p=0.003$, $OR=3.143$** . Подгрупа 4 жени със СПКЯ и късни СПА (>12 г.с.) - 64% (7/14), **$p=0.004$, $OR=3.600$** .

Таблица 6. Алелни честоти на 5G и 4G алела в групите на жените със СПКЯ, със СПКЯ и РП, в подгрупите и сравняване с тази в контролната група

PAI-1(-675 I/D, 5G/4G)	Контролна група (n=99)	Група СПКЯ (n=129)	Група I СПКЯ с РП (n=66)	Подгрупа 1 СПКЯ с ПС (n=19)	Подгрупа 2 СПКЯ с ВС (n=15)	Подгрупа 3 СПКЯ със СПА (<12 г.с.) (n=18)	Подгрупа 4 СПКЯ със СПА (> 12 г.с.) (n=14)
(p+q)	198	258	132	38	30	36	28
Генотип:							
5G/5G	48	35	19	5	7	4	3
5G/4G	36	57	21	6	5	6	4
4G/4G	15	37	26	8	3	8	7
5G	132(67%)	127(49%)	59(45%)	16(42%)	19(63%)	14(39%)	10(36%)
4G	66(33%)	131(51%)	73(55%)	22(58%)	11(37%)	22(61%)	18(64%)
p-value (p< 0.05)		0.001*	0.000*	0.008*	0.879	0.003*	0.004*
OR-95%CI		2.063 (1.381-3.084)	2.475 (1.535-3.995)	2.750 (1.282-5.928)	1.158 (0.483-2.745)	3.143 (1.429-6.970)	3.600 (1.473-8.935)
Chi Square		13.187	14.792	7.208	0.023	8.868	8.782

*сигнификантна стойност

Анализът на нашите данни показва, че носителството изобщо на алел 4G (в генотипите хомозиготи 4G/4G + хетерозиготи 5G/4G), може да се открие статистически значимо с относително висок риск (OR – 2.53) сред жените със СПКЯ (в сравнение с общата популация здрави жени) и по този начин може да се счита като фактор за предиспозиция, повишаващ около 2.5 пъти риска за заболяването.

В заключение, при сравнение на всички получени резултатите от нашето проучване, анализът на данните позволява да се направят следните обобщения за Българската популация, относно значението на полиморфизъм PAI-1(-675 I/D, 5G/4G):

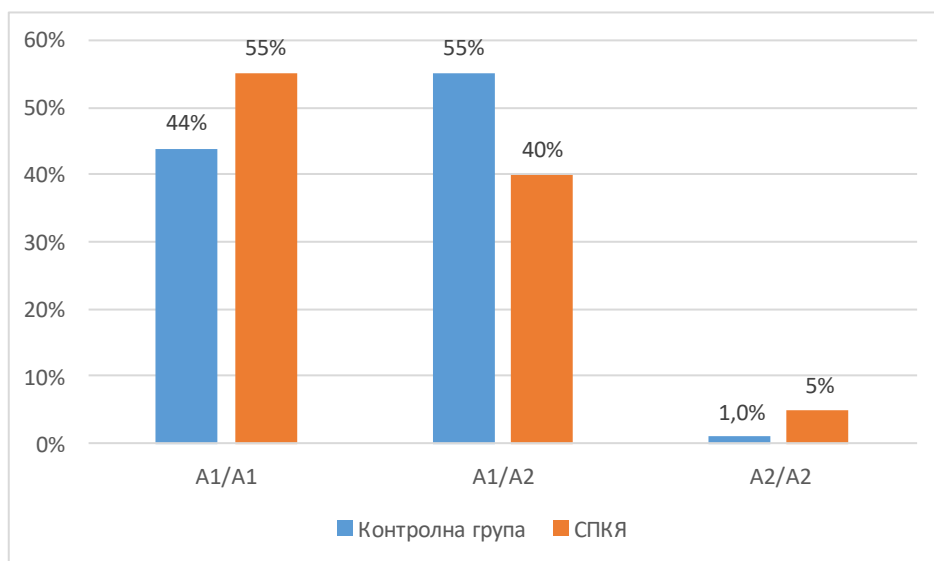
- Носителите общо на алел 4G (генотипите хомозиготи 4G/4G + хетерозиготи 5G/4G) имат като цяло около **2.5 пъти по-висок относителен риск за развитие на СПКЯ**, както и повишен риск за РП (най-вече спонтанни аборти), асоцииращи с това заболяване.
- Алел 4G, също демонстрира статистически значима асоциация със СПКЯ (OR – 2.0). Носителството на 4G алела, при жени с това заболяване, може да увеличи до 2.5 пъти риска за репродуктивни проблеми: спонтанни аборти (увеличава риска средно до 3.3 пъти), в най-голяма степен - късни аборти (до 3.6 пъти), като също така асоциира и с висок риск (OR – 2.8) за първичен стерилитет.

- Генетичен полиморфизъм PAI-1(-675 I/D, 5G/4G), най-вече в генотип 4G/4G (хомозиготи за алел 4G) демонстрира **сигнификантна асоциация със СПКЯ (OR – 2.53)**, като може да се счита за фактор повишаващ риска за предиспозиция към заболяването, за Българската популация. Още по-висока степен на асоциация (**OR – 3.64**), този генотип демонстрира при жените със СПКЯ и РП, което насочва към **значението на този генетичен вариант за репродуктивните проблеми** (най-вече спонтанни аборти **OR – 4.94**), свързани с това заболяване.
- Носителството на генотип 4G/4G, при жени с това заболяване в значителна степен до 3 пъти повишава риска за репродуктивни неудачи, за Българската популация.

3. Проучване честотата на полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C)

3. 1. Честота на генотипи A1/A1, A1/A2 и A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в пациентската група жени със СПКЯ и в контролната група

За да проучим асоциацията между полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) в гена на ITGB3 и заболяването СПКЯ, определихме честотата на трите генотипа за този полиморфизъм при жени със СПКЯ, като я сравнихме с тази намерена в контролната група. В табл. 25 е показано разпределението на генотипи A1/A1, A1/A2 и A2/A2 в групата на жените със СПКЯ и това в контролната група.



Фигура 4. Честота на генотипи A1/A1, A1/A2 и A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) в пациентската група жени със СПКЯ и в контролната група

Честотата на носителството на генотип A1/A1 (хомозиготно носителство по дивият алел), не показва статистически значимо различие при жените със СПКЯ - 55.04% (71/129), в сравнение с контролната група - 44.44% (44/99) (OR=1.53, $p=0.146$). Докато, по отношение на хетерозиготното носителство по мутантния алел (A1/A2), в групата със СПКЯ, честотата е статистически значимо по-ниска 40.31% (52/129) в сравнение с контролната група 54.55% (54/99) (OR=0.563, $p=0.045$).

Макар, че относителният риск за носителство на генотип A2/A2 е около 5 пъти по-висок в пациентската група жени със СПКЯ, в сравнение със здравите контроли, при липса на статистическа значимост, полиморфизъм PLA1/A2 не може да се счита убедително, като фактор за предиспозиция, повишаващ риска за развитие на СПКЯ, в Българската популация.

3. 2. Честота на генотипи A1/A1, A1/A2 и A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в групите жени със СПКЯ, жени със СПКЯ и РП, подгрупите и в контролната група

За да проучим значението на полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) относно риска за репродуктивни проблеми при жени със СПКЯ, изследвахме честота на различните генотипи на полиморфизма в отделните групи и подгрупи, обект на проучването. На табл. 7 са представени данните за честотата на носителство на съответните генотипи (A1/A1, A1/A2 и A2/A2) в основните групи, подгрупи и в контролната група.

Таблица 7. Честота на носителство на генотипи A1/A1, A1/A2 и A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) в основни групи, подгрупи и контролите

<u>ITGB3</u> <u>(1565T/C)</u>	Контролна група (n=99)	Група СПКЯ (n=129)	Група I СПКЯ с РП (n=66)	Подгрупа 1 СПКЯ с ПС (n=19)	Подгрупа 2 СПКЯ с ВС (n=15)	Подгрупа 3 СПКЯ със СПА (<12 г.с.) (n=18)	Подгрупа4 СПКЯ със СПА (> 12 г.с.) (n=14)
A1/A1	44 (44.44%)	78 (60.46%)	36 (54.54%)	11 (57.90%)	9 (60.00%)	8 (44.44%)	8 (57.14%)
A1/A2	54 (54.55%)	43 (33.33%)	25 (37.88%)	7 (36.84%)	6 (40.00%)	6 (33.33%)	6 (42.86%)
A2/A2	1 (1.01%)	8 (6.20%)	5 (7.58%)	1 (5.26%)	- (-%)	4 (22.22%)	- (-%)

3. 3. Сравняване честотата на генотип A1/A1 на полиморфизъм PLA1/A2 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група

От всички изследвани групи, честотата на генотип A1/A1 беше най-ниска 44.44% (8/18) в подгрупата 3 на жените със СПКЯ и ранни СПА, и равна на намерена в контролната група 44.44% (44/99). За останалите групи и подгрупи, установената честота на A1/A1 е по-висока, от тази в контролите (здравни жени без РП), но без статистическа значимост на различията.

3. 4. Сравняване честотата на генотип A1/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група

Честотата на генотип A1/A2, в групата на жените със СПКЯ (33.33%), беше сигнификантно по-ниска от тази в контролната група (54.55%) ($p=0.003$, OR – 0.417), честотата в групата на СПКЯ и РП - 37.88% беше също по-ниска, при гранична статистическа значимост на данните ($p=0.052$, OR – 0.508). За всички останали подгрупи, резултатите не показваха статистически значими разлики в честота на носителство на генотип A1/A2, при сравнение с контролната група.

При това, генотип A1/A2 показва най-висока честота в здравите контроли и по-ниска в отделните изследвани групи и подгрупи пациентки със СПКЯ. По този начин, не се отчита значение на носителството на този генотип A1/A2, като фактор който може да повлиява риска за репродуктивни проблеми при жени със СПКЯ.

3. 5. Сравняване честотата на генотип A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в основните групи и подгрупи, спрямо тази в контролната група

Нашите резултати, относно генотипи A1/A1 и A1/A2, не показваха съществуването на статистически значими различия за честотата им в групата на жените със СПКЯ и РП, както и в подгрупите, при сравнение с контролната група.

За разлика от това, резултатите които получихме за генотип A2/A2, бяха по-отчетливи.

Таблица 8. Сравняване честотата на носителство на генотип A2/A2 на PLA1/A2 (1565T/C), в основните групи и подгрупи, сравнени с тази в контролната група

<u>ITGB3</u> <u>(1565T/</u> <u>C)</u>	Контролна група (n=99)	Група СПКЯ (n=129)	Група I СПКЯ с РП (n=66)	Подгрупа 1 СПКЯ с ПС (n=19)	Подгрупа 2 СПКЯ с ВС (n=15)	Подгрупа 3 СПКЯ със СПА (<12 г.с.) (n=18)	Подгрупа 4 СПКЯ със СПА (> 12 г.с.) (n=14)
A2/A2	1 (1.01%)	8 (6.20%)	5 (7.58%)	1 (5.26%)	- (- %)	4 (22.22%)	- (- %)
p-value (p< 0.05)		0.098	0.074	0.730		0.001*	
OR- 95%CI		6.479 (0.803- 142.496)	8.033 (0.879- 189.363)	5.444 (0.141- 210.245)		28.000 (2.604- 698.043)	
Chi Square		2.730	3.178	0.119		11.968	

*сигнификантна стойност

Това демонстрира, че носителството на генотип A2/A2, се среща с 8 пъти по-често сред жените със СПКЯ и РП, като това са най-вече ранни спонтанни аборти, където статистически значимо относителният риск е най-висок до 28 пъти. Така, носителството на генотип A2/A2 при жени със СПКЯ, асоциира с повишен риск за репродуктивни проблеми, предимно ранни спонтанни аборти.

3. 6. Сравняване честотата на генотип A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в групите жени със СПКЯ с репродуктивни проблеми и без такива

Таблица 9. Сравняване честотата на генотип A2/A2 на полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) при пациентките с РП и тези без РП

<u>ITGB3 (1565T/C)</u>	Група II СПКЯ_без РП (n=63)	Група I СПКЯ с РП (n=66)
<u>A2/A2</u>	3 (4.76%)	5 (7.58%)
p-value (p< 0.05)		0.766
OR-95%CI		1.639 (0.322 - 9.131)
Chi Square		0.088

От общо 129 жени със СПКЯ - 8 (6.20%) са носителски на генотип A2/A2, като 5 от тях са с РП (това са ранни аборти при 4 от тях) и една от жените със СПКЯ носителки на A2/A2 е с ПС. От анализът на данните (табл.9) при жените със СПКЯ става ясно, че генотип A2/A2 се среща в 7.58% от тези от тях, които имат вече проявени РП и сред 4.76% от пациентките без РП (OR – 1.639 и p= 0.766).

Всичко това показва, че при жените със СПКЯ, носителството на генотип A2/A2 не демонстрира сигнификантна асоциация с репродуктивни проблеми. Фактор, който вероятно се отразява на статистиката е малкият брой на изследваните жени.

3. 7. Честота на алелите A1 и A2 на полиморфизъм PLA1/A2 в основните групи и подгрупи, сравнени с тези в контролната група

При сравнението и обработката на тези данни, не се доказаха статистически значими различия в честотата на мутантния алел A2, в нито една от изследваните групи и подгрупи, при сравняване с честотата в контролната група. В процентно съотношение, най-голяма беше

честота на A2 алела в подгрупа 3 на жени със СПКЯ и ранни СПА 38.89%, сравнена с - 28.28% при здравите контроли, при OR-1.614, но без статистическа значимост на намереното различие ($p=0.280$).

Нашите резултати, по отношение на алел A2, показват, че липсва статистически значима асоциация, както със СПКЯ, така и с репродуктивните проблеми при жените с това заболяване т.е. носителството на алел A2 (сам за себе си) не допринася за повишаване на риска за заболяването, нито за РП, свързани с него.

От анализът на тези данни се вижда, че няма статистически значими различия в честотата на носителите на алел A2 (в генотипите хомозиготи A2/A2 + хетерозиготи A1/A2), както в основните групи жени със СПКЯ, със СПКЯ и РП, така и в отделните подгрупи (според характера на РП), при сравнение с честотата в контролната група здрави жени. По този начин може да се заключи, че носителството изобщо на алел A2 не може да се счита като фактор за предиспозиция, към СПКЯ, нито като фактор който повишава риска за репродуктивни проблеми, при жените с това заболяване.

В заключение, при сравнение на всички получени резултати, анализът на нашите данни позволява да се направят следните обобщения за Българската популация, относно значението на полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C):

- Носителството на алел A2 (генотипите хомозиготи A2/A2 + хетерозиготи A1/A2) - не демонстрира статистически значима асоциация, както със СПКЯ, така и с репродуктивните проблеми при жените с това заболяване т.е. носителството на алел A2 не допринася за повишаване на риска за заболяването, нито за РП, свързани с него.
- Генотип A1/A2 (хетерозиготи), не се отчита, като фактор който може да повлиява риска за репродуктивни проблеми при жени със СПКЯ.
- По отношение на генотип A2/A2, се отчете, че относителният риск за носителство на A2/A2 е около 6 пъти по-висок, в пациентската група жени със СПКЯ, в сравнение със здравите контроли, при липса на статистическа значимост, т.е. не може да се счита убедително, като фактор за предиспозиция, повишаващ риска за развитие на СПКЯ, в Българската популация.
- За генотип A2/A2 (хомозиготи), се доказва, че носителството му се среща 8 пъти по-често сред жените със СПКЯ и РП, като това са най-вече ранни спонтанни аборти, където статистически значимо относителният риск за носителство е най-висок до 28 пъти. Така, носителството на генотип A2/A2 асоциира с репродуктивни проблеми, предимно ранни спонтанни аборти, при жените със СПКЯ.
- Малката бройка на изследваните пациенти в отделните групи и подгрупи, ограничава възможността за получаване на по-достоверни статистическите данни и вероятно е фактор, който се отразява върху крайните резултати. Разширяването броя на включените в изследването жени със СПКЯ, при бъдещо продължение на проучването, би позволило по-адекватна оценка на значението на полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) за предиспозицията към развитие на СПКЯ, както и за съпътстващите го репродуктивните нарушения при жените с това заболяването.

4. Проучване честотата на двойно носителство на генотип 4G/4G PAI-1 и генотип A2/A2 PI (1565T/C)

4.1. Сравняване честотата на двойно носителство на генотип 4G/4G PAI-1 и генотип A2/A2 PI в групите жени със СПКЯ, СПКЯ и РП и подгрупите, с тази в контролната група

Таблица 10. Сравняване честотата на двойно носителство на 4G/4G PAI-1 и A2/A2 PI в основните групи и подгрупи, с тази в контролната група

PAI-1 (4G/4G) +PL(A2/A2)	Контролна група (n=99)	Група СПКЯ (n=129)	Група I СПКЯ с РП (n=66)	Подгрупа 1 СПКЯ с ПС (n=19)	Подгрупа 2 СПКЯ с ВС (n=15)	Подгрупа 3 СПКЯ със СПА (<12 г.с.) (n=18)	Подгрупа 4 СПКЯ със СПА (> 12 г.с.) (n=14)
	1 (1.01%)	6 (4.65%)	5 (7.57%)	1 (5.26%)	0(00.00%)	4 (22.22%)	0 (00.00%)
p-value (p< 0.05)		0.233	0.074	0.730		0.001*	
OR-95%CI		4.780 (0.557-108.834)	8.033 0.879-189.363)	5.444 (141-210.245)		28.000 (2.604-698.043)	
Chi Square		1.422	3.178	0.119		11.968	

***сигнификантна стойност**

При сравняване, честотата на двойно носителство в контролната група (Табл.10) беше 1.01% (1/99), в общата група на жените със СПКЯ беше по-висока 4.65% (6/129), в групата жени със СПКЯ и РП – още по-висока 7.57% (5/66), като тези 5 жени с РП, са разпределени в подгрупите, съответно 1 жена е с първичен стерилитет – честота 5.26% (1/19) и 4 жени са с ранни СПА – честота 22.22% (4/18). Така независимо, че честотата на двойно носителство във всички изследвани групи и подгрупи беше по-висока от тази контролната група, статистическата обработка на данните не доказва статистически значими различия за групите жени със СПКЯ (**OR–4.780**, p=0.233), СПКЯ и РП (**OR–8.033**, p=0.074), СПКЯ и първичен стерилитет (**OR–5.444**, p=0.730). Най-висока честота на двойно носителство беше установена статистически достоверно в подгрупата жени със СПКЯ и ранни СПА (**OR–28.000**, p= **0.001**, Chi Square – 11.968, 95%CI 2.604-698.043).

В заключение, двойното носителство на двата полиморфизма PAI-1 4G/4G и Pl A2/A2 се открива с висок относителен риск (**OR – 4.78**) при жени със СПКЯ, макар и несигнификантно. Статистически достоверно, относителния риск за откриване на двойно носителство беше най-висок (**OR – 28.00**) сред жените със СПКЯ и ранни СПА. Това доказва ролята на двойното носителство на двата полиморфизма PAI-1 4G/4G и Pl A2/A2, при жените със СПКЯ, като фактор асоцииращ с повишен риск за репродуктивни неудачи, под формата предимно на ранни спонтанни аборти. Така, двойното носителство на двата генетични варианта при жени със СПКЯ, покачва до 28 пъти риска за СПА до 12 г.с. Потвърждава се значението на комбинацията от няколко генетични фактори, което демонстрира адитивния ефект от съчетанието на един генетичен преразполагащ фактор, с допълнителни генетични и/или негенетични фактори.

ОБОБЩЕНИЕ НА СОБСТВЕНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ

В заключение, въз основа на резултатите от настоящия дисертационен труд, могат да се направят следните обобщение, относно ролята на двата полиморфизма PAI-1 5G/4G и P1 A1/A2:

- Генетичен полиморфизъм PAI-1(-675 I/D, 5G/4G), най-вече в генотип 4G/4G (хомозиготи за алел 4G) демонстрира сигнификантна асоциация със СПКЯ (OR – 2.53), като може да се счита за фактор повишаващ около 2.5 пъти риска за заболяването, за Българската популация. Още по-висока степен на асоциация (OR – 3.64), този генотип демонстрира при жените със СПКЯ и РП, което насочва към значението на този генетичен вариант за репродуктивните проблеми (най-вече спонтанни аборти OR – 4.94), свързани с това заболяване. Носителството на генотип 4G/4G, при жени със СПКЯ, сигнификантно повишава до 3.5 пъти риска за репродуктивни неудачи.

- Генетичен полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) не може убедително да се счита като фактор повишаващ риска, нито за развитие на СПКЯ, нито и за репродуктивни проблеми при жени с това заболяване, за Българската популация. Значението на този вариант се демонстрира главно по отношение на риска за спонтанни аборти (преди 12 г.с.), в която подгрупа носителството на генотипа A2/A2 е сигнификантно по-високо (OR – 28.00), от здравите жени контроли.

- Двойното носителство на двата полиморфизма PAI-1 4G/4G и P1 A2/A2 се открива с висок относителен риск (OR – 4.78) при жени със СПКЯ, макар и несигнификантно. Статистически достоверно, относителния риск за откриване на двойно носителство е най-висок (OR – 28.00) сред жените със СПКЯ и ранни СПА. Това доказва ролята на двойното носителство на двата генетични варианта PAI-1 4G/4G и P1 A2/A2, при жените със СПКЯ, като фактор асоцииращ с повишен риск за репродуктивни неудачи, под формата предимно на ранни спонтанни аборти. Двойното носителство на тези полиморфизми при жени със СПКЯ, покачва до 28 пъти риска за СПА до 12 г.с., като демонстрира адитивния ефект от съчетанието на няколко генетични фактори.

- Малката бройка на изследваните пациенти в отделните групи и подгрупи, е един от факторите, който трябва да се отчете като ограничаващ възможността за получаване на по-достоверни статистическите данни и вероятно даващ отражение върху крайните резултати. Разширяването броя на включените в изследването жени със СПКЯ, при бъдещо продължение на проучването, би позволило по-адекватна оценка на значението на съответния полиморфизъм, както за предиспозицията към развитие на СПКЯ, така и за съпътстващите го репродуктивните нарушения при жените с това заболяването.

- Изследването на полиморфизъм PAI-1 4G/5G, може да се използва в клиничната практика и генетично консултиране, като генетичен маркер за оценка на риска, както за развитие на заболяването СПКЯ (особено при фамилни данни), така и за репродуктивни проблеми, при жените с това заболяване, за Българската популация.

ИЗВОДИ

1. Генетичен полиморфизъм PAI-1 4G/5G, най-вече в генотип 4G/4G (хомозиготи за алел 4G) демонстрира сигнификантна асоциация със СПКЯ, като може да се счита за фактор повишаващ 2,5 пъти риска за предиспозиция към заболяването, за Българската популация.
2. Генетичен полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) не може да се счита за фактор за предиспозиция, като не повлиява риска за развитие на СПКЯ, в Българската популация.
3. Генетичен полиморфизъм PAI-1 4G/5G, най-вече в генотип 4G/4G (хомозиготи за алел 4G), демонстрира сигнификантна асоциация с репродуктивни проблеми, най-вече спонтанни аборти, при жените със СПКЯ, за Българската популация. Носителството на генотип 4G/4G, повишава до 3,5 пъти риска за репродуктивни неудачи, в най-голяма степен (до 5 пъти) – за късни аборти (след 12 г.с.), като асоциира и с висок (до 4 пъти) риск за първичен стерилитет.
4. Генетичен полиморфизъм PLA1/A2 (1565T/C) не може убедително да се счита за фактор повишаващ риска за репродуктивни проблеми при жени със СПКЯ, за Българската популация. Значението на този вариант е главно по отношение на риска за ранни (преди 12 г.с.) спонтанни аборти, където носителството на генотип A2/A2 е сигнификантно по-високо (OR – 28.0), от това - в здравите жени контроли.
5. Двойното носителство на двата генетични варианта PAI-1 4G/4G и Pl A2/A2, сигнификантно покачва до 28 пъти риска за ранни спонтанни аборти, при жени със СПКЯ, за Българската популация.
6. Изследването на генетичен полиморфизъм PAI-1 4G/5G, може да се използва в клиничната практика и генетичното консултиране, във връзка с оценка на риска, както за развитие на заболяването СПКЯ (особено при налични фамилни данни), така и за репродуктивни проблеми, при жените развили това заболяване.

ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в Българската популация е проучена ролята на полиморфизъм PAI -1 4G/5G и полиморфизъм PL A1/A2, като възможни фактори за предразположение към заболяването синдром на поликистозни яйчници (СПКЯ),.
2. За първи път в Българската популация е проучена ролята на полиморфизъм PAI -1 4G/5G и полиморфизъм PL A1/A2, като фактори повишаващи риска за репродуктивни проблеми при жени със СПКЯ.
3. Проучена е ролята на комбинираното носителство на полиморфизмите PAI -1 4G/5G и PL A1/A2, като фактор допълнително повишаващ риска за репродуктивни проблеми при жени със СПКЯ.

Приноси с приложен характер

1. Генетичното тестване за полиморфизъм PAI-1 4G/5G, може да се използва в клиничната практика и генетичното консултиране, като генетичен маркер за оценка на риска, както за развитие на заболяването синдром на поликистозни яйчници (особено при фамилни данни), така и за репродуктивни проблеми, при жените с това заболяване, в българската популация.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД

Научни публикации в български и чужди списания

1. Komsa-Penkova R, Golemanov G, Georgieva G, Slavov N, Popovski K, Ivanov P, Kovacheva K, Atanasova M, Blajev A. Reproductive problems in women with PCOS, the impact of PAI-1 carriers of 4G PAI -1 polymorphism and BMI. Akush Ginekol. 2014;53(5):3-9.
2. Regina Komsa-Penkova, Georgi Golemanov, Boris Tsankov, Petar Ivanov, Lyubomir Beshev, Pencho Tonchev, Rs5918ITGB3 Polymorphism, Smoking, and BMI as Risk Factors for Early Onset and Recurrence of DVT in Young Women, Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2016 Jan 5. pii: 1076029615624778 1-11 The Author(s) 2016 (IF 2.39)
3. Golemanov G. , Komsa-Penkova R. , Kovacheva K. , Ivanov P. , Penkov V. , Georgieva G., Slavov N. THE CARRIAGE OF FII20210G>A POLYMORPHISM IN THE PROTHROMBIN GENE IN WOMEN WITH EARLY PREGNANCY LOSS WITH AND WITHOUT POLYCYSTIC OVARY SYNDROME. Akush Ginekol. Vol. 57, 2018: 4-10

Научни съобщения на български и чужди форуми

1. Simeonova I, Ivanova A, Petkova M, Komsa-Penkova R, Golemanov G, Ivanov P, Tonchev P, Kovacheva K, Slavov N. A novel risk factor of polycystic ovary syndrome. XIV Medical Scientific Conference for Students & Young Doctors, held in Pleven, Bulgaria 10-15 October, 2016
2. Komsa-Penkova R., Golemanov G. Ivanov P. , Nikolaj Slavov , Katya Kovacheva, Pencho Tonchev. BMI, LEPTIN AND PAI-1 IN POLYCYSTIC OVARY SYNDROME PATIENTS, CARRIERS OF SND RS1799889(-). Седма работна среща „Репродуктивна медицина 2017 – противоречия и консенсус“, 28-30 Април, 2017 г., Хотел Ростов, Плевен
3. Komsa -Penkova R, Georgieva G, Golemanov G, Slavov N, Popovski K, Ivanov P, Kovacheva K, Atanasova M, Blajev A, Rathee S. Carriage of 675 4G/5G polymorphism in PAI - 1 gene; association with early pregnancy losses in patients with polycystic ovary syndrome, International Conference on Obstetrics and Gynaecology, London, United Kingdom, September, 26-27, 2014
4. R. Komsa-Penkova, G. Golemanov, B. Cankov, L. Beshev, P. Ivanov, P. Tonchev, T. Andreeva, S. Todinova, I. Simeonova, A. Ivanova, M. Petkova. SND rs1799889(-) IN THE PROMOTOR OF THE PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR – 1 GENE CONTRIBUTES TO THE RISK OF DVT IN WOMEN. 1- 5 November 2015, Bucharest, Romania, 22th ESPEN Course of Clinical Nutrition and Metabolic. Poster.

We can't see the important things in life, but we feel them. That's why you don't know the answers to your questions. You feel that something is wrong, you know there is nothing wrong with the view outside, but you know I stare at it every morning. Do you see the footsteps outside?

„The Footsteps Moved Further Away“ by Yana Golemanova

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своите най-искрени и чистосърдечни благодарности на научните ми ръководители проф. Регина Комса-Пенкова, д. б. н и проф. д-р Катя Ковачева, д. м. за тяхната изключителна професионална помощ и коректност за написването на този труд, за търпението и за това, че успявах да ме мотивират в трудните за мен моменти!

На доц. Петър Иванов - за всичко с което ми помогна и за приятелството!

На д-р Веселин Пенков - за отличното сътрудничество и мъжката дума!

На доц. Мария Симеонова – за пътя, който ми показва през лабиринта на всички процедури по защитата!

На проф. Мария Средкова – за огромната подкрепа и вярата в мен!

На проф. Алексей Савов – първият ми учител в областта на ДНК анализа!

На колегите ми от екипа на сектор „Биохимия“ – за това, че работихме заедно в професионална и приятелска атмосфера!

На колегите ми от екипа във вирусологичната лаборатория към МУ–Плевен за подкрепата, разбирането и за това, че бяхме един до друг и сме в трудното време на пандемията!

И не на последно място на и моето семейство за вярата в мен и за безрезервната подкрепа!

На Христина, Боби и Яна за огромната им любов, доверие и подкрепа към мен! Благодаря Ви!

Георги Големанов

SUMMARY

Polymorphisms 4G/5G in the PAI-1 gene and PL A1/A2 in the platelet glycoprotein IIb / IIIa gene as possible risk factors for reproductive problems in women with polycystic ovary syndrome

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine diseases in women, associated with menstrual disorders, anovulatory infertility and androgenism. Women with PCOS are at risk of metabolic syndrome factors, such as insulin resistance (IR), hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, risk of heart disease, reproductive problems (RP) including miscarriages, diabetes, high body mass index (BMI).

Aim: The study aims to investigate the role of polymorphisms 4G/5G in PAI -1 gene and PL A1/A2 in the platelet glycoprotein IIb / IIIa gene as predisposed factors for PCOS development as well as risk factors for reproductive problems in women with the disease.

Patients: A total of 129 women with PCOS and 99 health controls from the Bulgarian population (age from 18 to 45 years) were included in the study. The polymorphisms PAI -1 4G/5G and PL A1/A2 were investigated in all patients and controls.

Results: The frequency of heterozygous genotype 4G/5G was higher 44.19% (57/129) in the patient group, compared to the control group - 36.40% (36/99), ($p = 0.292$, OR – 1.38). The most convincing and statistically significant difference between the two study groups was found for homozygotes on the mutant 4G allele, among the women with PCOS the frequency of genotype 4G/4G was 28.68% (37/129), and in the control group - 15.2% (15/99), $p = 0.024$ and OR – 2.52. Significantly were also the results on frequency of 4G/4G in the other groups: Group I women with PCOS and RP - 39.39% (26/66), $p = 0.001$, OR – 3.64. Subgroup 1 women with PCOS and primary sterility - 42.11% (8/19), $p=0.017$, OR – 4.07. Subgroup 3 women with PCOS and early abortions (<12 g.w.) - 44.44% (8/18), $p=0.011$, OR – 4.48. Subgroup of 4 women with PCOS and late abortions (>12 g.w.) - 50.00% (7/14), $p=0.007$, OR – 5.60.

Conclusions: Homozygous state of genotype 4G/4G in women with PCOS increases significantly up to 3.5 times the risk for reproductive problems. Significance of the polymorphism PL A1/A2 in the platelet glycoprotein IIb/IIIa gene was demonstrated mainly in terms of the risk for miscarriage (before 12 weeks): the risk is significantly increased, among women with PCOS carriers of genotype A2/A2. Genetic test of polymorphism PAI-1 4G/5G, is recommended to be used in clinical practice and genetic counseling, as a useful genetic marker in risk assessment for both the disease development (particularly in cases of positive family history of PCOS) and the reproductive problems in women with PCOS, in Bulgarian population.